



Composición de ácidos grasos de lipopéptidos con actividad antifúngica sintetizados por *Bacillus amyloliquefaciens*

Nancy Ley-López¹, José Basilio-Heredia², Isabel Cruz-Lachica², Isidro Márquez-Zequera², Raymundo Medina-López¹, Cesar San Martín-Hernández³, Raymundo Saúl García-Estrada^{2*}, Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Sinaloa. Carretera Culiacán-Eldorado Km 17.5, Aparatado Postal 25, CP. 80000, Culiacán, Sinaloa, México¹, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Coordinación Culiacán (CIAD). Km 5.5 Carretera a Eldorado, Campo El Diez, CP. 80110. Culiacán, Sinaloa, México², Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Km 36.5 Carretera México- Texcoco, Montecillo, CP 56264, Estado de México, México³.

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

Sección:
Edición periódica

Recibido:
14 Marzo, 2025
Aceptado:
10 Julio, 2025
Publicado:
18 Julio, 2025

Cita:
Ley-López N, Basilio Heredia J, Cruz-Lachica I, Márquez-Zequera I, Medina-López R, San Martín-Hernández C y García-Estrada RS. 2025. Composición de ácidos grasos de lipopéptidos con actividad antifúngica sintetizados por *Bacillus amyloliquefaciens*. Revista Mexicana de Fitopatología 43(3): 77. <https://doi.org/10.18781/R.ME.X.FIT.2503-1>

RESUMEN

Antecedentes/Objetivo. Algunas especies de *Bacillus* sintetizan lipopéptidos con actividad biológica, que contienen ácidos grasos de longitud variable. La composición de ácidos grasos es clave para su posible actividad como agentes surfactantes. El objetivo fue determinar la composición y cuantificación de ácidos grasos en las estructuras de los lipopéptidos sintetizados por *Bacillus amyloliquefaciens* KX953161.1 y observar el efecto de los lipopéptidos sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* MG557870 y *Sclerotium rolfsii* OM510466.

Materiales y Métodos. El perfil lipídico del extracto con lipopéptidos sintetizados por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 se realizó mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), la cuantificación de los ácidos grasos detectados se realizó mediante el método de estandarización de áreas y para la determinación de grasa se realizó con el método de 920.39 AOAC. Además, se utilizó microscopía electrónica de barrido (SEM) para observar el efecto inhibitorio de los lipopéptidos sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* MG557870 y *S. rolfsii* OM510466. Los datos obtenidos (determinación de ácidos grasos y CMI) fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA), y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

Resultados. Se observó una variabilidad de ácidos grasos C₁₃ al C₁₈ β -hidroxilados. El ácido graso C₁₄ β -hidroxilado (tetradecanoico), obtuvo mayor contenido con 8.254 ± 0.031 ng mg⁻¹ de muestra, seguido los ácidos grasos C₁₃ β -hidroxilado (tridecanoico) y C₁₆ (palmítico) con 4.304 ± 0.064 y 4.100 ± 0.120 ng mg⁻¹, respectivamente. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los lipopéptidos sobre *F. oxysporum* MG557870 y *S. rolfsii* OM510466 fue de 20 y 15 μ g mL⁻¹. El daño en células fúngicas se presentó en su estructura y morfología.

Conclusión. La síntesis de lipopéptidos por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 presenta variación en la longitud de las cadenas de ácidos grasos, compuestas principalmente por ácido graso C₁₄ (tetradecanoico). Esta variabilidad podría estar relacionada con la actividad biológica de los lipopéptidos y el ácido graso C₁₄ (tetradecanoico) podría ser importante en su antagonismo contra hongos fitopatógenos.



Palabras clave: Actividad surfactante, β -hidroxilado, Tetradecanoico, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*

INTRODUCCIÓN

La especie bacteriana *Bacillus amyloliquefaciens* es capaz de secretar metabolitos secundarios con actividad biológica como respuesta a los estímulos de la microbiota externa (Gimenez *et al.*, 2021; Bai *et al.*, 2023; Ley-López *et al.*, 2023). Estos compuestos son fuente importante de estructuras químicas novedosas para la biotecnología y se han identificado gran número de nuevos metabolitos secundarios microbianos (Yan *et al.*, 2020; Posa *et al.*, 2023). Así mismo, se caracterizan por presentar propiedades surfactantes, que incluyen a los lipopéptidos cíclicos no ribosomales de las familias iturina, surfactina y fengicina (Carolin *et al.*, 2021; Bai *et al.*, 2023). Dichos metabolitos poseen diversas capacidades biológicas como antitumorales, propiedades hemolíticas y antimicrobianas; asociado a ésta última, sobre una variedad de microorganismos fitopatógenos (bacterias, hongos y oomycetos) causando lisis celular y filtración a través de la unión con la membrana plasmática (Zhou *et al.*, 2020). Mecanismo principal que permite las actividades biológicas de los lipopéptidos; como es el caso de la inhibición del crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii* por los lipopéptidos sintetizados por *B. subtilis* (Abdel-Gayed *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2017). La actividad antifúngica del lipopéptido fengicina sobre *Fusarium oxysporum* inhibe el crecimiento micelial del fitopatógeno (Nam *et al.*, 2015) y se menciona que el lipopéptido fengicina afecta las características estructurales y morfológicas de la membrana celular (Zhao *et al.*, 2017). Asimismo, induce apoptosis a bajas concentraciones y necrosis a altas concentraciones cuando las células fúngicas son tratadas con fengicina (Gimenez *et al.*, 2021).

La composición estructural de los lipopéptidos consiste en un macrociclo peptídico hidrofílico variable, unido a una cadena lateral de residuo de ácido graso (Zhao *et al.*, 2017). A su vez, estas familias de lipopéptidos presentan homólogos, estructuras similares o peso molecular idéntico que difieren en la longitud de la cadena de ácidos grasos y en la composición de aminoácidos del anillo peptídico (Biniarz *et al.*, 2017; Ley-López *et al.*, 2023). La biosíntesis de lipopéptidos por *Bacillus* spp. comienza con el ensamblaje por adición sucesiva de aminoácidos tanto proteinogénicos como no proteinogénicos por las sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS). Asimismo, por la unión de ácidos grasos a las NRPS en forma de acetyl-CoA para ácidos grasos de cadena lineal, e isobutiril-CoA, isovaleril-CoA y metilbutiril-CoA para ácidos grasos ramificados (Chooi *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2021). Se ha reportado que los miembros de la familia del lipopéptido surfactina, presentan una longitud en cadena de ácidos grasos de C₁₂ a C₁₆ (de Faria *et al.*, 2011; Jajor *et al.*, 2016); mientras que la familia de iturina presentan una longitud en la cadena de ácidos de C₁₄ a C₁₇ (Jin *et al.*, 2020) y la familia de fengicina tienen una longitud de C₁₄ a C₁₈ de largo, que pueden ser saturados e insaturados (Sa *et al.*, 2018). Existe diversidad estructural básica de lipopéptidos cíclicos bacterianos, donde el grupo carboxilo del ácido graso puede formar un enlace peptídico con un residuo de aminoácido situado en la cadena lateral de la molécula del lipopéptido (Urajová *et al.*, 2016; Biniarz *et al.*, 2017). Así mismo, el ácido graso se puede incorporar en la estructura del péptido mediante ciclación, frecuentemente en carbono C₂ o C₃ por grupos β -amino o β -hidroxi (Duitman *et al.*, 1999; Mareš *et al.*, 2014). Esta diversidad en la estructura del macrociclo peptídico y longitud de la fracción de los ácidos grasos de los lipopéptidos,

presentan propiedades anfipáticas que tienen un papel decisivo en su modo de acción y pueden actuar como antibióticos, antiadhesivos, agentes limpiadores y espumantes, pero su acción sobre las células vivas no siempre es clara (Tomek *et al.*, 2015; Biniarz *et al.*, 2017). Youssef *et al.* (2005) observaron que la composición de ácidos grasos es fundamental para la actividad biosurfactante de los lipopéptidos, mostrando una correlación positiva significativamente entre el porcentaje de masa del ácido graso iso-3-OH-C₁₄ y la actividad específica del lipopéptido. Por lo tanto, la composición de los ácidos grasos es importantes para las propiedades biológicas de los lipopéptidos como las familias de la surfactina, iturina y fengicina (Chooi *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2020). Bai *et al.* (2023) analizaron lipopéptidos con GC-MS y describieron las principales diferencias entre los homólogos de lipopéptidos, que surgen de la longitud de la cadena de ácidos grasos y los aminoácidos en la cadena peptídica. Así mismo, Qian *et al.* (2020) reportaron que los homólogos de bacilomicina D con ácidos grasos de C₁₄ y C₁₅ presentaban actividad antifúngica; en ambos trabajos obtuvieron mayor contenido de masa de ácidos grasos con longitud de carbono C₁₄ y C₁₅. Sin embargo, todavía se reportan nuevos tipos estructurales de la composición de lipopéptidos, que destacan su rica diversidad química y su variabilidad en la longitud de la cadena de ácidos grasos.

Recientemente, en la cepa bacteriana *Bacillus amyloliquefaciens* KX953161.1 con actividad oomycida sobre *Phytophthora capsici* (Ley-López *et al.*, 2018), se identificaron diversos homólogos en las familias de lipopéptidos (fengicina, surfactina y bacilomicina) con diferencias en el peso molecular, debido a la presencia de cadenas de ácidos grasos con longitudes variables; sin embargo, se desconoce el perfil lipídico del extracto de lipopéptidos sintetizados por esta bacteria; así como, la cuantificación de los ácidos grasos que se detecten (Ley-López *et al.*, 2023). Por lo anterior, se ha puesto interés en la composición de los ácidos grasos en la estructura de lipopéptidos que produce esta bacteria. El objetivo de este estudio fue determinar la composición y cuantificación de los ácidos grasos en las estructuras de los lipopéptidos sintetizados por la bacteria *B. amyloliquefaciens* KX953161.1, mediante cromatografía de gases con detector de llama (CG-FID) y determinar el efecto de los lipopéptidos producidos por la bacteria en estudio sobre la morfología microscópica del micelio de *F. oxysporum* MG557870 y *S. rolfii* OM510466.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Las cepas evaluadas (bacteria y hongos) para este estudio, fueron proporcionadas por la colección de cepas del Laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, Unidad Culiacán, México. *B. amyloliquefaciens* B17 (KX953161.1) aislada de la rizósfera de plantas de tomate, se reactivó en agar nutritivo (AN) a 27 °C. *F. oxysporum* MG557870 (Isaac *et al.*, 2018) y *S. rolfii* OM510466 (García-León *et al.*, 2022) fueron aislados de raíces en cultivos de hortalizas (tomate y chile). Ambos microorganismos fueron identificados con base en características morfológicas, utilizando claves taxonómicas específicas, y previamente se les realizaron pruebas de patogenicidad. Se reactivaron en agar papa dextrosa (PDA) por 10 d a 28-30 °C. Los medios de cultivo para crecimiento de los microorganismos fueron adquiridos por Sigma-Aldrich®, USA.

Producción de lipopéptidos. Para la síntesis de lipopéptidos de la bacteria *B. amyloliquefaciens* KX953161.1, se utilizó el inóculo de bacteria en 50 mL del medio de cultivo líquido Luria-Bertani (LB) (peptona de caseína 10.0 g L⁻¹, extracto de levadura 5.0 g L⁻¹, y cloruro sódico 10.0 g L⁻¹ con pH 7.0). Se incubó a 30±1 °C en un agitador orbital a 150 rpm/18-20 h alcanzando una concentración de células bacterianas de 3x10⁸ UFC, de acuerdo con la escala de McFarland. El segundo medio de cultivo consistió, en 500 mL de medio Landy (glucosa 20 g L⁻¹, ácido L-glutámico 5 g L⁻¹, extracto de levadura 1 g L⁻¹, K₂HPO₄ 1 g L⁻¹, MgSO₄ 0.5 g L⁻¹, KCl 0.5 g L⁻¹, CuSO₄ 1.6 mg L⁻¹, Fe₂ (SO₄)₃ 0.4 mg L⁻¹, MnSO₄ 1.2 mg L⁻¹) con pH inicial de 7.0 (Landy *et al.*, 1948). Ambos medios de cultivo, se esterilizaron a 121 °C durante 15 min. Posteriormente, se transfirieron 30 mL del inóculo bacteriano al medio Landy y se incubó durante 6 d a 30±1 °C con agitación a 180 rpm.

La extracción de células bacterianas fue bajo centrifugación (HERMLE® Z 36 HK, Alemania) a 10,000 rpm por 12 min a 4 °C. La extracción de los lipopéptidos se realizó por el método de precipitación ácida del sobrenadante (Unás *et al.*, 2018). El sobrenadante sin células bacterianas se acidificó con la adición de HCl 6N, hasta obtener pH=2.0, se incubó por 24 h a 4 °C, y para obtener el pellet con los lipopéptidos se centrifugó a 12,000 rpm durante 20 min a 4 °C, por último, se liofilizó y se preservó hasta su uso (FreeZone Triad Benchtop Freeze Dryer, LABCONCO®, USA).

Análisis de ácidos grasos por CG-FID. El proceso implica la fragmentación hidrolítica del enlace entre la parte peptídica/proteica y las porciones de lípidos. Por lo que, a las cadenas de ácidos grasos resultantes se les realizó una derivatización a ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) y su posterior análisis por GC-FID. Para la derivatización se utilizó el Kit de extracción MAK174 (Sigma®), siguiendo los protocolos de Smyth *et al.* (2014). En el análisis de la parte lipídica del material, se utilizó 25 mg del material purificado y liofilizado, que fue lavado con hexano para eliminar los ácidos grasos libres presentes, el producto obtenido se colectó en un vial de vidrio ámbar para su posterior análisis por cromatografía de gases.

Se acopló un cromatógrafo de gases Agilent 7890B a un detector de ionización de llama (DIF). Las muestras se inyectaron utilizando un muestreador automático Agilent GC Sampler 80 con puertos de inyección split/splitless con una columna capilar VF-5ms de 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, bajo las condiciones que se muestran en el Cuadro 1. La temperatura del inyector fue de 250 °C, el gas portador fue helio con un flujo de 1.0 µL min⁻¹, modo Pulsed Splitless. Para determinar el posible compuesto detectado, se realizó una comparación espectral en la biblioteca NIST (NIST 2011b Mass Spectral Library using NIST MS Search Rev. 2011b or the Probability Based Matching (PBM) Search Format as a part of Agilent Technologies MS WorkStation Software Version 7.0).

Cuadro 1. Condiciones de inyección por Cromatografía de Gases (CG).

Etapas	Temperatura	Velocidad (°C/min)	Duración (min)	Total (min)
Inicial	70	-	5	5
1	180	20	6	15
2	230	15	5	30.5
3	300	10	3	40

Cuantificación de ácidos grasos. La cuantificación de los ácidos grasos detectados se realizó mediante el método de estandarización de áreas; esto se realizó directamente a partir de la corrida cromatográfica de la muestra, se obtiene de la sumatoria de las áreas de todos los picos eluidos en la corrida de muestra. El total representa el 100 % del área de cada pico identificado como ácidos grasos. La determinación de grasa se realizó por el método de 920.39 AOAC, este parámetro se obtuvo con 3 g de lipopéptidos liofilizados en un dedal de extracción Golsfish (LABCONCO®, USA). La extracción se realizó con éter de petróleo anhidro durante 4 h. El extracto obtenido con los solventes se evaporó a sequedad en una estufa a 105 °C. Finalmente, el cálculo de grasa se realizó mediante la siguiente ecuación.

$$\%EE = \frac{P_e \times 100}{P_m}$$

%EE= Porcentaje de extracto etéreo.

P_e= Peso de extracto (peso del vaso seco al final de la extracción y el peso constante de éste previo a la extracción).

P_m= Peso de la muestra.

Actividad inhibitoria por extracto con lipopéptidos. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto con los lipopéptidos sintetizados por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 sobre *F. oxysporum* MG557870 y *S. rolfsii* OM510466 se determinó mediante el método de difusión en placas. Esto consistió en colocar discos de 6 mm de diámetro conteniendo micelio de los hongos, en el centro de una caja Petri con PDA y colocando discos de papel Whatman de 6 mm de diámetro, impregnados con las concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 µg mL⁻¹ de lipopéptidos, incubadas a 26±1 °C por 6 d. La CMI se determinó visualmente en función de la concentración mínima de solución de muestra necesaria para garantizar que no se observara crecimiento de hongos. Todos los análisis se realizaron por triplicado. La CMI se consideró para las muestras de observación ultraestructural de los hongos por microscopía electrónica de barrido (MEB).

Análisis ultraestructural por MEB. Para la observación estructural de los hongos mediante el análisis MEB, se tomaron esporas e hifas de *F. oxysporum* MG557870 y micelio de *S. rolfsii* OM510466 con 6 y 3 d de crecimiento respectivamente. Se colocaron en tubos Eppendorf de 2 mL y se adicionó la suspensión de lipopéptidos con la concentración obtenida del ensayo de CMI para cada hongo, se dejaron reposar por 10 min. Posteriormente, se fijaron en glutaraldehído al 2.5 % (preparado en buffer fosfato de sodio 0.1 M) a 4 °C por 24 h, luego se enjuagaron tres veces con buffer fosfato (0.02 M) y posteriormente se fijaron con tetraóxido de osmio al 2 % durante 2 h a 20 °C. El deshidratado se efectuó con una serie ascendente gradual de concentraciones de etanol (30, 50, 75 y 95 %) durante 10 minutos c/u, secando con CO₂ y se recubrieron por pulverización catódica con oro paladio en un aparato de recubrimiento por pulverización catódica Nanotech (ES-2030 HITACHI®, Japón). Las muestras se mantuvieron en un desecador hasta el examen con un electrón de barrido usando un microscopio (Philips, SEM-505, Holanda) operado a 30 kV.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos de la determinación de ácidos grasos y CMI fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA), y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) con el software Minitab 19.

RESULTADOS

Análisis de CG-FID. Los ácidos grasos presentes en los lipopéptidos sintetizados por la bacteria *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 fueron analizados después de la derivatización mediante CG-FID. El cromatograma obtenido muestra 10 picos principales con tiempo de retención de 12.82, 13.30, 14.58, 15.04, 16.43, 17.13, 18.25, 19.49, 19.97 y 21.33 min, cada uno de ellos corresponde a los ácidos grasos detectados (Figura 1). Se detectaron ácidos grasos β -hidroxilados C_{13} a C_{18} y se identificaron ácidos grasos mirístico C_{14} y palmítico C_{16} (Cuadro 2). En el análisis del contenido total de cada ácido graso identificado se observó que el ácido graso β -hidroxilado C_{14} (tetradecanoico) (Figura 2) obtuvo mayor contenido con 8.254 ± 0.031 ng mg^{-1} de muestra, seguido los ácidos grasos β -hidroxilado C_{13} (tridecanoico) y C_{16} (palmítico) con 4.304 ± 0.064 y 4.100 ± 0.120 ng mg^{-1} , respectivamente (Cuadro 2).

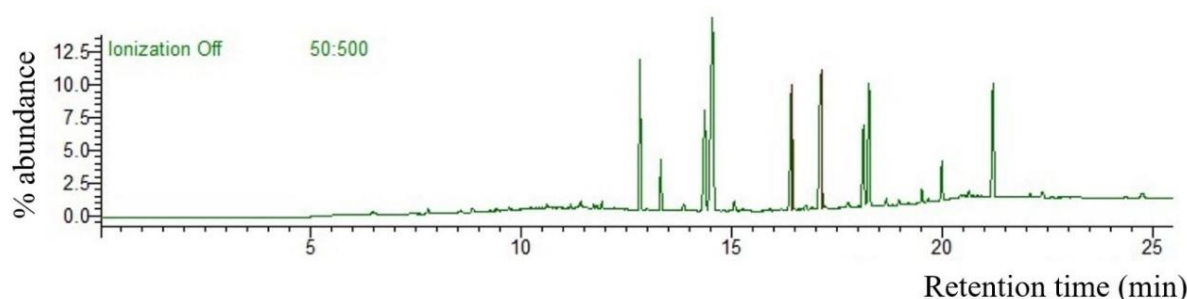


Figura 1. Cromatograma del perfil lipídico de los lipopéptidos sintetizados por *Bacillus amyloliquefaciens* KX953161.1, analizados por CG-MS.

Cuadro 2. Perfil de ácidos grasos de los lipopéptidos biosintetizados por *Bacillus amyloliquefaciens* KX953161.1, identificados por CG-MS.

Compuesto	Tiempo de retención	Carbono	Total (%)	ng mg^{-1} de muestra
1	12.827	3-OH- C_{13}	14.348	4.304 ± 0.064 b*
2	13.306	C_{14} (Mirístico)	4.158	1.247 ± 0.138 d
3	14.588	3-OH- C_{14}	27.516	8.254 ± 0.031 a
4	15.048	C_{15}	1.042	0.312 ± 0.056 ef
5	16.434	3-OH- C_{15}	12.482	3.744 ± 0.088 c
6	17.135	C_{16} (Palmítico)	13.667	4.100 ± 0.120 b
7	18.256	3-OH- C_{16}	12.118	3.635 ± 0.089 c
8	19.499	3-OH- C_{17}	0.914	0.274 ± 0.071 f
9	19.974	C_{18}	1.788	0.536 ± 0.033 e
10	21.330	3-OH- C_{18}	0.140	0.042 ± 0.024 g

*En la columna, letras diferentes indican diferencias significativas entre las muestras de acuerdo a la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$).

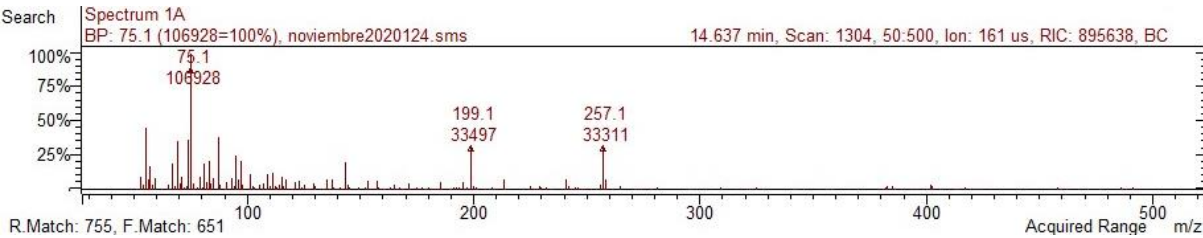


Figura 2. Espectro de masas del ácido graso C₁₄ (Tetradecanoico) del extracto con lipopéptidos sintetizado por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1.

Actividad inhibitoria y observación ultraestructural de los hongos. En el análisis CMI para el efecto antifúngico con los lipopéptidos sintetizados por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1, se observó con la concentración mínima de 20 µg mL⁻¹ de lipopéptidos un halo inhibitorio de 0.95 mm en el crecimiento micelial de *F. oxysporum* MG557870 y para *S. rolfsii* OM510466 con 15 µg mL⁻¹ de lipopéptidos, mostró un halo inhibitorio de 1.5 mm (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto antifúngico de los lipopéptidos sintetizados por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 con la CMI sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* MG557870 y *S. rolfsii* OM510466.

Concentración de lipopéptidos (µg mL ⁻¹)	Inhibición del crecimiento micelial (mm)	
	<i>F. oxysporum</i> MG557870	<i>S. rolfsii</i> OM510466
C/1 ^z	0 b ^y	0 e
5	0 b	0 e
10	0 b	0 e
15	0 b	1.50±0.13 d
20	0.95±0.06 a	1.60±0.15 c
25	1.03±0.09 a	2.00±0.08 b
30	1.26±0.15 a	2.20±0.08 b
40	1.08±0.15 a	2.52±0.09 a

^yLetras diferentes, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \geq 0.05$).

^zControl (libre de lipopéptidos).

Las concentraciones mínimas de inhibición con lipopéptidos de 15 y 20 µg mL⁻¹ sobre *S. rolfsii* OM510466 y *F. oxysporum* MG557870 respectivamente, se utilizaron para el análisis de observación MEB de esporas y micelio de los hongos asociados a enfermedades, esto para tratar de comprender el mecanismo de acción de los lipopéptidos. Se observó que las hifas de *F. oxysporum* MG557870 no tratados con lipopéptidos, presentaban las superficies lisas, sin daño y sin roturas (Figura 3B). En las esporas, se observó un crecimiento y germinación normal, con la superficie relativamente lisa (Figura 3D). Mientras que, en las hifas tratadas con lipopéptidos, se observó deformación, roturas y arrugamiento en la superficie (Figura 3A), en las esporas se observó que la mayoría no lograron germinar con éxito; algunas que lograron germinar eran anormales y deformes, con torceduras, distorsionadas y encogidas (Figura 3C). En el micelio de *S. rolfsii* OM510466 sin tratamiento, se observó un patrón similar que en *F. oxysporum*

MG557870, sin perturbación en la superficie y desarrollo normal (Figura 4B y D); mientras que, el micelio tratado con lipopéptidos, se observó la formación de poros en la superficie celular del hongo que propiciaron su rotura, deformación y textura rugosa (Figura 4A y C).

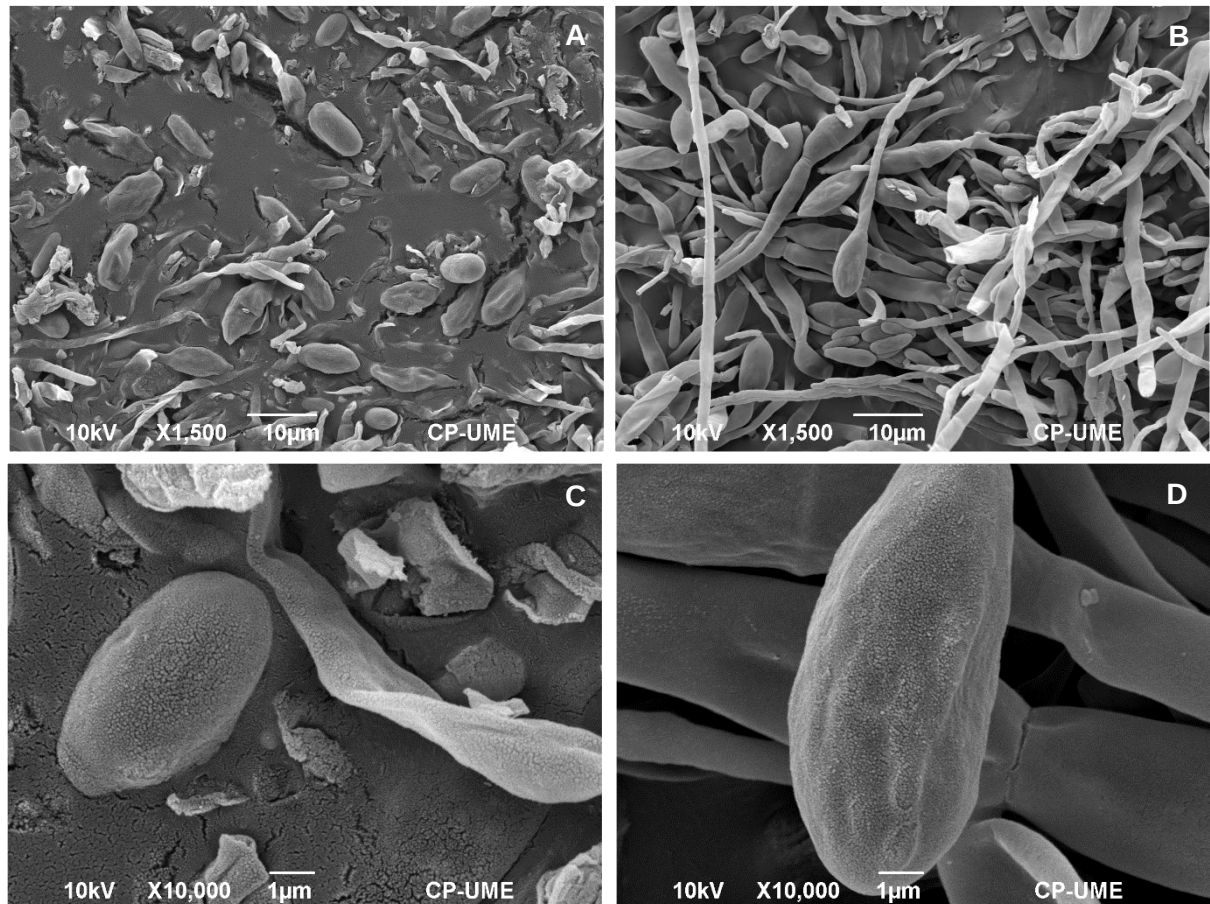


Figura 3. Micrografías (MEB) de esporas e hifas de *Fusarium oxysporum* MG557870 después del tratamiento con lipopéptidos sintetizados por *Bacillus amyloliquefaciens* KX953161.1. A y C: esporas e hifas tratadas con lipopéptidos (1,500x, bar= 10 μ m y 10,000x, bar= 1 μ m, respectivamente); B y D: esporas e hifas sin lipopéptidos (1,500x, bar= 10 μ m y 10,000x, bar= 1 μ m, respectivamente).

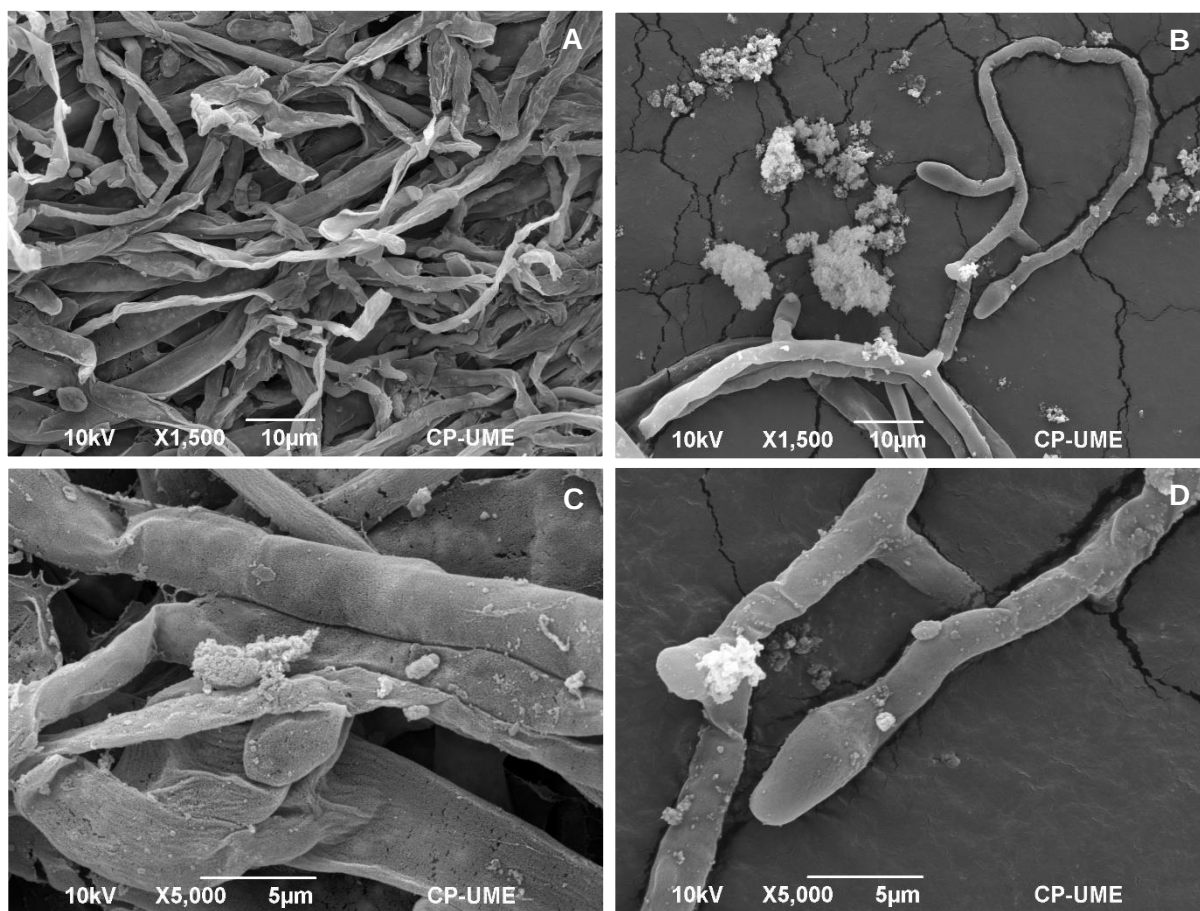


Figura 4. Micrografías (MEB) de micelio de *Sclerotium rolsii* OM510466 después del tratamiento con lipopéptidos sintetizados por *Bacillus amyloliquefaciens* KX953161.1. A y C: micelio tratado con lipopéptidos (1,500x, bar= 10 µm y 5,000x, bar= 5 µm, respectivamente); B y D: micelio sin lipopéptidos (1,500x, bar= 10 µm y 5,000x, bar= 5 µm, respectivamente).

DISCUSIÓN

Algunas especies del género *Bacillus* son productoras de una variedad de compuestos antimicrobianos, como *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* productoras de varias familias de lipopéptidos (bacilomicina, fengicina y surfactina); así como una diversidad de homólogos de estas familias (Carolin *et al.*, 2021; Qian *et al.*, 2020; Ley-López *et al.*, 2023).

Los lipopéptidos microbianos son una clase de moléculas con una composición estructural, que consiste en un macrociclo peptídico hidrofílico variable, unido a una cadena lateral de residuo de ácido graso (Zhao *et al.*, 2017). Estos lipopéptidos tienen la capacidad de reducir la tensión superficial e interfacial de las biopelículas; además pueden eventualmente alterar la estructura de la membrana, reportado como el principal mecanismo de los lipopéptidos, que permite las actividades biológicas (Zhao *et al.*, 2017). Muchas de estas moléculas con propiedades activas de membrana juegan un papel importante por formar poros en la membrana, causando fugas del citoplasma hacia el exterior celular (Liu *et al.*, 2010), la formación de canales iónicos, la acción como

transportador de cationes (Sheppard *et al.*, 1991) y efecto de tipo detergente (Heerklotz y Seelig, 2007), que pueden conducir a efectos citotóxicos en las estructuras vegetativas y reproductivas de los hongos competidores. El lipopéptido surfactina presenta efectos de actividad superficial, se inserta en las bicapas lipídicas, solubiliza la fase fluida de fosfolípidos, cationes quelatos monovalentes y divalentes, y modifica la permeabilidad de la membrana mediante la formación de canales o la solubilización de la membrana, mediante un mecanismo similar al de un detergente (Deleu *et al.*, 2013). Este lipopéptido puede formar canales independientes del voltaje en biopelículas y alterar la integridad de la membrana y la permeabilidad de los iones, incluidos Ca^{2+} y K^{+} , lo que puede conducir a la rotura de la membrana (Inès y Dhouha 2015; Ostroumova *et al.*, 2010). El lipopéptido bacilomicina L presenta una fuerte actividad antifúngica y se cree que causa la rotura de la membrana, esta actividad antifúngica está relacionada con su interacción con dianas intracelulares (Zhang *et al.*, 2013). Así mismo, se ha reportado que fengicina afecta las características estructurales y morfológicas de las membranas biológicas y en concentraciones altas puede desintegrar completamente la capa de lípidos (Deleu *et al.*, 2005).

En esta investigación, se identificaron diferentes ácidos grasos β -hidroxilado, con diferentes longitudes de cadena C_{13} a C_{18} (Cuadro 2), los cuales pueden estar unidos a los lipopéptidos cíclicos, que en estudios anteriores se identificaron como homólogos de las familias de lipopéptidos fengicina, surfactina y bacilomicina sintetizados por esta bacteria (Ley-López *et al.*, 2023). Esta diversidad en la longitud de la cadena de ácidos grasos proporciona la forma y composición de isómeros de lipopéptidos. La variación de posición de los grupos funcionales en pequeñas moléculas orgánicas es responsable de la actividad biológica (Routhu *et al.*, 2021). El perfil lipídico de los lipopéptidos sintetizados por *B. subtilis* y *B. mojavensis* reportado por Yousset *et al.* (2005) mostró variabilidad en la cadena de ácidos grasos C_{13} a C_{16} , que estaban presentes como mezclas de isómeros y Bai *et al.* (2023) reportaron que la síntesis de ácidos grasos por *B. amyloliquefaciens* abarcó la cadena de ácidos grasos de C_{14} a C_{18} . Además, mencionan que, en algunos casos los ácidos grasos 3-OH- C_{14} (tetradecanoico) y 3-OH- C_{15} (pentadecanoico), juntos constituyen la mayoría de los ácidos grasos de lipopéptidos. Así, para algunas especies de *Bacillus*, el ácido graso tetradecanoico ha sido el principal isómero (Qian *et al.*, 2020; Besson *et al.*, 1992; Youssef *et al.*, 2005). Adicionalmente, se demostró que existe una relación positiva entre el porcentaje de contenido del ácido graso tetradecanoico y la actividad surfactante específica y plantearon que el ácido graso par ramificado (en este caso, iso- C_{14}) podría dar el equilibrio hidrofílico-lipofílico óptimo requerido para una actividad superficial óptima (Youssef *et al.*, 2005). Besson *et al.* (1992) reportaron por primera vez el ácido graso β -hidroxilado tetradecanoico, como constituyente presente en un lipopéptido surfactante, sintetizada por *Bacillus subtilis* y que los porcentajes de ácidos grasos β -hidroxilado varían de acuerdo con la cepa productora de antibióticos y pueden ser influenciados por la adición de aminoácidos en el medio de cultivo en crecimiento de la bacteria productora. También se ha reportado que bajo presión (presencia de organismos competidores) la bacteria *B. subtilis* aumenta la producción de lipopéptidos, con una potente actividad antimicrobiana (fúngicas y bacterianas); además, confirmaron una acumulación sustancial de ácidos grasos en respuesta a la presión elevada (Kumar *et al.*, 2020; Ley-López *et al.*, 2023). Por lo anterior, se debe realizar una inducción adecuada con aminoácidos y producir en mayor cantidad el ácido graso β -hidroxilado

tetradecanoico en el lipopéptido y purificar este compuesto para realizar estudios específicos de actividad biológica.

De acuerdo con Youssef *et al.* (2005) y los resultados obtenidos en este estudio, donde se observó mayor contenido del ácido graso β -hidroxilado tetradecanoico y un efecto inhibitorio sobre los hongos *F. oxysporum* MG557870 y *S. rolsii* OM510466 (Figura 3 y 4), se puede deducir, que este ácido graso componente de los lipopéptidos está relacionado en la actividad biológica del compuesto. Se ha reportado que los compuestos antifúngicos sintetizados por bacterias del género *Bacillus* causan daños en la estructura y morfología de las células de *F. oxysporum*, *S. rolsii* y *Aspergillus* (Xu *et al.*, 2020; Abdel-Gayed *et al.*, 2019; Gong *et al.*, 2014). Además, el número de átomos de carbono en la cadena de ácidos grasos es otro factor importante que determina la capacidad biológica de algunos lipopéptidos, al incrementar la hidrofobicidad de los ácidos grasos aumenta la capacidad biológica (de Faria *et al.*, 2011). Los resultados de este trabajo indican que la composición y variación en la longitud de la cadena de ácidos grasos β -hidroxilado de los biosurfactantes lipopéptidos es importante para su actividad antifúngica.

En estudios posteriores relacionados con la actividad biológica, se sugiere realizar una purificación del ácido graso C₁₄ con el lipopéptido; además, inducir a la bacteria para que produzca los ácidos grasos específicos, y potenciar el efecto biológico de los lipopéptidos.

CONCLUSIONES

En el perfil lipídico de la muestra con lipopéptidos sintetizados por la bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* KX953161.1, existe variación en la longitud de la cadena de ácidos grasos desde C₁₃ a C₁₈ β -hidroxilados. Estos ácidos grasos presentes en los lipopéptidos se componen principalmente del ácido graso β -hidroxilado C₁₄ (tetradecanoico) con 27.5 % del total de ácidos grasos presentes, el cual aumenta su probabilidad con la actividad biológica del lipopéptido. Estos compuestos sintetizados por *B. amyloliquefaciens* KX953161.1 demostraron un efecto antifúngico sobre *F. oxysporum* MG557870 y *S. rolsii* OM510466. El efecto de los lipopéptidos fue a través de observación ultraestructural en la pared celular de los hongos, que mostraron daños en la estructura y morfología de las células fúngicas.

Limitaciones

Una limitante para dar seguimiento a este estudio es la inducción para aumentar la síntesis de lipopéptidos con mayor cantidad de ácidos grasos, principalmente β -hidroxilado C₁₄ (tetradecanoico) y realizar pruebas de efectividad biológica.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Contribución de los autores

“Conception, N.L.-L. and R.S.G.-E.; conceptualization, C.S.M.-H. and R.M.-L.; methodology, N.L.-L., J.B.H. and R.S.G.-E; software, N.L.-L., C.S.M.-H. and I.C.-L; validation, N.L.-L., R.S.G.-E., J.B.H. and R.M.-L.; formal analysis, N.L.-L., R.S.G.-E., J.B.H. and I.M.-Z.; investigation, N.L.-L., R.S.G.-E. and J.B.H.; resources, N.L.-L., R.S.G.-E., and I.M.-Z.; data curation, N.L.-L., R.S.G.-E., J.B.H. and R.M.-L.; writing-

original draft preparation, N.L.-L., R.S.G.-E. and J.B.H.; writing-review and editing, N.L.-L., R.S.G.-E. and J.B.H.; visualization, N.L.-L. and R.S.G.-E.; supervision, N.L.-L., R.S.G.-E. and J.B.H.; project administration, N.L.-L. and R.S.G.-E.; funding acquisition, N.L.-L. and R.S.G.-E. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.”

REFERENCIAS

- Abdel-Gayed MA, Abo-Zaid GA, Matar SM and Hafez EE. 2019. Fermentation, formulation and evaluation of PGPR *Bacillus subtilis* isolate as a bioagent for reducing occurrence of peanut soil-borne diseases. J. Integ. Agric 18:2080-2092. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62578-5](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62578-5)
- Bai S, Qiao B, Hou ZJ, Gao GR, Cao CY, Cheng JS and Yuan YJ. 2023. Mutualistic microbial community of *Bacillus amyloliquefaciens* and recombinant *Yarrowia lipolytica* co-produced lipopeptides and fatty acids from food waste. Chemosphere 310:136-864. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136864>
- Besson F, Tenoux I, Hourdou ML and Michel G. 1992. Synthesis of β -hydroxy fatty acids and β -amino fatty acids by the strains of *Bacillus subtilis* producing iturinic antibiotics. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism 1123(1):51-58. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(92\)90170-Z](https://doi.org/10.1016/0005-2760(92)90170-Z)
- Biniarz P, Łukaszewicz M and Janek T. 2017. Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. Critical Reviews in Biotechnology 37(3):393-410. <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1163324>
- Carolin CF, Kumar PS and Ngeuegni PT. 2021. A review on new aspects of lipopeptide biosurfactant: Types, production, properties and its application in the bioremediation process. Journal of Hazardous Materials. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124827>
- Chooi YH and Tang Y. 2010. Adding the lipo to lipopeptides: do more with less. Chem Biol. 17(8):791-793. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.08.001>
- de Faria AF, Teodoro-Martinez DS, de Oliveira Barbosa GN, Vaz BG, Silva ÍS, Garcia JS, Tótola MR, Eberlin MN, Grossman M, Alves OL and Durrant LR. 2011. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. Process Biochemistry 46(10):1951-1957. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.001>
- Deleu M, Lorent J, Lins L, Brasseur R, Braun N, El Kirat K, Nylander T, Dufrêne YF and Mingeot-Leclercq MP. 2013. Effects of surfactin on membrane models displaying lipid phase separation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes 1828(2):801-815. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2012.11.007>
- Deleu M, Paquot M and Nylander T. 2005. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface-implications for the effect of fengycin on biological membranes. Journal of Colloid and Interface Science 283(2):358-365. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.09.036>
- Duitman EH, Hamoen LW, 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. Proceedings of the National Academy of Sciences 96(23):13294-13299. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13294>
- García-León E, Alvarado-Padilla JJ, Mora-Romero GA, Leyva-Madrigal KY, Aguilar-Pérez VH and Tovar-Pedraza JM. 2022. First report of *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) in Mexico. Plant Disease 106(12):3202. <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-22-0270-PDN>
- Gimenez D, Phelan A, Murphy CD and Cobb SL. 2021. Fengycin A Analogues with Enhanced Chemical Stability and Antifungal Properties. Organic Letters. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.1c01387>
- Gong Q, Zhang C, Lu F, Zhao H, Bie X and Lu Z. 2014. Identification of bacillomycin D from *Bacillus subtilis* fmbJ and its inhibition effects against *Aspergillus flavus*. Food Control 36(1):8-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.034>

- Heerklotz H and Seelig J. 2007. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *European Biophysics Journal* 36(4-5):305-314. <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0091-5>
- Inès M and Dhougha G. 2015. Lipopeptide surfactants: production, recovery and pore forming capacity. *Peptides* 71:100-112. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.07.006>
- Isaac MR, Leyva-Mir SG, Sahagun-Castellanos J, Camara-Correia K, Tovar-Pedraza JM, Rodriguez-Perez JE. 2018. Occurrence, identification, and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with tomato wilt in Mexico. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 46(2):484-493. <https://doi.org/10.15835/nbha46211095>
- Jajor P, Piłakowska-Pietras D, Krasowska A and Łukaszewicz M. 2016. Surfactin analogues produced by *Bacillus subtilis* strains grown on rapeseed cake. *Journal of Molecular Structure* 1126:141-146. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2016.02.014>
- Jin P, Wang H, Tan Z, Xuan Z, Dahar GY, Li QX, Miao W and Liu W. 2020. Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 163:102-107. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.11.004>
- Kumar AG, Dharani G, Kirubakaran R and Atmanand MA. 2020. Production and characterization of antimicrobial peptides from *Bacillus subtilis* isolated from deep-sea core samples. *Current Science* (00113891) 118(11). <https://doi.org/10.18520/cs/v118/i11/1725-1730>
- Landy MW, GH, Warren GH, Rosenman MSB and Colio LG. 1948. Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 67(4):539-541. <https://doi.org/10.3181/00379727-67-16367>
- Ley-López N, Heredia JB, Martín-Hernández CS, Cruz-Lachica I, Márquez-Zequera I, Medina-López R and García-Estrada RS. 2023. Identification and Quantification of Lipopeptide Homologues Induced and Produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Fermentation* 9(11):944. <https://doi.org/10.3390/fermentation9110944>
- Ley-López N, Márquez-Zequera I, Carrillo-Fasio JA, León-Félix J, Cruz-Lachica I, García-Estrada RS and Allende-Molar R. 2018. Efecto de biocontrol e inhibición germinativa de *Bacillus* spp. sobre zoosporas de *Phytophthora capsici*. *Revista mexicana de fitopatología* 36(2):215-232. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1711-2>
- Liu X, Tao X, Zou A, Yang S, Zhang L and Mu B. 2010. Effect of themicrobial lipopeptide on tumor cell lines: apoptosis induced by disturbing the fatty acid composition of cell membrane. *Protein & cell* 1(6):584-594. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0072-4>
- Mareš J, Hájek J, Urajová P, Kopecký J and Hrouzek P. 2014. A hybrid non-ribosomal peptide/polyketide synthetase containing fatty-acyl ligase (FAAL) synthesizes the β -amino fatty acid lipopeptides puwainaphycins in the Cyanobacterium *Cylindrospermum alatosporum*. *PLoS One* 9(11):e111904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111904>
- Nam J, Jung M Y, Kim PI, Lee HB, Kim SW and Lee CW. 2015. Structural characterization and temperature-dependent production of C 17-fengycin B derived from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum BC32-1. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 20(4):708-713. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0350-3>
- Ostroumova OS, Malev VV, Ilin MG and Schagina LV. 2010. Surfactin activity depends on the membrane dipole potential. *Langmuir* 26(19):15092-15097. <https://doi.org/10.1021/la102691y>
- Posa L, Tomek P, Lamba S, Sarojini V and Barker D. 2023. Development of truncated Battacin antimicrobials featuring novel N-terminal fatty acids with an excellent safety profile. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 96:129535. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2023.129535>
- Qian S, Li X, Sun L, Shen Y, Ren Q, Diao E and Lu Z. 2020. Exploration of production of C 14 and C 15 bacillomycin D homologues with enzymatic hydrolysis from maize straws using fed-batch fermentation by *Bacillus subtilis* NS-174. *RSC Advances* 10(11):6725-6734. <https://doi.org/10.1039/C9RA10536K>
- Routhu SR, Ragi NC, Yedla P, Shaik AB, Venkataraman G, Cheemalamarri C, Kumar CG, Amanchy R, Sripadi P and Kamal A. 2021. Identification, characterization and evaluation of novel antifungal cyclic peptides from *Neobacillus drentensis*. *Bioorganic Chemistry* 115:105180. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105180>

- Sa RB, An X, Sui JK, Wang XH, Ji C, Wang CQ, Li Q, Hu YR and Liu X. 2018. Purification and structural characterization of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis* from poplar wood bark. *Australasian Plant Pathology* 47(3):259-268. <https://doi.org/10.1007/s13313-018-0552-1>
- Sheppard JD, Jumarie C, Cooper DG and Laprade R. 1991. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1064(1):13-23. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90406-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90406-X)
- Smyth TJ, Rudden M, Tsaousi K, Marchant R and Banat IM. 2014. Protocols for the Isolation and Analysis of Lipopeptides and Bioemulsifiers. In *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols* (pp. 3-28). Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/8623_2014_29
- Tomek P, Hrouzek P, Kuzma M, Sýkora J, Fišer R, Černý J, Novák P, Bařtová S, Šimek P, Hof M, Kavan D and Kopecký J. 2015. Cytotoxic lipopeptide muscotoxin A, isolated from soil cyanobacterium *Desmonostoc muscorum*, permeabilizes phospholipid membranes by reducing their fluidity. *Chemical Research in Toxicology* 28(2):216-224. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/tx500382b>
- Unás JH, de Alexandria Santos D, Azevedo EB and Nitschke M. 2018. *Brevibacterium luteolum* biosurfactant: Production and structural characterization. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 13:160-167. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.12.005>
- Urajová P, Hájek J, Wahlsten M, Jokela J, Galica T, Fewer DP, Kust A, Zapomělová-Kozlíková E, Delawska K, Sivonen K, Kopecký J and Hrouzek P. 2016. A liquid chromatography–mass spectrometric method for the detection of cyclic β -amino fatty acid lipopeptides. *Journal of Chromatography A* 1438:76-83. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2016.02.013>
- Xu W, Wang K, Wang H, Liu Z, Shi Y, Gao Z and Wang Z. 2020. Evaluation of the biocontrol potential of *Bacillus* sp. WB against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Biological Control* 147:104288. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104288>
- Yan F, Li C, Ye X, Lian Y, Wu Y and Wang X. 2020. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* MG3 against *Colletotrichum gloeosporioides* in loquat fruits. *Biological Control* 146:104281. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104281>
- Youssef NH, Duncan KE and McInerney MJ. 2005. Importance of 3-hydroxy fatty acid composition of lipopeptides for biosurfactant activity. *Applied and Environmental Microbiology* 71(12):7690-7695. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.12.7690-7695.2005>
- Zhang B, Dong C, Shang Q, Han Y and Li P. 2013. New insights into membrane-active action in plasma membrane of fungal hyphae by the lipopeptide antibiotic bacillomycin L. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1828(9):2230-2237. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.05.033>
- Zhao H, Shao D, Jiang C, Shi J, Li Q, Huang Q, Shahid M, Rajoka R, Yang H and Jin M. 2017. Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101(15):5951-5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>
- Zhou S, Liu G and Wu S. 2020. Marine bacterial surfactin CS30-2 induced necrosis-like cell death in Huh7. 5 liver cancer cells. *Journal of Oceanology and Limnology* 38(3):826-833. <https://doi.org/10.1007/s00343-019-9129-2>
- Zhu Z, Zhang B, Cai Q, Cao Y, Ling J, Lee K and Chen B. 2021. A critical review on the environmental application of lipopeptide micelles. *Bioresource Technology* 125602. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125602>