

Bacillus mojavensis: PRODUCTOR DE BIOSURFACTANTES CON ACTIVIDAD CONTRA *Colletotrichum gloeosporioides* Penz & Sacc var. Minor Simmonds

Data de aceite: 02/10/2023

Tomás Joel López Gutiérrez

Profesor de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas en la Universidad Autónoma de Campeche, Campeche.

Betty Sarabia Alcocer

Profesora de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas en la Universidad Autónoma de Campeche, Campeche

Baldemar Aké Cancé

Profesor de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas en la Universidad Autónoma de Campeche, Campeche.

Eduardo Jahir Gutiérrez Alcántara

Profesor de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas en la Universidad Autónoma de Campeche, Campeche

Román Pérez Balan

Profesor de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas en la Universidad Autónoma de Campeche, Campeche

RESUMEN—El objetivo de este trabajo fue obtener los biosurfactantes de naturaleza lipopeptídica producidos por la bacteria *Bacillus mojavensis* y determinar la actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* Penz & Sacc var.

minor Simmonds. El extracto crudo en presencia de 10^3 conidios/mL del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* no presentó inhibición, pero el extracto semipurificado obtenido con sulfato de amonio alcanzó una concentración mínima inhibitoria de $12.5 \mu\text{g/mL}$. En conclusión, el método óptimo para la extracción del biosurfactante fue el sulfato de amonio al 40% siendo el metanol un solvente adecuado para semipurificar y obtener una concentración mínima inhibitoria de $25 \mu\text{g/mL}$ contra *C. gloeosporioides*.

PALABRAS CLAVE—biosurfactantes, lipopéptidos, *Bacillus mojavensis*, *Colletotrichum gloeosporioides*.

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos marinos han desarrollado capacidades metabólicas y fisiológicas particulares para adaptarse a hábitats extremos y en respuesta producen metabolitos que generalmente no se expresan en los microorganismos de origen terrestre. Por tal motivo, el hábitat marino es una fuente potencial para la búsqueda de nuevos compuestos como antibióticos,

antioxidantes, bioemulsificantes, biosurfactantes, enzimas, fármacos, surfactantes aniónicos, vitaminas y otros compuestos de importancia comercial (Sarubbo et al 2022 y Satpute et al., 2010). Los surfactantes sintéticos han generado, en el 2008, un crecimiento en el mercado de 13 millones de toneladas a nivel mundial equivalente a 23.9 billones de dólares, en tanto que en el 2009 aumentó un 2 % y se espera que para el 2025 aumente del 3 al 5 % más (Mordor 2022 y Reznick et al., 2010). Sin embargo, estos surfactantes son derivados del petróleo, por lo que existe un gran interés en la búsqueda y aplicación de compuestos marinos bioactivos ,como los biosurfactantes, que son de gran importancia, debido a su diversidad estructural y funcional así como sus múltiples propiedades, tales como su actividad antimicrobiana y antiviral, agentes de biocontrol de enfermedades de plantas, alta biodegradabilidad y selectividad, baja toxicidad, compatibilidad con el medio ambiente, detergencia, dispersión, emulsificación, específicos en condiciones de altas temperaturas, pH y salinidad, formación de espuma, humectación y solubilización de compuestos hidrófobos. (Nawazish 2022, Perfumo et al., 2010, Tapaty y Dabashis, 2022,). Otra ventaja que presentan los biosurfactantes es que son obtenidos mediante procesos de fermentación microbiana, donde se pueden utilizar sustratos económicos y controlar las condiciones de cultivo (Desai y Banat, 1997).

Los biosurfactantes, producidos por una amplia variedad de microorganismos se clasifican por su composición química en: a) compuestos de alto peso molecular constituidos por polisacáridos, lipopolisacáridos, lipoproteínas, entre otros y b) compuestos de bajo peso molecular como los glicolípidos, polipéptidos, lipopéptidos, entre otros (Ekambaram et al 2022; Smyth et al., 2010). Los lipopéptidos producidos por el género *Bacillus* han sido estudiados por el amplio espectro de actividad antimicrobiana, y especialmente por su actividad antifúngica (Banat et al., 2010). Este es el caso de los lipopéptidos pertenecientes a la familia de las iturinas que presentan notable actividad hemolítica y antifúngica in vitro. Por otra parte, las fengicinas aunque no poseen alta actividad hemolítica como las surfactinas e iturinas, si presentan una buena actividad antifúngica (Ongena y Jacques, 2007).

Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides* Penz & Sacc var. minor Simmonds del o los lipopéptido (s) aislado(s) y purificado(s) del cultivo de la bacteria marina *Bacillus mojavensis* (MC3B-22).

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

Microorganismo

La cepa antagonista *B. mojavensis* (MC3B-22) utilizada en este trabajo, se encuentra conservada en ultracongelación a -80°C en la Colección de Cultivos Microbianos Ambientales (CCMA) del Departamento de Microbiología Ambiental y Biotecnología (DEMAB).

Medio y condiciones de cultivo

Se realizó un pre-cultivo de 24 horas de la cepa *B. mojavensis* (MC3B-22) en caldo Luria Bertani Miller (Fluka) suplementado sales marinas (Sigma) (LBMSM) a 25°C, 140 rpm y luz constante. Transcurrido el tiempo, el pre-cultivo se ajustó a una densidad óptica (DO) de 3 a 520 nm. Diez mililitros del pre-cultivo, previamente ajustado, fue inoculado en matraces Erlenmeyer blafeados conteniendo el caldo Luria Bertani Miller. Las condiciones que se establecieron para el cultivo fueron las mismas que se usaron para la realización del pre-inóculo. El tiempo de fermentación para la obtención máxima del extracto crudo fue de 84 horas. Posteriormente, se procedió a obtener el sobrenadante libre de células (SLC) mediante centrifugación (Ultracentrifuga Eppendorf 5810-R) del medio de cultivo a 4000 rpm a 4°C y se filtró con membranas Millipore de 0.45 µm (Durán, 2010).

Métodos de extracción del biosurfactante

Extracción ácida: el SLC fue ajustado a un pH ácido con HCl 6 M y se dejó reposar toda la noche a 4°C para la precipitación completa del biosurfactante. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm durante 45 minutos a 4°C y se colectó el precipitado. El precipitado se resuspendió en agua basificada para después ser congelado y liofilizado (Labconco). Se obtuvo el rendimiento con respecto al volumen del medio y se expresó en gr/L.

Extracción con sulfato de amonio: El SLC enfriado a (4-5°C) y en agitación lenta se le agregó sulfato de amonio, hasta obtener una concentración final del 40%. La extracción se mantuvo en refrigeración y agitación durante toda la noche. Horas después se centrifugó a 4000 rpm durante 3 minutos y el paquete se suspendió en 5 mL de agua, fue congelado y liofilizado. Se estimó el rendimiento con respecto al volumen del medio y se expresó en g/L.

Semipurificación de los extractos crudos

A una parte de los extractos crudos obtenidos de los diferentes métodos de extracción se le agregó metanol puro y la fracción metanólica obtenida fue transferida a otro vial, previamente pesado, para determinar el rendimiento de los extractos semipurificados.

Ensayo de la actividad biosurfactante: técnica de la gota colapsada (GC).

Tres tapas de microplacas de poliestireno (12.7 x 8.5 cm) de 96 micropozos fueron lavadas tres veces con agua caliente, etanol 96% y agua destilada, y se dejaron secar. Posteriormente a cada placa se le depositó 2 µL de aceite mineral y se dejó reposar durante 24 horas con la finalidad de que el aceite se expanda de manera homogénea sobre la superficie de los pozos. Transcurrido el tiempo de estabilización, se añadieron 5 µL de los extractos crudos y semipurificados a una concentración de 1mg/100 µL, control positivo dodecil sulfato de sodio (SDS) a 1.84 mg/mL y control negativo DMSO-SS (50/50 v/v). El ensayo se realizó tres veces por quintuplicado. Se observó en las microplacas después de un minuto de aplicar los extractos, la forma y el tamaño de la gota, la cual se midió con un vernier al microscopio estereoscópico. El aumento de la gota mayor a 1 mm con respecto al

control negativo se consideró con actividad biosurfactante (Youssef et al., 2004).

Purificación del extracto semipurificado mediante cromatografía de capa fina Preparativa

El extracto semipurificado se disolvió en metanol hasta obtener una concentración del 5% y se aplicó 250 μL en toda la placa. La placa se eluyó con el sistema $n\text{BuOH}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (3:2:1), se dejó secar y posteriormente se raspó la sílica gel en la zona del R_f donde se observó actividad hemolítica. Todo el raspado se depositó en un vaso de precipitado con 50 mL de cloroformo: metanol ($\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$), 2:1, y se dejó en agitación en este sistema de disolventes para la extracción de los metabolitos de la sílica. La mezcla se filtró para separar la sílica y el solvente se concentró a presión reducida con rotaevaporador. El exceso del solvente se dejó secar y se determinó su rendimiento que se expresó en mg/mL (Satpute et al., 2010).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria por el método de microdilución

Para este ensayo se obtuvo una suspensión de conidios a 3.5×10^5 conidios/mL de *C. gloeosporioides* (ATCC 42374) en medio RPMI 1640 con L-glutamina, sin bicarbonato y suplementado con 165 mM de ácido 3-(n-morfolino)-propanosulfónico (MOPS) y se ajustó a pH 7.0. El ensayo se realizó en microplaca estéril de 96 pozos.

Las fracciones semipurificadas se disolvieron en DMSO-SS a una concentración final de 4 mg/mL . Fueron transferidos 10 μL (40 μg) al primer pozo que previamente contenía 190 μL del medio RPMI 1640, se mezcló cuidadosamente hasta obtener una suspensión homogénea y se transfirió 100 μL al siguiente pozo que contenía 100 μL del medio RPMI 1640, y así sucesivamente hasta el pozo 12. De esta manera, se obtuvieron las diluciones dobles seriadas. Después, todos los pozos se inocularon con 100 μL de la suspensión de conidios. El ensayo se realizó por triplicado y la microplaca se incubó a 25°C durante 48 horas.

RESULTADOS

En este trabajo de investigación se usaron 2 metodologías de extracción de biosurfactantes: extracción ácida y con sulfato de amonio. Estas técnicas permitieron establecer que la extracción con sulfato de amonio fue el que extrajo la mayor cantidad de biosurfactantes con un rendimiento de 3.1243 g/L en comparación con los métodos de precipitación ácida (0.3173 g/L)

La confirmación de la naturaleza surfactante de cada extracto se realizó mediante el ensayo de la gota colapsada observándose un incremento de la gota en los extractos semipurificados como se visualizan en la Figura 1 y hemólisis (Dehghan-Noudeh et al., 2005; Youssef et al., 2004).

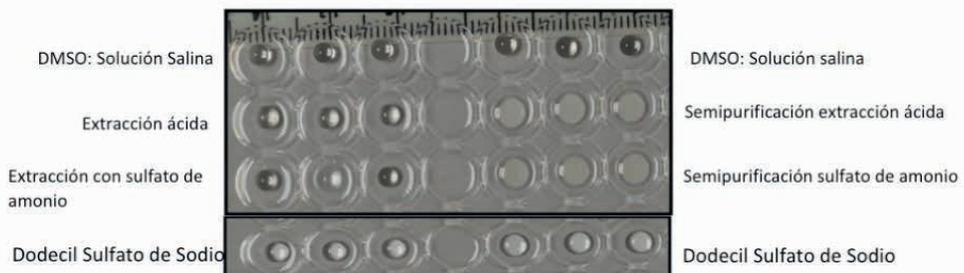


Figura 1 Actividad biosurfactante de los extractos crudos y semipurificados.

La determinación de los metabolitos activos se determinó mediante cromatografía de capa fina y bioautografía hemolítica esta metodología permitió localizar a las 12 horas de incubación el R_f que corresponde a las zonas con actividad hemolítica de los extractos. Simultáneamente a este ensayo, se corrió otra placa para revelar con ninhidrina la cual evidenció la presencia de péptidos, además de sulfato cúprico en ácido fosfórico para revelar la presencia de lípidos (Figura 2). De esta manera se pudo comparar, que la actividad hemolítica corresponde al mismo R_f , donde se revela la naturaleza lipopeptídica del biosurfactante de los extractos purificados.

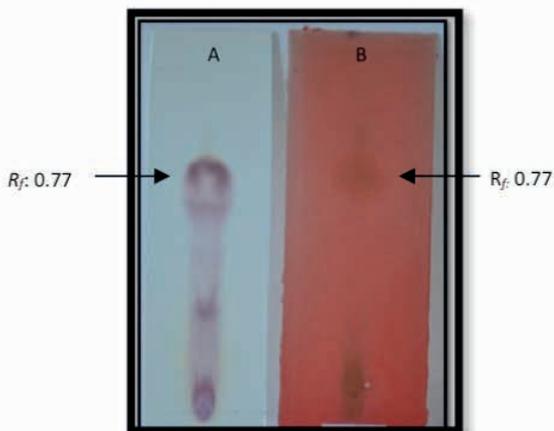


Figura 2 Selección de la zona para purificación por CCFP:(A) revelado con ninhidrina y (B) CCF-BH.

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y observación en microscopio invertido e interpretación mediante la escala numérica de la NCCLS mostraron los siguientes resultados: Ninguna de las concentraciones evaluadas del extracto TJSA inhibieron el crecimiento del hongo, por lo tanto, la CMI corresponde a un valor superior a $100 \mu\text{g/mL}$. Estos valores altos pueden estar asociados a la presencia de impurezas presentes en el extracto crudo. Esto se hizo evidente cuando se evaluó el extracto crudo, ya que no se observó germinación de los conidios de *C. glosesporioides* ATCC 42327 a una

concentración de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos resultados, demuestran la sensibilidad que presenta este patógeno contra este antifúngico.

Como conclusiones podemos mencionar que se determinó como método óptimo para la extracción del biosurfactante producido por la *B. mojavensis* fue el de precipitación con sulfato de amonio al 40%, el biosurfactante es de naturaleza lipopéptica y el metanol resultó fue un adecuado solvente para la semipurificación ya que el lipopéptico se mantuvo en esta fracción aumentando la actividad hemolítica y antifúngica. Después de sucesivas purificaciones el rendimiento total obtenido mediante cromatografía de capa fina preparativa fue de 92.5 mg/Ly la concentración mínima inhibitoria del extracto purificado fue de 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ contra *C. gloeosporioides*.

REFERENCIAS

Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology, 87: 427-444.

Dehghan-Noudeh G, Housaindokht M, Fazly Bazzaz BS (2005) Isolation, characterization, and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactante produced by Bacillus subtilis ATCC 6633. The Journal of Microbiology, 3: 272-276.

Desai JD, Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 61: 47-64.

Durán-Reyes D (2010) Evaluación y caracterización de un biosurfactante producido por Bacillus mojavensis con actividad antifúngica contra Colletotrichum gloeosporioides. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Campeche. pp. 73.

Ekambaram G, Palanisamy P, Natchimuthu K, Sunita V, Mukesh K, Balasubramani R (2022) Biosurfactants: potential and eco-friendly material for sustainable agriculture and environmental safety -a review. Agronomy, 12: 1-35.

Mordor Intelligence (Mercado de Surfactantes Especiales: crecimiento, tendencias, impacto de Covid 19 y pronósticos 2022-2027). <https://www.mordorintelligence.com/es/industry-reports/specialty-surfactants-market>.

Nawazish A, Zhengjun P, Fenghuan W, Baocai X, Hesham R (2022). Lipopeptide biosurfactants from Bacillus spp: yypes, production, biological activities, and applications in food. Journal of Food Quality, 2022:1-19.

Ongena M, Jacques P (2007) Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends in Microbiology, 16: 115-125.

Perfumo A, Smyth TJP, Marchant R, Banat IM (2010) Production and roles of a biosurfactant and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates En: Timmis KN, (Ed), Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Northern Ireland, UK, pp. 1502-1512.

Reznik GO, Vishwanath P, Pynn MA, Sitnik JM, Todd JJ, Wu J, Jiang Y, Keenan BG, Castle AB, Haskell RF, Smith TF, Somasundaran P, Jarrell KA (2010) Use of sustainable chemistry to produce an acyl amino acid surfactant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86: 1387-1397.

Sarubbo LA, Silva M de G, Durval IJ, Bezerra KG, Ribeiro B, Silva I, Twigg MS, Banat IM (2022) Biosurfactants: production, properties, applications, trends, and general perspectives. *Biochemical Engineering Journal*, 181. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108377>.

Satpute SK, Banat IM, Dhakephalkar PK, Banpurkar AG, Chopade BA (2010) Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnology Advances*, 28: 436-450.

Smyth TJP, Perfumo A, McClean S, Marchant R, Banat IM (2010) Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants. En: Timmis KN, (Ed), *Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Northern Ireland, UK, pp. 3689-3703.

Tapati M, Debashis B (2022) Biosurfactants: the potential green surfactants in the 21st century. *Journal of Advanced Scientific Research*, 13: 97-106.

Youssef NH, Duncan KE, Nagle DP, Savage KN, Knapp RM, McInerney MJ (2004) Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 56: 339-347