

METABOLITOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA PRODUCIDOS POR EL GÉNERO *BACILLUS*

Gabriela Sarti¹

Fecha de recepción: Febrero 2019

Fecha aceptación: Julio 2019

RESUMEN

Bacterias pertenecientes al género *Bacillus* son importantes agentes de control biológico, es decir actúan en el suelo liberando metabolitos que impiden el desarrollo de otros microorganismos que son patógenos para el desarrollo de las plantas, por lo tanto estas bacterias se convierten en una alternativa a la aplicación de agroquímicos. Entre los distintos mecanismos de biocontrol utilizados por *Bacillus subtilis* se encuentran la producción de enzimas extracelulares, la estimulación de las capacidades defensivas de la planta y fundamentalmente la producción de metabolitos secundarios que son en su mayoría lipopéptidos de bajo peso molecular. Estos metabolitos, en base a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas, se los clasifica en tres familias: Surfactinas, Fengycinas e Iturinas. Las surfactinas son poderosos biosurfactantes y estas propiedades estructurales las capacita para actuar como fuertes desestabilizantes de membranas biológicas.

Por otra parte, *Bacillus subtilis* bajo ciertas condiciones de cultivo posee la capacidad de formar un biofilm que la protege frente a condiciones ambientales adversas.

El objetivo de este trabajo fue vincular la producción de metabolitos antifúngicos con la formación de biofilm y el crecimiento, modificando las condiciones de cultivo a través de la variación de la concentración del monómero de ácido L-glutámico y utilizando diferentes fuentes de carbono.

Se realizaron ensayos de antibiosis y se seleccionaron fracciones activas contra los hongos *Fusarium solani* y *Pythium sp.*, con los sobrenadantes bacterianos activos se realizó un barrido espectral. Se estudio la presencia de biosurfactantes mediante la detección de actividad hemolítica e índice de emulsificación. Se optimizó la concentración de la fuente nitrogenada para la obtención de un biofilm.

Conclusiones: *B. subtilis* subsp. *spizizenii* mostró actividad antifúngica contra los fitopatógenos *Fusarium solani* y *Pythium sp.*. Esta actividad se encontró en los extractos acuosos de cultivos en su fase estacionaria tardía de crecimiento y alguno de los metabolitos activos implicados absorben a 300nm.

La mayor actividad antifúngica se obtuvo cuando la concentración de ácido L-glutámico fue 34mM y la fuente carbonada utilizada fue glicerol 1%. Esto sugiere que la síntesis de estos metabolitos fue mayor cuando la bacteria desarrolló en condiciones nutricionales deficitarias utilizando una fuente carbonada de tres carbonos como el glicerol. Bajo esas condiciones nutricionales la bacteria pudo desarrollar un biofilm, esta matriz propiciaría

¹ Profesora adjunta con dedicación exclusiva de la Cátedra de Química Inorgánica y Analítica. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires. Miembro de la carrera de investigadores, según el programa de incentivos a los docentes investigadores, Ministerio de Educación, Secretaría de Políticas Universitarias (Decreto Pen 2427/94) desde 31/12/97, siendo designada con la categoría 4. Resolución 1808. Email: karibu@agro.uba.ar

un ambiente protegido para el crecimiento de la bacteria y para que desarrolle su acción de biocontrol contra los microorganismos patógenos.

B. subtilis subsp. *spizizenii* liberó al medio extracelular sustancias biosurfactantes, la liberación de estas moléculas sería un mecanismo por el cual la bacteria podría ejercer su actividad antifúngica desestabilizando las membranas celulares de los fitopatógenos.

Palabras clave: metabolitos antifúngicos, *Bacillus subtilis*, biosurfactantes

SUMMARY

Bacteria belonging to the Genus *Bacillus* are important biological control agents, that is, they act on soil releasing metabolites that prevent the development of other microorganisms that are pathogens for plant growth, so these bacteria become an alternative for agrochemical use. Among the different biocontrol mechanisms used by *Bacillus subtilis* there is the production of extracellular enzymes, the stimulation of plants defensive capabilities and fundamentally the production of secondary metabolites that are in most cases low molecular weight lipopeptides. These metabolites, based on their biological and physiochemical properties are classified in three groups: Surfactants, Fengycins and Iturins. Surfactants are powerful biosurfactants, their structural properties enable them to perform as a strong biological membrane destabilizer.

Furthermore, *Bacillus subtilis* under certain culture conditions has the ability to form a matrix (biofilm) that protects itself against environmental conditions. The aim of this work was to link the production of anti-fungal metabolites with the formation of biofilm and growth, modifying culture conditions through the variation of acid monomers L-glutamic concentration and the use of different carbon sources.

Conclusions: *Bacillus subtilis* showed antifungal activity against the phytopathogenics *Fusarium solani* and *Pythium sp.* This activity was found in the aqueous culture extracts in its late stationary growth and some of the active metabolites involved absorb 300 nm.

The highest antifungal activity was obtained when the concentration of L-glutamic acid was 34mM and the carbon source used was glycerol 1%. This suggests that the synthesis of these metabolites was greater when the bacteria developed under deficit nutritional conditions using a three-carbon carbon source such as glycerol. Under these nutritional conditions the bacteria could develop a biofilm, this matrix would propitiate a protected environment for the growth of the bacteria and to develop its biocontrol action against the pathogenic microorganisms.

B. subtilis subsp. *spizizenii* released extracellular substances biosurfactantes, the release of these molecules would be a mechanism by which the bacterium could exert its antifungal activity by destabilizing the cell membranes of phytopathogens.

Key words: antifungal metabolites, *Bacillus subtilis*, biosurfactants

INTRODUCCIÓN

El género *Bacillus* es eficiente en el control de fitopatógenos es decir, actúa controlando el desarrollo de otros microorganismos del suelo y este proceso se denomina “Control Biológico” (Bettiol 1991). *Bacillus subtilis* presenta una amplia versatilidad para el desarrollo de mecanismos de biocontrol, entre ellos se encuentran la producción de enzimas extracelulares, la estimulación de las capacidades defensivas de la planta y fundamentalmente la producción de metabolitos secundarios que son en su mayoría lipopéptidos de bajo peso molecular. Estos lipopéptidos cíclicos son producidos mediante un metabolismo no ribosomal, su biosíntesis involucra complejos multienzimáticos llamados péptido-sintetasa (NRPSs) (Menkhau et al., 1993, Stein et al., 1996). En base a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas, se los clasifica en tres familias: Surfactinas, Fengycinas e Iturinas. Estos compuestos se caracterizan por ser anfifílicos y poseer un heptapéptido cíclico de siete aminoácidos (surfactinas e iturinas) o 10 aminoácidos (fengycinas), que se unen a una cadena alquil-hidrófoba (Lang 2002). Las diferentes propiedades estructurales de los lipopéptidos se reflejan en diferentes actividades, esta selectividad de acción se debe principalmente a la naturaleza de los aminoácidos que modulan la amfipaticidad de las moléculas (Deleu et al., 1999). Por otra parte las surfactinas son poderosas biosurfactantes logrando disminuir la tensión superficial, actuando como un excelente detergente, emulsionante y estas propiedades estructurales las capacita para actuar como fuertes desestabilizantes de membranas biológicas (Shen *et al.*, 2010). *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (a través de la liberación de lipopéptidos) constituye una herramienta muy eficaz contra una amplia variedad de patógenos de importancia clínica como así también contra fitopatógenos, de este modo, esta bacteria se convierte en una alternativa a la aplicación de agroquímicos en la agricultura (Corrales *et al.* 2012; Cawoy *et al.* 2011). Si bien estos productos químicos son un instrumento importante en el control de plagas agrícolas; provocan efectos ecotóxicos y son una fuente de exposición a agentes potencialmente tóxicos.

Por otra parte, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, posee la capacidad de formar una película (biofilm) sobre las cuales se desarrolla una comunidad. El biofilm estructuralmente está constituido por masa microbiana, una matriz extracelular formada principalmente por sus exopolisacáridos (EPS), y en menor cantidad proteínas, DNA y productos de lisis bacteriana (Stanley 2005).

El objetivo de este trabajo fue vincular la producción de metabolitos antifúngicos con la formación de biofilm y el crecimiento, modificando las condiciones de cultivo a través de la variación de la concentración del monómero de ácido L-glutámico y utilizando diferentes fuentes de carbono.

MATERIALES Y MÉTODOS

-Los microorganismos fitopatógenos utilizados fueron: *Fusarium solani*, y *Pythium* sp. de la colección de cultivos de la Facultad de Agronomía UBA, estos hongos se desarrollan en diversos cultivos extensivos en nuestro país y son altamente destructivos de dichas

cosechas. La cepa de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* fue obtenida de la colección de cultivos de la Facultad de Agronomía UBA. Argentina.

-Para el crecimiento de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* se utilizó un medio mínimo salino cuya composición fue: (g/l): K_2HPO_4 , 1; KH_2PO_4 , 0,30; NH_4Cl , 0,5; NH_4NO_3 , 0,1; Na_2SO_4 , 0,1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,01; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, $1 \cdot 10^{-3}$; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $1 \cdot 10^{-3}$; $CaCl_2$, $5 \cdot 10^{-4}$; EDTA, 0,01; pH 7. La fuente carbonada fue glucosa (1%) P/V o glicerol (1%) P/V, el crecimiento se desarrolló en medio líquido con agitación a 30°C y 100rpm y también fue crecido en condiciones estáticas utilizando diferentes concentraciones de ácido L-glutámico desde 3,4mM hasta 81mM.

-Los metabolitos se extrajeron con solventes orgánicos (acetato de etilo) y en fase acuosa.

-Se seleccionaron las fracciones activas utilizando un método de difusión del sobrenadante bacteriano en papel de filtro. Para tal fin se utilizó el medio de cultivo sólido agar papa glucosado (APG) sembrando en el centro de una placa de Petri un botón de 0,5cm de diámetro con *Fusarium solani* o *Pythium* sp. y a una distancia de 2,5cm se sembraron círculos de papel de filtro estériles de 0,5cm instilados con 20µl de los sobrenadantes bacterianos libres de células, los cuales fueron previamente centrifugados a 3500g.

- Se realizó un barrido espectral utilizando un espectrofotómetro Mettler Toledo con el sobrenadante libre de células.

- Ensayo de antibiosis: Según la técnica descrita por Tovar (2008) de enfrentamiento dual en medio sólido agar papa glucosado (APG). Se sembró en el centro de una placa de Petri un botón de 0,5cm de diámetro con el fitopatógeno *Pythium* sp. y a una distancia de 2,5cm se realizó una estría de la bacteria a testear. Este procedimiento se realizó por triplicado. El ensayo se incubó a 25°C durante 7 días. Posteriormente se evaluó la inhibición del crecimiento fúngico sobre la placa, la cual se calculó como porcentaje de la reducción del crecimiento del fitopatógeno, se determinó a través del cálculo del área de un segmento circular como indica Castillo (2007).

- Se realizó una evaluación cualitativa de la presencia de biosurfactantes mediante la detección de actividad hemolítica:

Se prepararon placas de agar sangre, mezclando 10 mL de medio mínimo salino con glicerol 1(%) P/V, ácido L-glutámico 35mM, agar 1,5(%) P/V y un volumen de 0,5 mL de sangre bovina obtenida del Laboratorio de la Cátedra de Microbiología Facultad de Ciencias Veterinarias UBA. Se realizó un estriado de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* sobre las placas y se incubó 30 °C durante 48 horas. Sobre la estría se observó desaparición del color rojo característico debido a la lisis de los glóbulos rojos.

Se evidenció la capacidad de esta bacteria para desestabilizar membranas biológicas utilizando placas de agar sangre y visualizando lisis de eritrocitos.

-Determinación del índice de emulsificación (IE):

Método utilizado para la detección de bacterias productoras de biosurfactantes. Se utilizaron tubos de base redonda en los cuales se dispusieron 1,5ml de distintas sustancias hidrofóbicas (queroseno, biodiesel, hexano, octano, tolueno, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de girasol) y 1,5ml de un cultivo líquido de *B. subtilis* subsp. *spizizenii*. El

ensayo se llevó a cabo a temperatura ambiente, los tubos se agitaron en un agitador de alta velocidad durante 1 minuto. Posteriormente las muestras se dejaron reposar durante 24h y se determinó el índice de emulsificación como las medidas del porcentaje de la fase emulsionada (Cooper 1987).

Índice de emulsificación= (Altura de la emulsión/ altura de la fase oleosa) X 100.

-Se cuantificó la producción de biofilm luego de 96h de cultivo a 30°C en condiciones estáticas, el biofilm se extrajo con varilla de vidrio y fue llevado a sequedad a 40°C hasta peso constante.

Todos los ensayos se realizaron por triplicado y se evaluaron en términos de porcentajes aritméticos y desviaciones estándar.

RESULTADOS

Actividad antifúngica del sobrenadante bacteriano desarrollado bajo diferentes fuentes carbonadas y concentraciones del monómero ácido L-glutámico

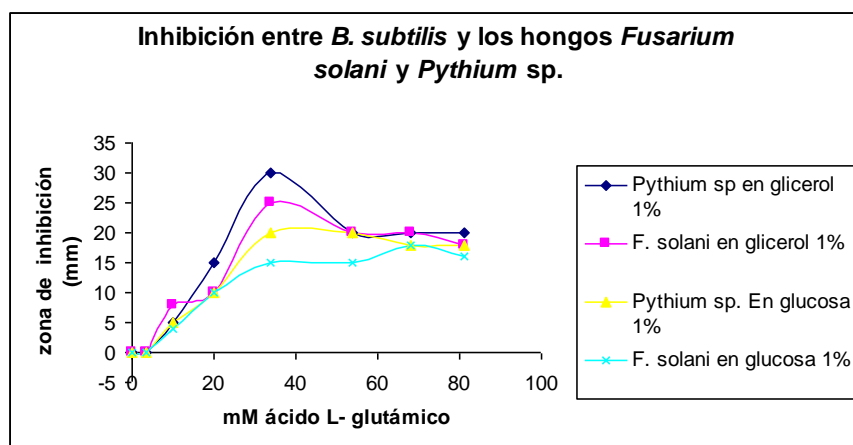


Figura1. Medición (en mm) de la zona de inhibición del desarrollo del micelio fúngico

Para evaluar si la bacteria liberaba metabolitos con actividad antifúngica en ausencia de los fitopatógenos *Fusarium solani* y *Pythium sp.* se trabajó con los sobrenadantes filtrados libres de células de *Bacillus subtilis* crecidas en el medio líquido y se evaluó si la inhibición era producida por algún metabolito soluble.

En los sobrenadantes bacterianos correspondientes a 100h de cultivo (fase estacionaria tardía), se ensayaron extracciones de metabolitos activos en fase acuosa y con acetato de etilo. La fase acuosa fue la que mostró actividad antifúngica.

La mayor actividad inhibitoria del desarrollo de las hifas tanto en *Pythium sp.* como de *Fusarium solani* se obtuvo cuando la bacteria creció utilizando glicerol (1%)P/V como fuente carbonada y ácido L-glutámico 34mM como fuente nitrogenada.



Foto1. Izquierda: crecimiento radial de *Pythium* sp. Derecha: Co-cultivo *B. subtilis* subsp. *spizizenii* y *Pythium* sp.

En el ensayo de antagonismo en vitro “antibiosis” entre *B. subtilis* subsp. *spizizenii* y *Pythium* sp. el porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico fue 50%.

Aislamiento de metabolitos secundarios de los sobrenadantes bacterianos crecidos en glicerol 1% y extraídos en fase acuosa

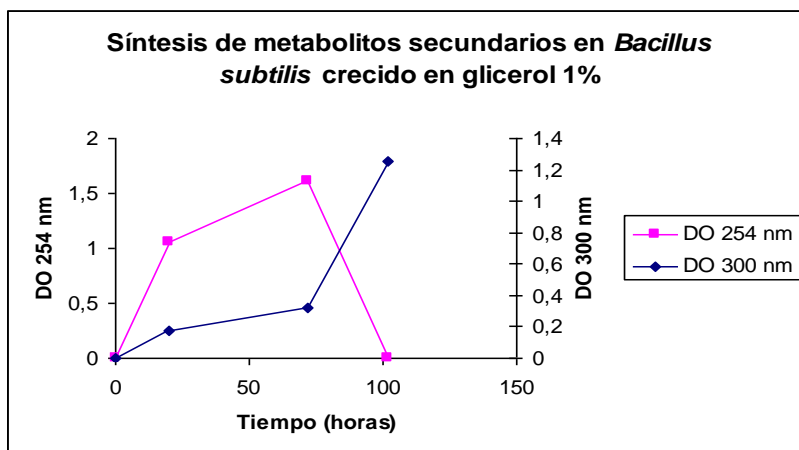


Figura 2. Aislamiento de metabolitos secundarios que absorben a 254nm y 300nm

Cuando *B. subtilis* subsp. *spizizenii* creció utilizando glicerol 1% se obtuvieron dos fracciones que absorben a 254 y 300nm. La fracción que absorbe a 254nm se encuentra entre las 20 y las 72 h de crecimiento y a las 100h no se detecta. El metabolito que absorbe a 300nm mostró la mayor concentración a las 100h (tiempo en el cual finalizó el experimento) y sería el que posee actividad antifúngica (Fig.2).

Formación de biofilm a diferentes concentraciones del monómero ácido L-glutámico

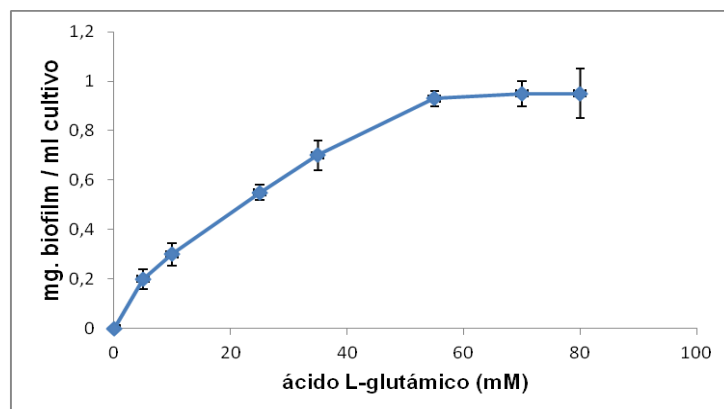


Figura 3. Producción de biofilm a 30°C en condiciones estáticas

Debido a que la mayor actividad inhibitoria contra los hongos fitopatógenos *Fusarium solani* y *Pythium* sp. se registró cuando la bacteria creció en un medio líquido utilizando glicerol 1% P/V como única fuente carbonada (Fig. 1), en este ensayo se evaluó la producción de biofilm en ese mismo medio. Se evidenció la mayor formación de biofilm desde que la concentración del monómero ácido L-glutámico alcanzó el valor de 55mM (Fig.3).

Liberación de metabolitos secundarios desestabilizantes de membranas biológicas

Detección de la actividad hemolítica: Esta prueba es cualitativa para la detección de microorganismos productores de biosurfactantes, se utilizó un medio de cultivo sólido suplementado con 5% de sangre bovina. Una hemólisis que se observó visualmente puede ser indicativa de la lisis celular debido a la ruptura de la membrana, causada por la presencia de sustancias desestabilizadoras de membranas como los biosurfactantes (Shen et al. 2010).

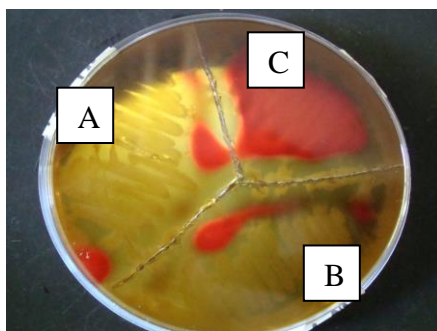


Foto 2. A y B *Bacillus subtilis* crecido en agar suplementado con sangre .C: Agar suplementado con sangre (control negativo)

Cuando *B. subtilis* subsp. *spizizenii* creció en un medio sólido de agar nutritivo suplementado con sangre bovina, se observó un resultado positivo para esta prueba,

debido a la presencia de áreas claras alrededor de la colonia mostrando lisis de glóbulos rojos (Foto 2). Este efecto se relacionó con la liberación de lipopéptidos biosurfactantes por *B. subtilis* subsp. *spizizenii*.

Carrillo (2003) estudió la actividad biológica que posee el lipopéptido surfactina producido por *Bacillus subtilis* S499 para alterar la integridad de vesículas lipídicas como consecuencia de la fuerte interacción entre la surfactina y los fosfolípidos que constituyen la membrana celular. Según Aranda (2005) el biosurfactante iturina producido por *Bacillus subtilis* presenta actividad hemolítica y antifúngica sobre el crecimiento de *Sacharomyces cerevisiae* debido a la formación de poros conductores de iones en la bicapa lipídica de la membrana y este efecto propicia una deformación en la estructura de la membrana por modificación de las vesículas de fosfolípidos.

Según Mulligan (1984), la selección de bacterias productoras de biosurfactantes mediante agar sangre es un método recomendable para la detección preliminar de estos microorganismos, pero no se considera un método definitivo debido a las limitaciones que posee. Este método no es específico ya que algunas enzimas líticas también pueden provocar halos de hemólisis, además no puede utilizarse sustratos hidrofóbicos como fuente carbonada para el crecimiento de la bacteria de tal manera que induzcan la producción de biosurfactantes (Jain *et al.* 1991).

Evaluación de la capacidad emulsificante mediante el índice de emulsificación (IE₂₄) en *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*

Estudio de la variación de Índice de emulsificación con diferentes sustancias hidrofóbicas

Para verificar la presencia de biosurfactantes en el sobrenadante de *B. subtilis* subsp. *spizizenii* se comprobó su actividad emulsificante a través del “índice de emulsificación a las 24 horas” (IE₂₄), éste es uno de los métodos utilizados para la detección de bacterias productoras de biosurfactantes (Ramos *et al.* 2010). En este método se ensayaron sustancias hidrofóbicas que se pusieron en contacto con el sobrenadante de un cultivo líquido de *B. subtilis* subsp. *spizizenii*.

Tabla 1. Índice de emulsificación con diferentes hidrocarburos y aceites de origen vegetal

Hidrocarburos	IE ₂₄ (%) <i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>
Queroseno	48,9 ± 4,1
Biodiesel	49,1 ± 4,0
Hexano	44,7 ± 3,8
Octano	51,3 ± 4,4
Tolueno	48,6 ± 4,0
Aceite oliva	ND

Aceite maíz	ND
Aceite girasol	ND

La bacteria liberó metabolitos que formaron emulsiones estables con los hidrocarburos testeados y biodiesel, no así con los aceites de origen vegetal. Carrasco (2017) en su trabajo con los índices de emulsificación producidos por biosurfactantes sintetizados por *Pseudomona aeruginosa*, encontró que el biosurfactante emulsionó eficazmente el aceite vegetal, no así con diesel.

Los valores más altos de IE para *B. subtilis* subsp. *spizizenii* fueron de 51,3% para octano, 49,1% para biodiesel y 48,9% para queroseno. Abouseou (2007) quien trabajó con *Pseudomona fluorescens* logró incrementar los valores de IE hasta 60% modificando las sales inorgánicas utilizadas como fuente nitrogenada y Rivera (2010) utilizando una mezcla de glicerol (2%) P/V y queroseno 0,05 g/L logró aumentar el IE a más del 70%.

El biosurfactante producido por la bacteria en estudio es un metabolito extracelular ya que el ensayo de IE 24 se realizó con los sobrenadantes libres de células. Bento (2005) en su trabajo con distintas bacterias pertenecientes al Género *Bacillus* encontró que la capacidad emulsificante se debía a moléculas activas propias de la superficie bacteriana.

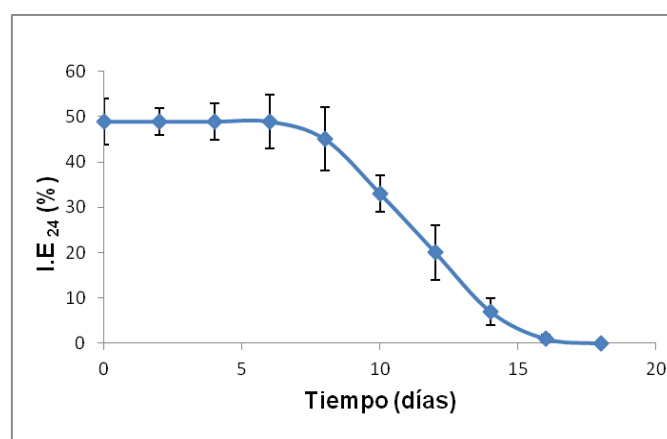


Figura 5. Variación del Índice de emulsificación utilizando queroseno como hidrocarburo durante 18 días

Se verificó la estabilidad de la emulsión formada con la mezcla de sobrenadante bacteriano libre de células y queroseno. Se seleccionó la emulsión con queroseno debido

a que es uno de las sustancias de elección para realizar el método de índice de emulsificación. La emulsión perduró inalterable durante 6 días y luego disminuyó hasta su desaparición a los 16 días. Dependiendo del tipo de bacteria que sintetice el biosurfactante, existe un rango muy amplio con respecto al tiempo en el cual las emulsiones permanecen estables. Benavidez (2017) reportó la síntesis de biosurfactante producido por *Pseudomona aeruginosa* con una disminución abrupta de la emulsión a las 80 horas. Sin embargo, los sobrenadantes obtenidos en medios de cultivo provenientes de distintos aislamientos de *pseudomonas* sp. fueron capaces de emulsionar queroseno y todas las emulsiones permanecieron estables por tres meses a temperatura ambiente Haba (2000).

CONCLUSIONES

La actividad antifúngica se encontró en los extractos acuosos de cultivos en su fase estacionaria tardía (96h de crecimiento) y alguno de los metabolitos secundarios implicados absorben a 300nm.

La mayor actividad antifúngica se obtuvo cuando la concentración de ácido L-glutámico fue 34mM y la fuente carbonada utilizada fue glicerol 1%. Esto sugiere que la síntesis de estos metabolitos fue mayor cuando la bacteria desarrolló en condiciones nutricionales deficitarias utilizando una fuente carbonada de tres carbonos como el glicerol. Bajo esas condiciones nutricionales la bacteria pudo desarrollar un biofilm, esta matriz propiciaría un ambiente protegido para el crecimiento de la bacteria y para que desarrolle su acción de biocontrol contra los microorganismos patógenos.

B. subtilis subsp. *spizizenii* liberó al medio extracelular sustancias biosurfactantes, la liberación de estas moléculas sería un mecanismo por el cual la bacteria podría ejercer su actividad antifúngica desestabilizando las membranas celulares de los fitopatógenos.

BIBLIOGRAFÍA

Aranda, F., Teruel, J., Ortiz, A. (2005). Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1713, 51-56.

Benavidez, A., Ramirez, L. (2017). Producción microbiana de biosurfactantes en lactosuero por *Pseudomona aeruginosa*. Universidad Politécnica de Puebla. México. Recuperado de

<http://repositorio.uppuebla.edu.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/140/art4-VEIP-2017.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Bentoa, F., Camargo, F., Okeke, B., Frankenberger, W. (2005). Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiological Research*, 160, 249-255.

Bettiol, W. (1991). Control biológico de plantas. Embrapa, Brasília DF 388p.

Deleu, M., Razafindralambo, H., Popineau, Y., Jacques, P. (1999). Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids Surf. A Physicochemistry Engineering Aspects*, 152, 3-10.

Carrasco, A., Castillo, M. (2017). Producción microbiana de biosurfactantes en lactosuero por *pseudomonas aeruginosa* Recuperado de

URI: <http://repositorio.uppuebla.edu.mx:8080/xmlui/handle/123456789/140>

Carrillo, C., Teruel, J., Aranda, F., Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica et biophysica acta*, 16, 91-97.

Castillo, C. (2007). Geometría. Recuperado de <https://es.slideshare.net/YoshimarSantana/geometria-carlos-ivorra-castillo>.

Cawoy, H., Bettiol, W., Fickers, P., Ongena, M. (2011). Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management. Edited by Dr. Margarita Stoytcheva. 520p.

Cooper, D., Goldenberg, B. (1987). Surface active agents from two *Bacillus* species. *Applied Environmental Microbiology*, 54, 224-229.

Corrales, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Joya, J., Marquez, K. (2012). Efecto biocontrolador de *Bacillus spp.*, frente a *Fusarium sp.*, bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *Nova. Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*, 10, 63-82.

Jain, D., Thompson, D., Lee, H., Trevors, J. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 13, 271 – 279.

Haba, E., Espuny, M., Busquets, M., Manresa, A. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88, 379–387.

Lang, S. (2002). Biological amphiphiles (microbial surfactants). *Current Opinion Colloid Interface*, 7, 12-20.

Menkhaus, M., Ullrich, C., Kluge, B., Vater, J., Vollenbroich, D., Kamp, R. (1993). Structural and functional organization of the surfactin synthetase multienzyme system. *Biological Journal*, 268, 7678-7684.

Mulligan, C., Cooper, D., Neufeld, R. (1984). Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. *Journal Fermentation Technology* 62(4): 311–314.

Ramos, S., Ruiz, M., Casarrubias, M., Muñoz, J., Chavira, B., Moorillón G. (2010). Selection of biosurfactant bioemulsifier producing bacteria from hydrocarbon contaminated soil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41, 668-675.

Rivera, H., Martínez, E., Osorio, J., Martínez, E. (2010). Respuesta de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas fluorescens* para el control de la gota de la papa *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, bajo condiciones controladas. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 11(1), 21-30.

Shen, H., Thomas, R., Penfold, J., Fragneto, G. (2010). Destruction and solubilization of supported phospholipid bilayers on silica by the biosurfactant surfactin. *Langmuir*, 26 (10), 7334-7342.

Stanley, N., Lazazzera, B. (2005). Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly DL glutamic acid production and biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 57(4), 1143-1158.

Stein, T. (2005). MicroReview *Bacillus subtilis* antibiotics: structure, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56, 845-857.

Tovar Castaño, J.(2008). Evaluación de la capacidad antifúngica in vivo de aislamientos de *Trichoderma* spp. Frente al hongo *Rhizoctonia solani*. Tesis de grado. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis98.pdf>