

Lipopéptidos producidos por agentes de control biológico del género *Bacillus*: revisión de herramientas analíticas utilizadas para su estudio

Valeria Valenzuela Ruiz¹
Gema Teresa Gálvez Gamboa¹
Eber Daniel Villa Rodríguez^{1,2}
Fannie Isela Parra Cota³
Gustavo Santoyo⁴
Sergio de los Santos-Villalobos^{1§}

¹Instituto Tecnológico de Sonora. 5 de febrero 818 sur, Cd. Obregón, Sonora, México. CP. 85000. (valeriavalenzuelaruiz@gmail.com; gemateresa3@gmail.com). ²Uvex Agro Internacional. Carretera las Bocas km 45, H. Caborca, Sonora, México. (eber.villa.rodriguez@gmail.com). ³Campo Experimental Norman E. Borlaug-INIFAP. Cd. Obregón, Sonora, México. CP. 85000. (parra.fannie@inifap.gob.mx). ⁴Instituto de Investigaciones Químico Biológicas-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México. (gsantoyo@umich.mx).

§Autor para correspondencia: sergio.delossantos@itson.edu.mx.

Resumen

El género *Bacillus* presenta una amplia diversidad metabólica asociada a su prevalencia en diversos ecosistemas. En la actualidad, una de las características más estudiadas de este género bacteriano es su capacidad para disminuir la incidencia de enfermedades en cultivos agrícolas, debido a la represión directa o indirecta del crecimiento de los agentes causales dichas enfermedades. Entre los mecanismos más estudiados en el control biológico de cepas del género *Bacillus* contra agentes fito-patógenos destacan los lipopéptidos, tales como surfactinas, iturinas y fengicinas, los cuales son compuestos de bajo peso molecular con características anfifílicas que proporcionan protección a las plantas tanto en condiciones previas como posteriores a la cosecha. Los lipopéptidos pueden antagonizar directamente a los agentes fito-patógenos y inducir estrategias de resistencia sistémica en las plantas asociadas. Sin embargo, el amplio uso de lipopéptidos en el sector agrícola, farmacéutico, o alimentario depende del desarrollo de procesos analíticos eficientes y económicos para la extracción, identificación, y cuantificación de dichos compuestos bioactivos. Este ensayo presenta un análisis sobre diversos procedimientos analíticos empleados para la extracción, e identificación cualitativa y cuantitativa de estos metabolitos.

Palabras clave: Bacilli, biocontrol, lipopéptidos.

Recibido: enero de 2020

Aceptado: febrero de 2020

Para el año 2050 se pronostica que el sector agrícola necesitará incrementar su productividad entre 70 y 100%, con el fin de satisfacer la demanda de alimentos de la población humana, la cual ascenderá a ~10 mil millones de personas (FAO, 2017). Sin embargo, una de las principales limitantes para el aumento de la producción agrícola es la incidencia de enfermedades en los cultivos provocadas por fito-patógenos, causando una disminución del rendimiento promedio de un 15-25% (Villa-Rodríguez *et al.*, 2016; Gupta *et al.*, 2018; Parra-Cota *et al.*, 2018; Díaz-Rodríguez *et al.*, 2019).

Por lo cual, el uso de plaguicidas en todo el mundo ha aumentado de ~1.3 kg ha⁻¹ a 2.57 kg ha⁻¹ de 1992 a 2016; es decir, 197.69% (García-Gutiérrez *et al.*, 2012; FAO, 2018); sin embargo, sólo el 0.1% alcanzando el objetivo deseado (el cultivo agrícola), donde el volumen restante se moviliza contaminando el ambiente circundante afectando a otros organismos, al ser sustancias químicamente complejas, impactando severamente al medioambiente generando contaminación de suelos y mantos acuíferos, degradación y salinización del suelo, pérdida de biodiversidad y efectos de toxicidad de componentes restantes, degradación química o microbiana, además de generar pérdida de biodiversidad (Gálvez-Gamboa *et al.*, 2018).

Por lo cual, la generación de alternativas agro-biotecnológicas para el control de fito-patógenos es determinante para satisfacer la demanda de alimentos actual y futura de forma sostenible, enfocadas en conservar la fertilidad de los suelos agrícolas, y disminuir potenciales afectaciones hacia el medio ambiente (de los Santos Villalobos *et al.*, 2018; Robles-Montoya *et al.*, 2020).

Mundialmente ha aumentado el interés del sector agrícola por el uso de estrategias de control de fito-patógenos por Agentes de Control Biológico (ACB), particularmente bacterias, como se observa por el aumento exponencial del mercado mundial de los bioplaguicidas, de \$ 800 millones en 2014 a \$ 2.8 mil millones en la actualidad (Villa-Rodríguez *et al.*, 2019), con un incremento estimado de 15% al 20% para el 2020 (Gómez *et al.*, 2018). Los ACB son organismos benéficos, sus genes y productos, como los metabolitos, para reducir los efectos negativos de patógenos de las plantas a través de acciones antagónicas por diferentes mecanismos, incluyendo micoparasitismo, producción de enzimas líticas, inducción de respuesta sistémica de la planta y producción de δ -endotoxinas, sideróforos y lipopéptidos (Robles-Montoya *et al.*, 2019; de los Santos Villalobos *et al.*, 2019; Valenzuela-Ruiz *et al.*, 2019; Villa-Rodríguez *et al.*, 2019).

Lo anterior condujo al estudio de diversas cepas microbianas como ACB, entre las cuales el género *Bacillus* ha sido ampliamente estudiado por su capacidad para esporular, lo cual facilita su producción y almacenaje como bioinoculante por periodos largos de tiempo, además de su abundancia, diversidad y ubicuidad en diversos agro-sistemas (suelo, agua y planta), siendo significativamente mayor su población en comparación a otros géneros microbianos (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018; de los Santos Villalobos *et al.*, 2019; Santoyo *et al.*, 2019).

Adicionalmente, los Bacilli desatacan por sus diversas capacidades metabólicas, al producir metabolitos antimicrobianos antibióticos, enzimas líticas, quitinasas, celulasas, glucanasas, y lipopéptidos (Valenzuela-Aragon *et al.*, 2019). Los lipopéptidos son compuestos de bajo peso molecular con características anfifílicas que proporcionan protección a las plantas tanto en condiciones previas como posteriores a la cosecha, al suprimir directamente el crecimiento de los agentes patógenos o induciendo resistencia sistémica en plantas huésped (Hashem *et al.*, 2019).

Recientemente, Coutte *et al.* (2017) encontraron 263 lipopéptidos diferentes sintetizados por 11 géneros microbianos. Dentro de éstos, *Bacillus* representa el productor más abundante con 98 diferentes lipopéptidos (clasificados en familias), donde en el contexto del biocontrol de enfermedades de plantas, las tres familias de lipopéptidos de *Bacillus*: surfactinas, iturinas y fengycinas son de interés por su actividad antagonista para una amplia gama de fitopatógenos potenciales, incluidas bacterias, hongos y oomicetos (Ongena y Jacques, 2008). El objetivo fue describir críticamente diversos procedimientos analíticos empleados para el estudio (incluyendo la extracción e identificación cualitativa y cuantitativa) de los lipopéptidos producidos por el género *Bacillus*, enfocados en la producción de bioplaguicidas eficientes y sostenibles.

Métodos empleados para la extracción, identificación y purificación de lipopéptidos

Extracción y purificación de lipopéptidos

La extracción y purificación son etapas clave en el estudio y comercialización de lipopéptidos (Coutte *et al.*, 2017). Generalmente, la purificación de estos compuestos inicia a partir de una matriz líquida (ej. el caldo de cultivo donde fue crecida la cepa de *Bacillus*), aunque también se ha reportado su producción en fermentación en estado sólido (Su *et al.*, 2018).

Los métodos de purificación se basan en las propiedades fisicoquímicas de los lipopéptidos (polaridad y peso molecular). Con frecuencia, un único método no resulta suficiente para la purificación de estos compuestos. Por esta razón, es común que la purificación de los lipopéptidos incluya múltiples etapas, aplicando métodos como i) precipitación ácida; ii) uso de solventes orgánicos; iii) ultrafiltración; iv) extracción en fase sólida; y v) cromatografía (Cuadro 1).

Cuadro 1. Métodos de extracción y purificación de lipopéptidos de cepas del género *Bacillus*.

Especie	Método	Descripción	Referencia
<i>B. amyloliquefaciens</i>	Precipitación ácida	Precipitación ácida con HCl a pH 2 durante toda la noche.	Hsieh <i>et al.</i> (2004)
<i>B. subtilis</i>	Precipitación ácida	Precipitación con HCl durante toda la noche, centrifugación, y secado a 70° C	Abdel-Mawgoud <i>et al.</i> (2008)
<i>B. velezensis</i>	Solventes, extracción líquido-líquido	Los metabolitos se aislaron de un cultivo LB líquido cultivado a 28 ° C durante 72 h mediante acetato de etilo	Grady <i>et al.</i> (2019)
<i>B. subtilis</i>	Solventes; extracción líquido-líquido	El sobrenadante obtenido a partir de un cultivo líquido fue mezclado con un volumen (1:1) de acetato de etilo.	Alajlani <i>et al.</i> (2016)
<i>B. mojavensis</i>	Ultrafiltración	Los lipopéptidos purificados se obtuvieron utilizando una membrana de 10-kDa	Hmidet <i>et al.</i> (2017)
<i>B. megaterium</i>	Ultrafiltración	Extractos metabólicos de lipopéptidos fueron purificado utilizando ultrafiltración con un tamaño de poro de 30-kDa	Ma <i>et al.</i> (2016)
<i>B. subtilis</i>	Extracción en fase sólida	Se utilizó una columna C ₁₈ como fase sólida y un gradiente de acetonitrilo como solvente para eluir fracciones de lipopéptidos	Alajlani <i>et al.</i> (2016)

Precipitación ácida

Uno de los métodos más comunes para iniciar la purificación de lipopéptidos es mediante una precipitación ácida, utilizando ácido clorhídrico concentrado (HCl) (Abdel-Mawgoud *et al.*, 2008). Este método consiste en disminuir el pH (~2) del caldo de cultivo en el que se encuentran disueltos estos compuestos. De este modo, las cargas negativas de los lipopéptidos son neutralizadas, disminuyendo su solubilidad en la fase acuosa, lo que resulta en su precipitación (Biniarz *et al.*, 2016).

Una vez que los lipopéptidos precipitan, pueden ser recuperados para posteriores análisis o incluso para ser sometidos a otros pasos de purificación. La precipitación ácida es un método muy efectivo y económico para aislar los lipopéptidos. A pesar de que el uso de este método permite recuperar ~ 97% de los lipopéptidos presentes en el medio de cultivo, su principal desventaja es que no es un método selectivo, ya que otros compuestos (ej. péptidos) pueden coprecipitar con los lipopéptidos, obteniendo purezas por debajo de 60% (Coutte *et al.*, 2017).

Solventes orgánicos

El uso de solventes orgánicos es uno de los métodos más empleados para la extracción y purificación de lipopéptidos. Solventes con diferentes índices de polaridad como cloroformo, metanol, éter de petróleo, acetato de etilo, n-hexano y éter han sido empleados con este propósito (Biniarz *et al.*, 2016). El uso de estos solventes puede ser empleado como un método complementario a la precipitación ácida, por ejemplo, el precipitado obtenido con este método puede ser sometido a una extracción con uno de los solventes mencionados (extracción sólido-líquido). No obstante, la extracción con solventes también puede ser utilizada como un paso inicial en el proceso de purificación, por ejemplo, mediante una extracción líquido-líquido mezclando el medio de cultivo y el solvente orgánico (Alajlani *et al.*, 2016).

Cromatografía y extracción en fase sólida (SPE)

La extracción de los lipopéptidos por métodos como precipitación ácida y uso de solventes, a pesar de presentar alta eficiencia de recuperación, son métodos poco selectivos. La cromatografía y la extracción en fase sólida, del inglés solid phase extraction (SPE) son métodos que permiten obtener un alto grado de pureza. Estos métodos generalmente son empleados en etapas finales de purificación de lipopéptidos (Coutte *et al.*, 2017).

Tanto la cromatografía como la extracción en fase sólida consiste en pasar la mezcla de lipopéptidos a través de una columna, de esta manera los compuestos de interés interactuarán con la fase sólida de la columna (resina), mientras que los compuestos contaminantes no lo harán (Poole, 2003).

Posteriormente, los lipopéptidos que interactuaron con la resina pueden ser recuperados mediante la elución con solventes (ej. metanol, acetato de etilo o acetonitrilo) (Poole, 2003). El éxito en la purificación de lipopéptidos con estos métodos depende principalmente del tipo de resina y la mezcla de solventes. Se ha reportado que la columna C₁₈ es muy eficiente para la adsorción de lipopéptidos, debido al motivo hidrofóbico de estas moléculas (Razafindralambo *et al.*, 1993).

Sin embargo, por la similitud en su estructura y propiedades fisicoquímicas, la purificación de familias específicas de lipopéptidos suele ser proceso complicado. No obstante, esto, se ha logrado con métodos de cromatografía líquida en fase reversa. Por ejemplo, recientemente Luna-Bulbarela *et al.* (2018) logró purificar diferentes isoformas de iturinas -con variantes en la longitud del ácido graso- mediante cromatografía en fase reversa, utilizando una columna C₁₈ como fase estacionaria y un gradiente de acetonitrilo como fase móvil.

Ultrafiltración

La ultrafiltración es un enfoque prometedor para la recuperación de lipopéptidos; sin embargo, los costos de los equipos son altos, lo que limita su uso rutinario (Isa *et al.*, 2007). Los lipopéptidos a concentraciones por encima de su concentración crítica de micelas pueden asociarse para formar estructuras supramoleculares como micelas, las cuales tiene diámetros nominales hasta dos o tres veces más grande que el de una molécula libre (Coutte *et al.*, 2017). Teniendo en cuenta este principio, se han establecido métodos de ultrafiltración enfocados en purificar lipopéptidos en forma de micelas.

La separación de los lipopéptidos por la membrana de filtración depende de su comportamiento de agregación molecular y de su capacidad para formar micelas (Jauregi *et al.*, 2013). Asimismo, el pH y la concentración de lipopéptidos, son factores importantes en la formación de micelas (Sen *et al.*, 2005). Una vez que se han purificado las micelas de lipopéptidos mediante ultrafiltración, es posible desnaturalizarla con el uso de solventes orgánicos como metanol o etanol.

La ultrafiltración ha sido utilizada exitosamente para la purificación de diferentes familias de lipopéptidos. Por ejemplo, en un estudio este método fue utilizado para purificar una mezcla de surfactinas e iturinas utilizando membranas de 10-100 kDa (Jauregi *et al.*, 2013). En general, con este método es posible alcanzar una pureza de lipopéptidos de hasta 95% (Jauregi *et al.*, 2013).

Identificación y cuantificación de lipopéptidos

Los métodos cromatográficos, además de ser utilizados en la purificación de lipopéptidos, son empleados en su identificación y cuantificación. Los métodos que utilizan diferentes variantes de cromatografía han sido establecidos para el análisis de lipopéptidos, incluyendo: cromatografía en capa fina, del inglés thin layer chromatography (TLC) y cromatografía de líquidos de alta resolución, del inglés high resolution liquid chromatography (HPLC) (Kinsella *et al.*, 2009; Jamshidi-Aidji *et al.*, 2019).

Debido a lo versátil de la cromatografía para el análisis de lipopéptidos -permitiendo su purificación, identificación y cuantificación- esta herramienta analítica ha sido la más utilizada en el procesamiento de lipopéptidos. No obstante, existen otros métodos espectroscópicos que han sido empleados para el análisis de estos compuestos, como i) la resonancia magnética nuclear, del inglés nuclear magnetic resonance (NMR) (Son *et al.*, 2016), transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier, del inglés fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) (Kong, 2007) y espectrometría de masas (Ma *et al.*, 2016).

Cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía de capa fina es una técnica cromatográfica muy versátil que puede ser empleada con diferentes propósitos en el análisis de lipopéptidos. Esta técnica consiste en colocar la muestra de interés cerca de un extremo de una placa de aluminio recubierta de una capa fina de un adsorbente (ej. sílica gel, celulosa, óxido de aluminio). La lámina se coloca en una cubeta cerrada que contiene uno o varios disolventes mezclados (fase móvil). A medida que la mezcla de disolventes asciende por capilaridad a través del adsorbente, se produce un reparto diferencial de los compuestos presentes en la muestra (Ciura *et al.*, 2017).

Las muestras migrarán diferencialmente a través de la placa, resultando en valores específicos del factor de retardo (Rf). El éxito en la separación de los compuestos depende del adsorbente (fase estacionaria) y la mezcla de solventes (fase móvil) (Ciura *et al.*, 2017). TLC ha sido empleada para hacer identificación de familias de lipopéptidos (Jamshidi-Aidji *et al.*, 2019). Sin embargo, también resulta en método rápido y sencillo para evaluar la pureza de estos compuestos durante etapas de purificación.

La identificación de lipopéptidos empleando TLC se realiza mediante la comparación del valor Rf entre un estándar de lipopéptidos y la muestra problema. Por ejemplo, Geissler *et al.* (2017) establecieron un método para identificar simultáneamente surfactinas, iturinas y fengicinas en extractos de diferentes cepas de *Bacillus*. En dicho estudio los valores Rf fueron específicos para cada familia de lipopéptidos, utilizando cloroformo/metanol/agua (65:25:4, v/v/v) como fase móvil y sílica gel como fase estacionaria.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) permite separar una mezcla de compuestos y puede ser utilizada para identificar, cuantificar y purificar los compuestos individuales de una mezcla (Malviya *et al.*, 2010). Esta técnica consiste en hacer pasar una mezcla de compuestos - mediante solventes (fase móvil) a altas presiones- a través, de una columna que contiene en su interior una resina (fase estacionaria). Una vez que los compuestos pasan a través de la columna, emiten señales generadas por detectores (detector ultravioleta, de matriz de fotodiodos, de masas, de fluorescencia, etc.) (Malviya *et al.*, 2010).

La HPLC ha ganado popularidad entre las técnicas cromatográficas y actualmente suele ser la principal opción para estudios de los lipopéptidos (Biniarz *et al.*, 2016). Este método permite incluso separar diferentes isoformas de una misma familia de lipopéptidos (ej. variaciones en la longitud del ácido graso o en algún aminoácido).

La identificación de los lipopéptidos con HPLC se realiza mediante una comparación del Rt entre un estándar de lipopéptidos y la muestra problema, mientras que la cuantificación requiere de una curva de calibración utilizando diferentes concentraciones de un estándar (de Souza *et al.*, 2018). En HPLC, la identificación y cuantificación son análisis que se llevan a cabo simultáneamente. Se han desarrollado métodos de HPLC que permiten la cuantificación de las diferentes familias de lipopéptidos (Cuadro 2). Por ejemplo, Yuan *et al.* (2011) optimizaron las condiciones cromatográficas para cuantificar homólogos de iturina A, utilizando la columna Eclipse XDB-C₁₈ como fase estacionaria y un gradiente de acetonitrilo como fase móvil.

Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica que es empleada para la identificación de analitos usando la relación masa-carga (m/z) de compuestos ionizados (Glish *et al.*, 2003). Un espectrómetro de masas es un instrumento que consiste básicamente de dos elementos; i) la fuente de ionización (electrospray, plasma, laser); y ii) uno o más analizadores (TOF, cuadrupolo) (Glish *et al.*, 2003).

Las técnicas de espectrometría de masas más utilizadas para el análisis de lipopéptidos han sido del inglés, matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) y del inglés, electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Métodos de identificación y cuantificación de lipopéptidos de cepas del género *Bacillus*.

Lipopéptidos	Método	Descripción	Referencia
Surfactinas, iturinas, fengicinas	TLC	Se empleó el sistema TLC CAMAG y un gradiente de cloroformo-metanol-agua 65:25:4 (V/V/V) como fase móvil.	Jamshidi-Aidji <i>et al.</i> (2019)
Surfactinas, iturinas y fengicinas	TLC	Se utilizó silica gel como fase estacionaria y una mezcla de cloroformo-metanol-agua 65:25:4 (v/v/v) como fase móvil. La identificación se llevó a cabo comparando valores R_f con estándares comerciales.	Geissler <i>et al.</i> (2017)
Iturina A	HPLC	Se utilizó una columna C_{18} como fase estacionaria y ácido acético (1%)-acetonitrilo 60:40 (v/v) como fase móvil. La cuantificación e identificación se llevó a cabo mediante una curva de calibración y comparación de R_t con un estándar comercial.	Yuan <i>et al.</i> (2011)
Surfactinas, iturinas y fengicinas	HPLC	Se utilizó una columna C_{18} como fase estacionaria. Se utilizaron dos solventes; solvente A (ácido fórmico, 0.1%) y solvente B (acetonitrilo) como fase móvil. La identificación de lipopéptidos se llevó a cabo con un detector de masas (MS) y su cuantificación con una curva de calibración con estándares comerciales.	de Souza <i>et al.</i> (2018)
Surfactina e iturina A	HPLC	Se utilizó una columna C_{18} como fase estacionaria y una mezcla de acetonitrilo: agua como fase móvil. Las concentraciones de la fase móvil variaron según el lipopéptido a cuantificar. La cuantificación e identificación se llevó a cabo mediante una curva de calibración y comparación de R_t con un estándar comercial.	Kinsella <i>et al.</i> (2009)
Surfactinas, iturinas y fengicinas	HPLC-ESI-MS/MS	Se utilizó una columna Zorbax SB-C18 y los solventes A (0.1 % ácido fórmico) y B (acetonitrilo) como fase móvil. La identificación de los compuestos se llevó a cabo examinando espectros MS^2 .	Ma <i>et al.</i> (2016)

Lipopéptidos	Método	Descripción	Referencia
Iturinas	HPLC-ESI-MS/MS	Se utilizó una columna C ₁₈ y los solventes A (0.1 % ácido fórmico) y B (metanol con 0.1 % de ácido fórmico) como fase móvil. La identificación de las iturinas se llevó a cabo examinando espectros MS ² .	Dunlap <i>et al.</i> (2019)
Surfactinas, iturinas y fengicinas	MALDI	Se utilizó ácido dihidroxibenzoico como matriz y se utilizó un rango de detección de masas de 200 a 2000 Da.	Sajitha <i>et al.</i> (2016)
Iturinas	NMR	Utilizando 1D y 2D-NMR se identificaron nuevas variantes de iturinas.	Son <i>et al.</i> (2016)

MALDI es un método de espectrometría de masas que permite la identificación de compuestos sin afectarlos estructuralmente (El-Aneed *et al.*, 2009). En MALDI, la muestra a analizar se cocrystaliza con un compuesto matriz, que típicamente es un ácido orgánico que presenta poca absorción de luz UV. La mezcla se expone posteriormente a radiación láser, lo que resulta en la vaporización del compuesto matriz que lleva adherido al analito.

El compuesto matriz juega un papel clave al absorber fuertemente la energía del láser, causando indirectamente que el analito evapore (Hillenkamp *et al.*, 1991). El compuesto de la matriz también sirve como un donador y aceptor de protones y obliga al analito a ionizarse en forma positiva o negativa. MALDI es especialmente útil para conocer el peso molecular de los lipopéptidos purificados, debido a que estos no sufren cambios estructurales durante la ionización.

No obstante, esta técnica también se ha empleado para conocer el perfil de lipopéptidos de extractos de *Bacillus* (Sajitha *et al.*, 2016). ESI-MS/MS es un método de espectrometría de masas muy completo para hacer identificación de lipopéptidos. Cuando ESI-MS/MS se acopla a HPLC (HPLC-ESI-MS/MS) permite separar, identificar y cuantificar muestras de lipopéptidos de manera simultánea, siendo el instrumento más completo para el análisis de lipopéptidos (Ma *et al.*, 2016). La cuantificación y separación de lipopéptidos con este instrumento tiene el mismo principio que HPLC, ya que esta unidad está acoplada a un espectrómetro de masas.

La identificación de lipopéptidos utilizando HPLC-ESI-MS/MS puede hacerse utilizando estándares de lipopéptidos mediante una comparación entre los valores m/z. Sin embargo, lo realmente útil de utilizar este sistema, es que permite hacer la identificación de lipopéptidos sin el uso de estándares (Dunlap *et al.*, 2019). Esto se logra porque con el sistema HPLC-ESI-MS/MS es posible obtener simultáneamente la masa primaria (MS¹) de un compuesto -generalmente el compuesto intacto en forma de ión- y su masa secundaria (MS²), generada a partir de la fragmentación del compuesto.

La fragmentación del compuesto resulta en un espectro de masas específico para esa molécula, el cual puede ser comparado con una base de datos como Pubchem y Metlin, para hacer la anotación del compuesto (desreplificación). Por ejemplo, con HPLC-ESI-MS/MS se lograron identificar más de 10 homólogos de fengicinas y surfactinas, sin el uso de estándares comerciales (Rangarajan *et al.*, 2014).

Resonancia magnética nuclear (NMR)

La resonancia magnética nuclear (NMR) es una técnica que puede proporcionar información estructural de moléculas en solución con una alta resolución (De Faria *et al.*, 2011). La determinación de estructuras mediante NMR puede dividirse en los siguientes pasos: i) establecer condiciones adecuadas para registrar espectros; ii) medición una serie de 1D (^1H y ^{13}C) o 2D (COSY, TOCSY y ROSY) espectros de NMR; iii) integrar picos cruzados y transformación en límites de distancia superior (calibración); y iv) evaluación de la calidad de la estructura molecular (Biniarz *et al.*, 2016). La NMR es un método que se utiliza para hacer identificación de lipopéptidos.

Esta es una herramienta que permite incluso determinar variantes estructurales en lipopéptidos, como cambios de aminoácidos en el motivo péptidico. Por ejemplo, Volpon *et al.* (2000) determinaron variaciones en el lipopéptido piplostatina utilizando NMR, denominado en consecuencia como piplostatina A y piplostatina B. Con esta herramienta identificaron que estos lipopéptidos difieren en un aminoácido en la posición 6 del motivo peptídico.

Transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR)

La espectroscopía transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) es un método rápido y económico para caracterizar la estructura química de lipopéptidos e identificar los grupos funcionales presentes en estos compuestos (Walker *et al.*, 2009). FT-IR es un método fisicoquímico basado en la medición de las vibraciones de una molécula excitada por la radiación infrarroja (IR) a una longitud de onda específica. A pesar de algunas diferencias en espectros FT-IR entre lipopéptidos y condiciones experimentales, el instrumento FT-IR se utiliza comúnmente en un rango entre aproximadamente 4 000 y 400 cm^{-1} (Kong, 2007).

Este método se utiliza para identificar lipopéptidos a nivel de familias. Por ejemplo, esta técnica fue utilizada exitosamente para identificar surfactinas en *Bacillus circulans*. Esto último se logró mediante la comparación de espectros FT-IR entre un estándar de surfactina y una mezcla de lipopéptidos purificados de *B. circulans* (Son *et al.*, 2010).

Conclusión

En la actualidad, los lipopéptidos producidos por cepas del género *Bacillus* representan una estrategia promisoriosa y sostenible para su utilización como biopesticidas en los agro-sistemas. Lo cual permitirá tanto la protección de los cultivos contra agentes patógenos, con la consecuente disminución del uso de fungicidas sintéticos y los efectos negativos (económicos, ambientales y de salud) asociados a éstos. Sin embargo, el amplio uso de lipopéptidos en el sector agrícola, farmacéutico, alimentario, entre otros, depende del desarrollo de procesos químicos y analíticos para la extracción, identificación, cuantificación y producción de dichos compuestos bioactivos, de forma eficiente y económica.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento otorgado por el CONACYT al proyecto 257246 'Interacción trigo x microorganismos promotores del crecimiento vegetal: identificando genes con potencial agrobiotecnológico'. Además, la beca de maestría otorgada a Valeria Valenzuela Ruíz.

Literatura citada

- Abdel-Mawgoud, A. M.; Aboulwafa, M. M. and Hassouna, N. A-H. 2008. Characterization of Surfactin Produced by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 150(3):289-303. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8153-z>.
- Alajlani, M.; Shiekh, A.; Hasnain, S. and Brantner, A. 2016. Purification of Bioactive Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis* Strain BIA. *Chromatographia.* 79(21-22):1527-1532. <https://doi.org/10.1007/s10337-016-3164-3>.
- Biniarz, P.; Łukaszewicz, M. and Janek, T. 2016. Screening concepts, characterization and structural analysis of microbial-derived bioactive lipopeptides: a review. *Critical Rev. Biotechnol.* 37(3):393-410. <https://doi.org/10.3109/07388551.2016.1163324>.
- Ciura, K.; Dziomba, S.; Nowakowska, J. and Markuszewski, M. J. 2017. Thin layer chromatography in drug discovery process. *J. Chromatogr. A.* 1520:9-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.015>.
- Coutte, F.; Lecouturier, D.; Dimitrov, K.; Guez, J. S.; Delvigne, F.; Dhulster, P. and Jacques, P. 2017. Microbial lipopeptide production and purification bioprocesses, current progress and future challenges. *Biotechnol. J.* 12(7):1-10. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.201600566>.
- De Faria, A. F.; Teodoro-Martinez, D. S.; de Oliveira-Barbosa, G. N.; Gontijo-Vaz, B.; Serrano-Silva, I.; Simone-García, J.; Rogério-Tótola, M.; Eberlin, M. N.; Grossman, M.; Luiz Alves, O. and Durrant, L. R. 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 Biochem.* 46(10):1951-1957. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.07.001>.
- de los Santos-Villalobos, S.; Parra-Cota, F. I.; Herrera-Sepúlveda, A.; Valenzuela-Aragón, B. and Estrada-Mora, J.C. 2018. Colección de microorganismos edáficos y endófitos nativos para contribuir a la seguridad alimentaria nacional introducción. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 9(1):191-202. <http://dx.doi.org/10.29312/remexca.v9i1.858>.
- de los Santos Villalobos, S.; Robles, R. I.; Parra Cota, F. I.; Larsen, J.; Lozano, P. and Tiedje, J. M. 2019. *Bacillus cabrialesii* sp. nov., an endophytic plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) in the Yaqui Valley, Mexico. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* 9(1):191-202. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003711>.
- de Souza, C. G.; Martins, F. I. C. C.; Zocolo, G. J.; Figueiredo, J. E. F.; Canuto, K. M. and de Brito, E. S. 2018. Simultaneous quantification of lipopeptide isoforms by UPLC-MS in the fermentation broth from *Bacillus subtilis* CNPMS22. *Anal. Bioanal. Chem.* 410(26):682-736. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1281-6>.
- Díaz-Rodríguez, A.; Parra-Cota, F. I.; Santoyo, G. and de los Santos-Villalobos, S. 2019 Chlorothalonil tolerance of indole producing bacteria associated to wheat (*Triticum turgidum* L.) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *Ecotoxicology.* 28(5):569-577. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02053-x>.

- Dunlap, C. A.; Bowman, M. J. and Rooney, A. P. 2019. Iturinic lipopeptide diversity in the *Bacillus subtilis* species group-important antifungals for plant disease biocontrol applications. *Front Microbiol.* 10:1794. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01794>.
- El-Aneed, A.; Cohen, A. and Banoub, J. 2009. Mass spectrometry, review of the basics: Electrospray, MALDI, and commonly used mass analyzers. *Appl Spectrosc Rev.* 44(3):210-230. <https://doi.org/10.1080/05704920902717872>.
- FAO. 2017. Food and Agriculture Organization. Introduction and overview. In: Bruinsma, J. (Ed.). *World agriculture: towards 2015/2030: A FAO perspective.* 1: 120 Pentonville Road London, N1 9JN, UK: Earthscan Publications Ltd. 1-28 p. <http://www.fao.org/3/a-y4252e.pdf>.
- FAO. 2018. Food and Agriculture Organization (FAOSTAT). Pesticides. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP/visualize>.
- Gálvez-Gamboa, G. T.; Sánchez-Servín, M. R.; Parra-Cota, F.; García-Pereyra, J.; Aviña-Martínez, G. N. and Santos-Villalobos, S. 2018. Pesticides in Mexican agriculture and promissory alternatives for their replacement. *Biológico Agropecuaria Tuxpan.* 7(11):1977-1991.
- García-Gutiérrez, C. and Rodríguez-Meza, G. D. 2012. Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa Ra Ximhai. 8(3):1-10. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=46125177005>.
- Geissler, M.; Oellig, C.; Moss, K.; Schwack, W.; Henkel, M. and Hausmann, R. 2017. 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. Chrom. B.* 1044: 214-224. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.013>.
- Glish, G. L. and Vachet, R. W. 2003. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2(2):140-150. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd1011>.
- Gómez, M.; Alarcón, A.; León, M.; Oehlschlager, C. and Solórzano, L. 2018. Comercialización de agentes de control biológico. In: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria, ed., *Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros*, 2nd ed. Mosquera, Colombia: Alba Marina Cotes. 762-793 pp.
- Grady, E. N.; MacDonald, J.; Ho, M. T.; Weselowski, B.; McDowell, T.; Solomon, O.; Renaud, J. and Yuan, Z. 2019. Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology.* 19(1):5-6. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>.
- Gupta, P. K.; Chand, R.; Vasistha, N. K.; Pandey, S. P.; Kumar, U.; Mishra, V. K. and Joshi, A. K. 2018. Spot blotch disease of wheat: the current status of research on genetics and breeding. *Plant Pathol.* 67(3):508-531. <https://doi.org/10.1111/ppa.12781>.
- Hashem, A.; Tabassum, B. and Fathi Abd_Allah, E. 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi J. Biol. Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>.
- Hillenkamp, F.; Karas, M.; Beavis, R. C. and Chait, B. T. 1991. Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem.* 6324:1193A-1203A. <https://doi.org/10.1021/ac00024a002>.
- Hmidet, N.; Ben Ayed, H.; Jacques, P. and Nasri, M. 2017. Enhancement of surfactin and fengycin production by *Bacillus mojavensis* A21: application for diesel biodegradation. *BioMed Research International.* 1-8 pp. <https://doi.org/10.1155/2017/5893123>.

- Hsieh, F. C.; Li, M. C.; Lin, T. C. and Kao, S. S. 2004. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Curr. Microbiol.* 49(3):186-191. <https://doi.org/10.1007/s00284-0044314-7>.
- Isa, M.; Coraglia, D.; Frazier, R. and Jauregi, P. 2007. Recovery and purification of surfactin from fermentation broth by a two-step ultrafiltration process. *J. Membr. Sci.* 296(1-2):51-57. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2007.03.023>.
- Jamshidi-Aidji, M.; Dimkić, I.; Ristivojević, P.; Stanković, S. and Morlock, G. E. 2019. Effect-directed screening of *Bacillus* lipopeptide extracts via hyphenated high-performance thin-layer chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1605:460366. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460366>.
- Jauregi, P.; Coutte, F.; Catiau, L.; Lecouturier, D. and Jacques, P. 2013. Micelle size characterization of lipopeptides produced by *B. subtilis* and their recovery by the two-step ultrafiltration process. *Sep. Purif. Technol.* 104:175-182. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.11.017>.
- Kinsella, K.; Schulthess, C. P.; Morris, T. F. and Stuart, J. D. 2009. Rapid quantification of *Bacillus subtilis* antibiotics in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 41(2):374-379. <http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.11.019>.
- Kong, J. and Yu, S. 2007. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 39(8):549-559. <https://doi.org/10.11648/j.ajaic.20150101.11>.
- Luna-bulbarela, A.; Tinoco-valencia, R.; Corzo, G.; Kazuma, K; Katsuhiko, K; Galindo, E.; *et al.* Effects of bacillomycin D homologues produced by *Bacillus amyloliquefaciens* 83 on growth and viability of *Colletotrichum gloeosporioides* at different physiological stages. *Biol Control.* 2018. 127:145-54. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.004>.
- Ma, Y.; Kong, Q.; Qin, C.; Chen, Y.; Yujie, C.; Lv, R. and Zhou, G. 2016. Identification of lipopeptides in *Bacillus megaterium* by two-step ultrafiltration and LC-ESI-MS/MS. *AMB Express.* 79(6):1-15. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0252-6>.
- Malviya, R.; Bansal, V.; Pal, O. P. and Sharma, P. K. 2010. High performance liquid chromatography: a short review. *J. Glob. Pharma. Technol.* 2(5):22-26.
- Ongena, M. and Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology.* 16(3):115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>.
- Parra-Cota, F. I.; García-Pereyra, J.; Aviña-Martínez, G. N. and de los Santos-Villalobos, S. 2018. First report of *Fusarium* wilt on *Citrus sinensis* var. Valencia in the Yaqui Valley, Mexico. *Rev. Mex. Fitopatol.* 37(1):193-201. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1810-3>.
- Poole, C. F. 2003. New trends in solid-phase extraction. *TrAC-Trends Anal Chem.* 22(6):362-73. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00605-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00605-8).
- Rangarajan, V.; Dhanarajan, G. and Sen, R. 2014. Improved performance of cross-flow ultrafiltration for the recovery and purification of Ca⁺² conditioned lipopeptides in diafiltration mode of operation. *J. Memb. Sci.* 454(1):436-443.
- Razafindralambo, H.; Paquot, M.; Hbid, C.; Jacques, P.; Destain, J. and Thonart, P. 1993. Purification of antifungal lipopeptides by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 639(1):81-85. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(93\)83091-6](https://doi.org/10.1016/0021-9673(93)83091-6).

- Robles-Montoya, R. I.; Parra-Cota, F. I. and de los Santos-Villalobos, S. 2019. Draft genome sequence of *Bacillus megaterium* TRQ8, a plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. 3 Biotech. 9(1):200-205. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1726-4>.
- Robles-Montoya, R. I.; Chaparro-Encinas, L. A.; Parra-Cota, F. I. and de los Santos-Villalobos, S. 2020. Mejorando rasgos biométricos de plántulas de trigo con la inoculación de un consorcio nativo de *Bacillus*. Rev. Mex. Cienc. Agríc. 11(1):229- 235.
- Sajitha, K. L.; Dev, S. A. and Maria Florence E. J. 2016. Identification and characterization of lipopeptides from *Bacillus subtilis* b1 against sapstain Fungus of rubberwood through MALDI-TOF-MS and RT-PCR. Curr Microbiol. 73(1):46-53. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1025-9>.
- Santoyo, G.; Sánchez-Yáñez, J. M. and de los Santos-Villalobos, S. 2019. Methods for detecting biocontrol and plant growth-promoting traits in Rhizobacteria. ^{ln}: Reinhardt D., Sharma A. (eds) Methods in Rhizosphere Biology Research. 133-149. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-5767-1-8>.
- Sen, R. and Swaminathan, T. 2005. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for small-scale recovery of surfactin. Process Biochem. 40(9):2953-2958. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.01.014>.
- Sivapathasekaran, C.; Das, P. and Mukherjee, S.; *et al.* 2010. Marine bacterium derived lipopeptides: characterization and cytotoxic activity against cancer cell lines. Int. J. Pept. Res. Ther. 16(4):215-222. <https://doi.org/10.1007/s10989-010-9212-1>.
- Son, S.; Ko, S. K.; Jang, M.; Kim, J. W.; Kim, G. S. and Lee, J. K. 2016. New cyclic lipopeptides of the iturin class produced by saltern-derived *Bacillus* sp. KCB14S006. Mar Drugs. 14(4):72-73. <https://doi.org/10.3390/md14040072>.
- Su, Y. T.; Liu, C.; Long, Z.; Ren, H. and Guo, X. H. 2018. Improved Production of Spores and Bioactive Metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* in Solid-state Fermentation by a Rapid Optimization Process. Probiotics Antimicrob. Proteins. 11:921-930. <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9474-z>.
- Valenzuela-Aragon, B.; Parra-Cota, F. I.; Santoyo, G.; Arellano-Wattenbarger, G. L. and de los Santos-Villalobos, S. 2019. Plant-assisted selection: a promising alternative for in vivo identification of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *Durum*) growth promoting bacteria. Plant and Soil. 435(1-2):367-384. <https://doi.org/10.1007/s11104-018-03901-1>.
- Valenzuela-Ruiz, V.; Robles- Montoya, R. I.; Parra-Cota, F. I.; Santoyo, G.; Orozco-Mosqueda, M. C.; Rodríguez- Ramírez, R. and de los Santos-Villalobos, S. 2019. Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* TRQ65, a biological control agent and plant growth promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. 3 Biotech. 9(1):436-442. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1972-5>.
- Villa-Rodríguez, E.; Lugo-Enríquez, C.; de los Santos-Villalobos, S.; Para-Cota, F. I.; Figueroa-López, P. 2016. First report of *Cochliobolus sativus* causing spot blotch on durum wheat (*Triticum durum*) in The Yaqui Valley, Mexico. Plant Dis. 100(11):2329 <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-16-0634-PDN>.
- Villa-Rodríguez, E.; Parra-Cota, F.; Castro-Longoria, E.; López-Cervantes, J. and de los Santos-Villalobos, S. 2019. *Bacillus subtilis* TE3: a promising biological control agent against *Bipolaris sorokiniana*, the causal agent of spot blotch in wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. *durum*). Biol. Control. 132:135-143. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.02.012>.

- Villarreal-Delgado, M. F.; Villa-Rodríguez, E. D.; Cira-Chávez, L. A.; Estrada-Alvarado, M. I.; Parra-Cota, F. I. and De los Santos-Villalobos, S. 2018. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in agricultural biosecurity. Mexican J. Phytopathol. 36(1):95-130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>.
- Volpon, L.; Besson, F. and Lancelin, J. M. 2000. NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A2. FEBS Lett. 485(1):76-80.
- Walker, A. M.; Yu, P.; Christensen, C. R.; Christensen, D. and McKinnon, J. J. 2009. Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of the effects of cereal type and variety within a type of grain on structural makeup in relation to rumen degradation kinetics. J. Agr. Food. Chem. 57(15): 6871–6878. <https://doi.org/10.1021/jf901461u>.
- Yuan, J.; Raza, W.; Huang, Q. and Shen, Q. 2011. Quantification of the antifungal lipopeptide iturin A by high performance liquid chromatography coupled with aqueous two-phase extraction. J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed Life Sci. 879(26):2746-2750. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.07.041>.