



Universitat de Lleida

Evaluación de sustancias bioactivas producidas por rizobacterias para el control del fitopatógeno del cultivo de arroz *Burkholderia glumae*

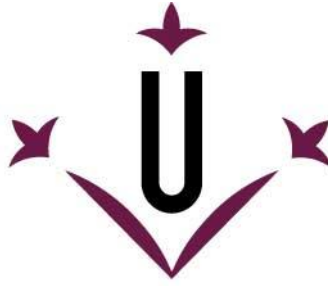
Diego Fernando Oliveros Gómez

<http://hdl.handle.net/10803/688259>

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Lleida

TESI DOCTORAL

**EVALUACIÓN DE SUSTANCIAS BIOACTIVAS
PRODUCIDAS POR RIZOBACTERIAS PARA EL
CONTROL DEL FITOPATÓGENO DEL CULTIVO DE
ARROZ *Burkholderia glumae***

Diego Fernando Oliveros Gómez

Memòria presentada per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida
Programa de Doctorat en (nom del programa)

Directors
Ramon Canela Garayoa
Jonh Jairo Méndez Arteaga

2022

A mi compañera de vida Nathalie, por estar en todos los momentos y ser la fortaleza en los difciles

AGRADECIMIENTOS

A todas las personas que hicieron posible la realización de este trabajo:

A compañeros y amigos que estuvieron presentes en el transcurrir de la elaboración de este trabajo.

Al profesor Ramon Canela, por su valioso aporte en el proceso de formación doctoral. El tiempo y la dedicación brindada fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

Al departamento de química de la Universitat de Lleida, por el apoyo técnico necesario para desarrollar el presente trabajo de tesis doctoral.

Al Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad del Tolima (GIPRONUT), en especial a los profesores Jonh Jairo Méndez Arteaga, Walter Murillo, Gianni Carlos Peñaloza, Luis Oveimar Barbosa y Elizabeth Murillo por acompañarme en el proceso de formación académica y la confianza depositada en mí.

Al profesor Wilson Cardona de la Universidad de Antioquia por el apoyo la realización de experimentos de Resonancia Magnética Nuclear como su estudiante y brindarme toda su colaboración.

A la Gobernación del Tolima, a la Universidad del Tolima y al programa de formación de talento humano de alto nivel para el departamento del Tolima” (Minciencias, convocatoria 755).

ABSTRACT

This doctoral thesis focuses on the search for alternatives for the management of rice crop phytopathogens through the use of rhizobacteria, by obtaining bioactive substances. Initially, strain S13B3, isolated from the rhizosphere of rice crops, was selected for its capacity to generate bioactive extracts with inhibition percentages above 50% against *Burkholderia glumae*. In general, S13B3 showed greater activity in its extracts, emerging as a strain that can respond adequately to changes in culture conditions (substrate) for the generation of bioactive substances. It was observed that disaccharide-type sugars such as maltose generate an increase in the bioactivity of the metabolites produced by S13B3, however, rice flour is a better substrate for the production of bioactive extracts with CI_{50} 1.8 and 1.2 times lower compared to glucose and maltose, respectively, showing the potential of this carbon source to generate bioactive substances. On the other hand, the organic nitrogen sources favored the obtaining of crude extracts with higher activity. the yeast extract with the extracts, which allowed strain S13B3 to generate the crude extracts with higher activity during the tests carried out. Similarly, the *Erythrina edulis* flour showed a similar behavior limiting the in vitro growth of *B. glumae*, generating CI_{50} of 0.27 mg/mL on average.

Subsequently, the optimization process allowed determining that rice flour generates crude extracts with higher activity, represented in small CI_{50} s values, showing a 1.71-fold decrease compared to those obtained before optimization, while yeast extract and *Erythrina edulis* flour increase these values. Finally, an approximation of the metabolites responsible for the bioactivity of the extracts obtained was made using nuclear magnetic resonance (NMR) and high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS) techniques, which allowed establishing that the chemical nature of the majority compound in the bioactive fraction is an indole derivative, where optimization allowed obtaining the ideal conditions for strain S13B3 to generate a greater production of this type of bioactive metabolites. In addition to the above, genomic analysis revealed that strain S13B3 presents a similarity with *Enterobacter cloacae* and genes responsible for the biosynthesis of metabolites associated with the promotion of plant growth, such as

siderophores, tryptophan, as well as phosphate and potassium solubilization, were detected. Similarly, groups of genes associated with the biosynthesis of secondary metabolites such as thiopeptides, non-ribosomal peptides (NRPS), siderophores, aryl polyenes and hybrids of polyketides and non-ribosomal peptides were detected.

In conclusion, this Doctoral Thesis provides a look at the possibilities offered by the microbiota of rice soils and also opens the door to understanding the possible role of substances generated by this type of microorganisms in soil ecology.

RESUMEN

Esta tesis doctoral se centra en la búsqueda de alternativas para el manejo de fitopatógenos del cultivo del arroz mediante el uso de rizobacteria, mediante la obtención de sustancias bioactivas. Inicialmente, se seleccionó la cepa S13B3, aislada de la rizósfera de cultivos de arroz, por su capacidad de generar extractos bioactivos con porcentajes de inhibición por encima del 50% frente a *Burkholderia glumae*. En general S13B3 mostró una mayor actividad en sus extractos, perfilándose como una cepa que puede responder de manera adecuada a los cambios de condiciones de cultivo (sustrato) para la generación de sustancias bioactivas. Se observó que azúcares tipo disacáridos como la maltosa generan un incremento en la bioactividad de los metabolitos producidos por S13B3, sin embargo, la harina de arroz es un mejor sustrato para la producción de extractos bioactivos con CI_{50} 1,8 y 1,2 veces más bajas frente a la glucosa y la maltosa, respectivamente, mostrando el potencial de esta fuente de carbono para generar sustancias bioactivas. Por otra parte, las fuentes de nitrógeno orgánicas favorecieron la obtención de extractos crudos con mayor actividad. el extracto de levadura con los extractos, la cual permitió que la cepa S13B3 generara los extractos crudos con mayor actividad durante los ensayos realizados. Del mismo modo, la harina de chachafruto presentó un comportamiento similar limitando el crecimiento *in vitro* de *B. glumae*, generando CI_{50} de 0,27 mg/mL en promedio.

Sucesivamente, el proceso de optimización permitió determinar que la harina de arroz genera extractos crudos con mayor actividad, representadas en valores de CI_{50} s pequeñas, mostrando una disminución de 1,71 veces comparada con las obtenidas antes de la optimización, mientras que el extracto de levadura y la harina de chachafruto aumentan dichos valores. Finalmente, se realizó una aproximación de los metabolitos responsables de la bioactividad de los extractos obtenidos empleando técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y cromatografía líquida acoplada a masas de alta resolución (HRLC-MS), que permitieron establecer que la naturaleza química del compuesto mayoritario en la fracción bioactiva es un derivado indólico, donde la optimización permitió obtener las condiciones ideales para que la cepa S13B3 genere

una mayor producción de este tipo de metabolitos bioactivos. Sumado a lo anterior, el análisis genómico reveló que la cepa S13B3 presenta una cercanía con la cepa *Enterobacter cloacae* y se detectaron genes responsables de la biosíntesis de metabolitos asociados a la promoción del crecimiento de plantas, tales como sideróforos, triptófano, así como la solubilización de fosfato y potasio. Del mismo modo, se detectaron grupos de genes asociados a la biosíntesis de metabolitos secundarios como tiopéptidos, péptidos no ribosomales (NRPS), sideróforos, polienos de arilo e híbridos de policétidos y péptidos no ribosomales.

En conclusión, esta Tesis Doctoral proporciona una mirada a las posibilidades ofrecidas por la microbiota de suelos arroceros y también abre la puerta para entender el posible rol de las sustancias generadas por este tipo de microorganismos en la ecología del suelo.

RESUM

Aquesta tesi doctoral se centra en la cerca d'alternatives per al maneig de fitopatògens del cultiu de l'arròs mitjançant l'ús de rizobacteri, mitjançant l'obtenció de substàncies bioactives. Inicialment, es va seleccionar la soca S13B3, aïllada de la rizòsfera de cultius d'arròs, per la seva capacitat de generar extractes bioactius amb percentatges d'inhibició per sobre del 50% davant de *Burkholderia glumae*. En general, els extractes de la soca S13B3 varen mostrar la major activitat, perfilant-se com una soca que pot respondre de manera adequada als canvis de condicions de cultiu (substrat) per a la generació de substàncies bioactives. Es va observar que sucres tipus disacàrids com la maltosa generen un increment en la bioactivitat dels metabòlits produïts per S13B3, però, la farina d'arròs és un substrat millor per a la producció d'extractes bioactius amb CI_{50} 1,8 i 1,2 vegades menors que els obtinguts amb glucosa i maltosa, respectivament, mostrant el potencial d'aquesta font de carboni per generar substàncies bioactives. D'altra banda, les fonts de nitrogen orgàniques van afavorir l'obtenció d'extractes crus amb més activitat. Així l'extracte de llevat va permetre que la soca S13B3 generés els extractes crus amb més activitat durant els assaigs realitzats. De la mateixa manera, la farina de *xachafruto* va presentar un comportament similar limitant el creixement in vitro de *B. glumae*, generant CI_{50} de 0,27 mg/mL de mitjana.

Per altra banda, el procés d'optimització va permetre determinar que la farina d'arròs genera extractes crus amb més activitat, representades en valors de CI_{50} petites, mostrant una disminució de 1,71 vegades comparada amb les obtingudes abans de l'optimització, mentre que l'extracte de llevat i la farina de *xafruit* augmenten aquests valors. Finalment, es va realitzar una aproximació als metabòlits responsables de la bioactivitat dels extractes obtinguts emprant tècniques de ressonància magnètica nuclear (RMN) i cromatografia líquida acoblada a masses d'alta resolució (HRLC-MS), que van permetre establir que la naturalesa química del compost majoritari en la fracció bioactiva és un derivat indòlic, on l'optimització va permetre obtenir les condicions ideals perquè la soca S13B3 generi una producció més gran d'aquest tipus de metabòlits bioactius. Sumat a això, l'anàlisi genòmica va revelar que la soca S13B3 presenta una proximitat amb la

soca *Enterobacter cloacae* i es van detectar gens responsables de la biosíntesi de metabòlits associats a la promoció del creixement de plantes, com ara sideròfors, triptòfan, així com la solubilització de fosfat i potassi. De la mateixa manera, es van detectar grups de gens associats a la biosíntesi de metabòlits secundaris com ara tiopèptids, pèptids no ribosomals (NRPS), sideròfors, poliens d'aril i híbrids de policètids i pèptids no ribosomals.

A manera de conclusió, aquesta Tesi Doctoral proporciona informació valuosa sobre les possibilitats ofertes per la microbiota de sòls arrossers i també obre la porta per entendre el possible rol de les substàncies generades per aquest tipus de microorganismes a l'ecologia del sòl.

CONTENIDO

	Pág.
1 INTRODUCCIÓN.....	1
2 MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 RIZÓSFERA.....	6
2.2 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR)...	7
2.3 METABOLITOS SECUNDARIOS DE PGPR	8
2.3.1 Bacteriocinas (Bacteriocins).....	9
2.3.2 Péptidos no ribosomales (Nonribosomal peptides (NRP)).....	11
2.3.3 Policétidos (Polyketides (PKs)).....	15
2.3.4 Compuestos híbridos PKS-NRPs.....	17
2.3.5 Derivados indólicos.	23
2.3.6 Compuesto volátiles bacterianos.....	24
2.4 ESTRATEGIAS PARA OBTENER SUSTANCIAS BIOACTIVAS MICROBIANAS.....	26
2.4.1 Una cepa muchos compuestos (One strain many compounds (OSMAC)).	26
2.4.2 Optimización.....	27
2.4.3 Genome mining.	29
3 METODOLOGÍA.....	33
3.1 MATERIAL BIOLÓGICO	33
3.2 SELECCIÓN PRELIMINAR.....	33
3.2.1 Fermentaciones.....	33
3.2.2 Bioensayos.....	34
3.3 PROCESO DE OPTIMIZACIÓN	35
3.3.1 Fuente de carbono.	35
3.3.2 Fuente de nitrógeno.	35

3.3.3	Selección de condiciones de cultivo.	36
3.3.4	Optimización condiciones de cultivo.	37
3.4	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE EXTRACTO OPTIMIZADO	37
3.4.1	Cromatografía flash.	37
3.4.2	Resonancia magnética nuclear (RMN).	38
3.4.3	Cromatografía líquida de alta resolución (HRLC-MS).....	38
3.5	ANÁLISIS GENÓMICO	39
3.5.1	Secuenciación del genoma, ensamble y anotación.....	39
3.6	PREDICCIÓN DE GENES ASOCIADOS A METABOLITOS SECUNDARIOS	40
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	42
4.1	SELECCIÓN PRELIMINAR.....	42
4.2	PROCESO DE OPTIMIZACIÓN	44
4.2.1	Fuente de carbono.	44
4.2.2	Fuente de nitrógeno.	46
4.2.3	Selección de condiciones de cultivo.	49
4.2.4	Optimización.....	51
4.3	CARACTERIZACIÓN QUÍMICA.....	54
4.3.1	Cromatografía flash.	54
4.3.2	Resonancia magnética nuclear (RMN).	56
4.3.3	Cromatografía líquida de alta resolución (HRLC-MS).....	60
4.4	ANÁLISIS GENÓMICO	62
4.4.1	Anotación del genoma de S13B3.	63
4.5	PREDICCIÓN DE GENES	67
4.5.1	Genes potenciales asociados al crecimiento de las plantas.....	67
4.5.2	Genes potenciales asociados a metabolitos secundarios.	69

5	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA.....	73
	ANEXOS	77
	Anexo A. Análisis estadísticos selección preliminar.....	78
	Anexo B. Análisis estadísticos selección de condiciones de cultivo.	79
	Anexo C. Análisis estadísticos optimización.	81
	Anexo D. Análisis instrumental.....	82
	Anexo E. Análisis genómico.....	83
6	REFERENCIAS	85

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 2-1. Metabolitos de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.	20
Tabla 3-1. Variables seleccionadas para el diseño Plackett–Burman	36
Tabla 4-1. Diseño experimental y resultados del diseño Plackett-Burman (DPB) para CI ₅₀ de extractos crudos de S13B3.	50
Tabla 4-2. Diseño experimental y resultados del diseño Box-Behnken (DBB) para CI ₅₀ de extractos crudos de S13B3.	51
Tabla 4-3. Análisis de varianza del diseño Box-Behnken (DBB).	53
Tabla 4-4. Análisis espectro de resonancia magnética nuclear ¹ H fracción 1 (bioactiva).	56
Tabla 4-5. Genes especiales anotados en el genoma de S13B3.	65
Tabla 4-6. Genes de resistencia a los antimicrobianos.....	66
Tabla 4-7. Genes potencialmente asociados con rasgos promotores del crecimiento vegetal (PGP) en el genoma de <i>E. cloacae</i> S13B3.....	68
Tabla 4-8. Grupos de genes detectados en <i>E. cloacae</i> S13B3.	69

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 2-1. Clasificación de bacteriocinas y sus estructuras.	11
Figura 2-2. Biosíntesis de NRP de un dipeptido.	12
Figura 2-3. Policétido sintasa modular de la pikromicina.	16
Figura 2-4. Biosíntesis de un compuesto híbrido NRPS-PKS (rizoxina).	18
Figura 2-5. Derivados indólicos aislados de bacterias.	23
Figura 2-6. Naturaleza química de algunos compuestos volátiles bacterianos	24
Figura 4-1. Efecto de medios de cultivo en la producción de extractos crudos bioactivos frente a <i>Burkholderia glumae</i>	43
Figura 4-2. Gráfica de efectos principales para el porcentaje de inhibición de extractos crudos bacterianos	43
Figura 4-3. Efecto de la fuente de carbono sobre la actividad de extractos crudo de S13B3 sobre <i>B. glumae</i>	45
Figura 4-4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad de extractos crudo de S13B3 sobre <i>B. glumae</i>	47
Figura 4-5. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para DPB.	50
Figura 4-6. Superficie de respuesta para Cl ₅₀ de extractos crudos de S13B3.	54
Figura 4-7. Cromatografía flash de extractos crudos de S13B3.	55
Figura 4-8. Cromatografías en capa delgada de fracciones del extracto crudo generado por la cepa S13B3.	56
Figura 4-9. Espectro de resonancia magnética nuclear ¹ H fracción 1 (bioactiva).	57
Figura 4-10. Espectro de resonancia magnética nuclear ¹³ C fracción 1 (bioactiva).	58
Figura 4-11. Espectro COSY H-H y sistemas spin resultantes para fracción 1 (bioactiva).	58
Figura 4-12. HSQC. Correlación C – H de fracción 1 (bioactiva)	59
Figura 4-13. HMBC. Correlación C – H a larga distancia de fracción 1 (bioactiva)	59
Figura 4-14. Estructura compuesto mayoritario en la fracción bioactiva 1 (F1).	60

Figura 4-15. Pico basado en la región comprendida entre 118 – 119 m/z. F1 Op: fracción 1 optimizada; F1: fracción 1; F2 Op: fracción 2 optimizada; F2: fracción 2; F3 Op: fracción 3 optimizada; F3: fracción; RE Op: extracto crudo optimizado; RE: extracto crudo.	61
Figura 4-16. Subsistemas anotados en el genoma de la cepa S13B3.	64
Figura 4-17. Distribución de las anotaciones del genoma de S13B3.	65
Figura 4-18. Árbol filogenético de <i>Enterobacter cloacae</i> S13B3.	67
Figura 4-19. Grupos de genes detectados en la secuencia del genoma de <i>E. cloacae</i> S13B3. a. Aerobactina; b. polienos de arilo (aryl polyenes)	69
Figura 4-20. Pico basado en la región comprendida entre 564 – 565 m/z.	71

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-DAPG	2,4-diacetylphloroglucinol
ACC	1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa
ACP	Acyl Carrier Protein
AIA	Ácido indol acético
ANOVA	Analysis of variance
antiSMASH	antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell
AS	Ácido salicílico
BBD	Box-Behnken Design
BGC	Biosynthetic gene clusters
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CCD	Central Composite Design
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COSY	COrelated Spectroscopy
ESI	Electrospray Ionization
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
H.A.	Harina de arroz
H.Cha	Harina de chachafruto
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High-performance liquid chromatography
HRLC-MS	High Resolution Liquid Chromatograph Mass Spectrometer
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy
LB	Luria broth
LC	Liquid chromatography
MS	Mass spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NRPs	Nonribosomal Peptides
NRPSs	Nonribosomal Peptide Synthetases
OFAT	One-factor-at-a-time

OSMAC	One strain many compounds
PATRIC	Pathosystems Resource Integration Center
PBD	Plakett Burman Design
PCP	Peptidyl Carrier Protein
PGPR	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
PKS	Poliketides
PKs	Polyketides
PKSs	Polyketide synthase
QS	Quorum-sensing
RAST	Rapid Annotation using Subsystem Technology
RiPPs	Ribosomally synthesized and post-translational modified peptides
RMN	Resonancia magnética nuclear
RSI	Resistencia sistémica inducida
RSM	Response surface methodology
TLC	Thin-layer chromatography
TOF	Time-of-Flight
UV/VIS	Ultraviolet–visible
VOCs	Volatile Organic Compounds
Y.E.	xtracto de levadura

1 INTRODUCCIÓN

En Colombia el cultivo de arroz es el tercer producto agrícola en extensión, detrás del café y el maíz (Chica, Tirado, & Barreto, 2016; Espinal, Martínez, & Ortiz, 2005); es un reglón importante en la producción agrícola nacional y un generador de empleo en el sector rural (Perfetti, Hernández, Leibovich, & Balcázar, 2013). Históricamente el Departamento del Tolima ha sido uno de los principales productores de arroz, con unos rendimientos por encima de la media nacional, siendo la actividad agrícola más importante en la región (Dane - Fedearroz, 2018). No obstante, el inadecuado uso de agroquímicos para el manejo de enfermedades en el cultivo y la presión de selección sobre cepas resistentes se manifiesta en brotes de patógenos por temporadas, afectando este agro-ecosistema y disminuyendo su productividad (Castilla et al., 2010; El Euch et al., 2018; Rais, Shakeel, Hafeez, & Hassan, 2016; Zhou et al., 2012).

Las enfermedades ocasionadas por microorganismos patógenos en el cultivo de arroz se traducen en bajos rendimientos, granos de mala calidad y por consiguiente pérdidas económicas para los agricultores (A. Ali et al., 2009; Chung et al., 2002; Ebbole, 2007; Ham, Melanson, & Rush, 2011; Showkat, Murtaza, Laila, & Ali, 2012; Xiao, Li, Wei, Wu, & Xie, 2010; Zeng, Ji, Ma, Li, & Yang, 2011). Sumado a que los cultivos están muy domesticados, ha favorecido la aparición de patógenos que evolucionan de forma rápida (McDonald & Stukenbrock, 2016) u ocurre un desplazamiento de nicho influido por variaciones climáticas y aplicaciones dirigidas al control del patógeno inicial, generando condiciones para el surgimiento de otro patógeno con una carga de inóculo en el suelo mayor (Echeverri, 2016).

Burkholderia glumae ha emergido como un problema creciente en los últimos años. Este fitopatógeno genera la enfermedad conocida como el añublo bacterial de la panícula del arroz; se caracteriza por síntomas como la pudrición de semillas y plántulas, reducción de peso de granos, vaneamiento de la panícula (Devescovi et al., 2007; Nandakumar et al., 2009). La enfermedad ha causado pérdidas hasta del 75% del rendimiento en

Colombia (Fory et al., 2014), siendo además una “enfermedad silenciosa”, dado que los síntomas se presentan en dos etapas importantes, a nivel de la plántula y hacia el final del ciclo de cultivo en el estadio de la floración y el llenado del grano, pero durante las restantes etapas del cultivo las plantas son asintomáticas y pueden pasar desapercibidas, aun manteniendo un inóculo de la bacteria durante todo el ciclo (Pedraza Herrera, 2016).

En el departamento del Tolima, se han presentado alertas fitosanitarias generadas por *B. glumae*, que condujeron a declarar la cuarentena a predios infectados y extender dicha alerta al resto de predios a nivel nacional (ICA, 2009). Son pocas las moléculas capaces controlar el patógeno, lo que hace que la problemática sea mayor, pues tratamientos a base de ácido oxilínico, han sido restringidos en varios países productores y se han reportado cepas de *B. glumae* resistentes a este compuesto (Zhou-qi, Bo, Guan-lin, Bin, & Shi-wen, 2016). La búsqueda de moléculas que puedan tener un control efectivo sobre este tipo de patógeno genera gran interés y profundizar esfuerzos en la búsqueda de estrategias que puedan ser incluidos dentro programas de manejo integrado, derivaría en alternativas amigables con el ambiente y efectivas en la protección de los cultivos. Una fuente de dichas moléculas podría ser la rizobacterias que han mostrado una gran capacidad de producir metabolitos bioactivos (Ando et al., 2022), que pueden ser empleados para desarrollar productos que aporten en planes de manejo integrado de enfermedades.

Las rizobacterias han mostrado tener un efecto positivo en el crecimiento sobre las plantas y propiciar diferentes eventos como la fijación de nitrógeno, producir fitohormonas, sideróforos, antibióticos, inducir resistencia sistémica, entre otros (Bach & Díaz, 2008; Sierra & Moreno-Sarmiento, 2008; Trujillo, Díaz, Hernández, & Heydrich, 2007). La adaptabilidad de los microorganismos es bien conocida, así como su capacidad para producir una gran diversidad de sustancias bioactivas bajo condiciones de cultivo. Incluso la modificación de estas condiciones se considera como un factor a explotar para la generación de un mayor número de compuestos bioactivos (Bhandari, Nautiyal, & Sharma, 2020). Esas características hacen a las rizobacterias una fuente

promisoria de compuestos con una diversidad química amplia, que puede integrarse en planes de manejo de integrado de plagas.

Diversos estudios han mostrado que variaciones en la fuente de carbono, nitrógeno, sales, agitación, pH, temperatura, entre otros, pueden modular la expresión de genes asociados a la biosíntesis de metabolitos de interés (Ndlovu, Rautenbach, Khan, & Khan, 2017; Podlešny et al., 2017; Ruiz et al., 2010; Strieker, Tanović, & Marahiel, 2010; Wu et al., 2018). Dichas condiciones, podrían desencadenar la activación de rutas metabólicas crípticas o silenciadas dedicadas a la producción de metabolitos que no se han expresado en condiciones de cultivo iniciales (Bertrand et al., 2013; Scherlach & Hertweck, 2006). Aquí, el empleo de herramientas estadísticas como las metodologías de superficie de respuestas, permiten evaluar un número considerable de parámetros y llegar a conclusiones de forma eficiente, consiguiendo vislumbrar qué condiciones de cultivo inciden o desencadenan la biosíntesis de moléculas con diferentes actividades biológicas (Grahovac, Grahovac, Dodić, Bajić, & Balaž, 2014; Sharmila, Nidhi, & Muthukumar, 2013).

2 MARCO TEÓRICO

El suelo es una matriz compleja, heterogénea, que contiene la mayor diversidad microbiana del planeta. Hongos, bacterias, actinomicetos, protozoos y algas son los principales actores en ese mundo bajo nuestros pies. Las bacterias son los organismos más comunes en el suelo, alrededor del 95%, y se conoce que cada gramo de suelo alberga entre 10^8 y 10^9 de células (Glick, 2012). Dentro de ese enorme mundo subterráneo, la rizósfera es descrita como el área alrededor de una raíz de la planta que está habitada por una población única de microorganismos (Hiltner, 1904).

Los microorganismos en la rizósfera se aprovechan de los exudados (metabolitos, iones, polisacáridos, ácidos orgánicos, etc.) liberados por la planta a través de las raíces como nutrientes (Kennedy, 1999). De hecho, las bacterias que se alojan alrededor de las raíces de las plantas son más versátiles para transformar, movilizar y solubilizar los nutrientes en comparación al resto del suelo (bulk soil) (Ahemad & Kibret, 2014; Hayat, Ali, Amara, Khalid, & Ahmed, 2010). Por lo tanto, las bacterias son la fuerza dominante en el reciclaje de los nutrientes del suelo y, por consiguiente, son cruciales para la fertilidad del suelo (Glick, 2012).

Dichas bacterias cercanas a las raíces, son llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), término acuñado por Kloepper and Schroth (1978). Estas bacterias han mostrado tener un efecto positivo en el crecimiento sobre las plantas, además de incrementar sus defensas frente a patógenos. Las PGPR sobresalen en el subgrupo de microorganismos asociados a las plantas, capaces de ofrecer una solución a los problemas ambientales causados por la agricultura intensiva tradicional, y varios autores han informado la eficacia de productos elaborados a partir de estos microorganismos en el control de enfermedades que afectan a cultivos anuales y perennes. Se ha demostrado la actividad antagónica de bacterias de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Erwinia* y *Streptomyces* (Zarandi et al., 2009).

Adicionalmente, estudios realizados con microorganismos del suelo han revelado la capacidad de producir una enorme variedad de sustancias activas, que incluso pueden estar codificados en genes crípticos que puede no expresarse en condiciones de laboratorio (Liang Chen, Shi, Heng, Wang, & Bian, 2019; S.-S. Choi et al., 2018; Z. Li, Song, Yi, & Kuipers, 2020; K. Liu, Newman, McInroy, Hu, & Kloepper, 2017; Scherlach & Hertweck, 2009). Debido a la dinámica del mismo suelo, los microorganismos se ven obligados a disponer de una maquinaria genética capaz de hacer frente a los retos que se puedan presentar, dichos metabolitos juegan un papel importante en la ecología microbiana (Barea, Pozo, Azcon, & Azcon-Aguilar, 2005).

En este sentido, los metabolitos secundarios bacterianos se originan a partir de unas pocas clases de compuestos claramente definidos a través de sus correspondientes vías biosintéticas, pero para cada clase de compuesto, una variación de los componentes básicos, los mecanismos enzimáticos y algunos pasos de ajustes pueden conducir a una variedad extremadamente diversa de estructuras químicas (Tyc, Song, Dickschat, Vos, & Garbeva, 2016). Seguidamente, se hace una corta descripción sobre rol de los microorganismos de la rizósfera y su potencial como generadores de sustancias bioactivas, así como también se resaltan algunos de los principales mecanismos de obtención de dichas sustancias.

2.1 RIZÓSFERA

La rizósfera, es una zona ecológica vital única del suelo, que está altamente enriquecida con nutrientes obtenidos de las raíces de las plantas por medio de la rizodeposición con la ayuda de rizobacterias (Prashar, Kapoor, & Sachdeva, 2014). Lo anterior se atribuye a que las plantas exudan ~5 a ~30% del carbono fijado a través de las raíces, generalmente en forma de compuesto de bajo peso molecular como aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y fenoles; así como compuesto de mayor peso molecular como mucilagos (polisacáridos viscosos) y proteínas. Ésta cantidad varía en función de

la especie vegetal, la edad del cultivo y los factores de estrés biótico y abiótica a la que está sometida (Glick, 2015).

Desde que se definió la rizósfera, el concepto se ha refinado muchas veces para incluir el volumen del suelo influenciado por la raíz y partes de los tejidos de la raíz, así como el suelo que rodea la raíz en el que las propiedades físicas, químicas y biológicas han sido modificadas por el crecimiento y la actividad de la raíz. La rizósfera ha sido ampliamente dividida en tres zonas. La endorrizósfera incluye porciones de la corteza y endodermis, en la que los microbios y cationes que pueden ocupar el "espacio libre" entre las células (espacio apoplástico). El rizoplano es la zona medial directamente adyacente a la raíz incluyendo la epidermis de la raíz y mucílago. La zona más externa es la ectorizósfera que se extiende desde el rizoplano hasta el suelo no rizosférico. Como era de esperar debido a la complejidad y la diversidad de los sistemas de radicales de las plantas, la rizósfera no es una región de tamaño definible o forma, pero en su lugar, se compone de un gradiente en propiedades químicas, biológicas y físicas que cambian tanto radial como longitudinalmente a lo largo de la raíz (Choudhary et al., 2018; McNear Jr, 2013).

2.2 RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL (PGPR)

Las PGPR sobresalen en el subgrupo de microorganismos asociados a plantas, capaces de ofrecer una solución a los problemas ambientales causados por la agricultura intensiva tradicional, y varios autores han informado la eficacia de productos elaborados a partir de estos microorganismos en el control de enfermedades que afectan a cultivos anuales y perennes (Ghyselinck et al., 2013; Granada et al., 2011; Rais et al., 2016; Spence et al., 2014; Zarandi et al., 2009). Gray y Smith (2005) han demostrado que las asociaciones de las PGPR varían en el grado de proximidad bacteriana a la raíz y la intimidad de la asociación. En general, éstas pueden separarse en extracelulares (ePGPR), que existen en la rizósfera, en el rizoplano, o en los espacios entre las células de la corteza de la raíz, e intracelulares (iPGPR), que existen en el interior de las células

de la raíz, generalmente en estructuras nodulares especializadas (Ahemad & Kibret, 2014; Figueiredo, Seldin, de Araujo, & Mariano, 2011).

Las PGPR pueden afectar el crecimiento de las plantas y conferir tolerancia a la salinidad, a la sequía, a metales pesados y resistencia a patógenos por mecanismos directos e indirectos (A. Kumar, Patel, Meena, & Ramteke, 2019). Los mecanismos directos comprenden sustancias sintetizadas por las bacterias que ayudan en la toma de nutrientes del medio. Eventos como la fijación de nitrógeno atmosférico; solubilización de minerales como fósforo, potasio, azufre; mineralización de compuestos orgánicos; producción de sideróforos que secuestran micronutrientes como el hierro y producción de fitohormonas (auxinas, citoquinina, giberilinas, ACC desaminasa) (Ahemad & Kibret, 2014; Liang Chen et al., 2019; Choudhary et al., 2018; Glick, 2015; Gray & Smith, 2005; Solanki et al., 2014). Por otra parte, los mecanismos indirectos involucran la producción de sustancias bioactivas que impiden el crecimiento de microorganismos patógenos que pueden causar daño a la planta. Lo anterior implica la biosíntesis de enzimas líticas como las quitinasas, celulasas, β -1,3-glucanasas, proteasas y lipasas, que degradan la pared celular de hongos fitopatógenos. Los sideróforos generan deficiencia de elementos como el hierro para patógenos. La competencia entre patógenos y no patógenos puede limitar la incidencia y severidad de la enfermedad. Por último, la resistencia sistémica inducida (RSI) que ocurre cuando las plantas activan sus mecanismos de defensa en respuesta a la infección por un patógeno (Ahemad & Kibret, 2014; Glick, 2012, 2015; Gond, Bergen, Torres, & White Jr, 2015; Hayat et al., 2010; H. Li et al., 2017; Melnick, Suárez, Bailey, & Backman, 2011; Singh, Jha, & Jha, 2017). Adicionalmente, la biosíntesis de metabolitos de tipo antibiótico son uno de los mecanismos (indirectos) más efectivos en la proliferación de fitopatógenos (Lucas et al., 2009; Nakkeeran, Fernando, & Siddiqui, 2006; Rais et al., 2016; Shilev, 2013).

2.3 METABOLITOS SECUNDARIOS DE PGPR

Como se ha mencionado anteriormente, la capacidad de las PGPR de generar metabolitos con características antibióticas frente a fitopatógenos, tanto *in vitro* como en

campo, ha sido reconocida por diversos autores (de Oliveira et al., 2011; Lucas et al., 2009; Spago et al., 2014; Yarzabal & Chica, 2019). Sin embargo el rol que estos metabolitos desempeñan no es uno, su función puede ser multipropósito y es evidente que los miembros del suelo rizosférico intercambian compuestos de señal que son eficaces a bajas concentraciones, de modo que se entiende ahora que las exohormonas interorganismos, de hecho, interrelacionadas, desempeñan un papel crucial en el control del crecimiento, la composición y el desarrollo de las plantas, incluidas las de cultivo de las que dependemos como fuentes de alimentos (D. Smith, Praslickova, & Ilangumaran, 2015).

Estos metabolitos tienen una polaridad que los hace solubles en agua. Actúan a distancias más cortas, pero por lo general exhiben más actividades biológicas como toxinas o antibióticos, como consecuencia de su alto grado de funcionalización (Tyc et al., 2016). Entre los grupos de metabolitos producidos por las bacterias se encuentran la bacteriosinas, los péptidos no ribosomales (Nonribosomal Peptides (NRPs)), Policétidos (Poliketides (PKS)), compuestos híbridos PKS-NRPs, entre otros. Asimismo, compuestos volátiles han sido reportados por su efecto como señalizadores y su importancia en la interacción planta-microorganismo (Audrain, Farag, Ryu, & Ghigo, 2015; Tyc et al., 2016).

2.3.1 Bacteriocinas (Bacteriocins).

Son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente, que pueden tener actividad frente a otros microorganismos, bien sean de la misma especie o contra otros géneros (amplio espectro) (Cotter, Hill, & Ross, 2005; Grady, MacDonald, Liu, Richman, & Yuan, 2016).

Se ha planteado la hipótesis que la producción de bacteriocinas es una estrategia para controlar las bacterias competidoras en la búsqueda de nutrientes y el espacio en un nicho ambiental. Por lo tanto, no sorprende que se haya estimado que más del 99% de las bacterias producen al menos una bacteriocina (Riley & Wertz, 2002) que puede ayudarles a influir en la dinámica de la población circundante, tanto a nivel de población

como de comunidad. Muchas bacteriocinas son comúnmente producidas en la rizósfera por las bacterias del suelo y son importantes para la protección de las plantas (Tyc et al., 2016).

A este grupo de metabolitos pertenecen los péptidos sintetizados en el ribosoma y después de la traducción modificados (Ribosomally synthesized and post-translational modified peptides (RiPPs)), son los péptidos activos más estudiados y distribuidos (Z. Li et al., 2020). Investigaciones han mostrado que la PGPR *Pseudomonas chlororaphis* 30-84 genera bacteriocinas de tipo *R-tailocinas*, las cuales permiten a la bacteria ser más competitiva en la colonización de la rizósfera. Los hallazgos sugieren que una pérdida en la producción de alguna de las *R-tailocins* da lugar a una disminución de la persistencia de esta cepa en la rizósfera del trigo cuando compite con la microflora nativa pero no con el suelo no rizosférico (bulk soli) (Dorosky, Pierson, & Pierson, 2018). Adicionalmente, se ha reportado que moléculas como la *Thuricin 17* estimula el crecimiento de plantas dicotiledóneas C3 (soya) y monocotiledóneas C4 (maíz) (K. D. Lee et al., 2009), genera un efecto de antibiosis frente a patógenos, incide en los niveles hormonales de *Arabidopsis* y la soya (aumento del ácido indol acético (AIA) y ácido salicílico (AS)) y causa profundas alteraciones en el proteoma (grandes aumentos de las proteínas relacionadas con la energía) (Subramanian, Souleimanov, & Smith, 2016). Finalmente, con el empleo de metodologías como *genome mining* se han reportado grupos de genes (Biosynthetic gene clusters) de bacteriocinas asociadas a PGPR y el potencial que podrían tener estos organismos en la obtención de nuevas moléculas (Z. Li et al., 2020). En la figura 2-1 se presenta una clasificación de algunas bacteriocinas.

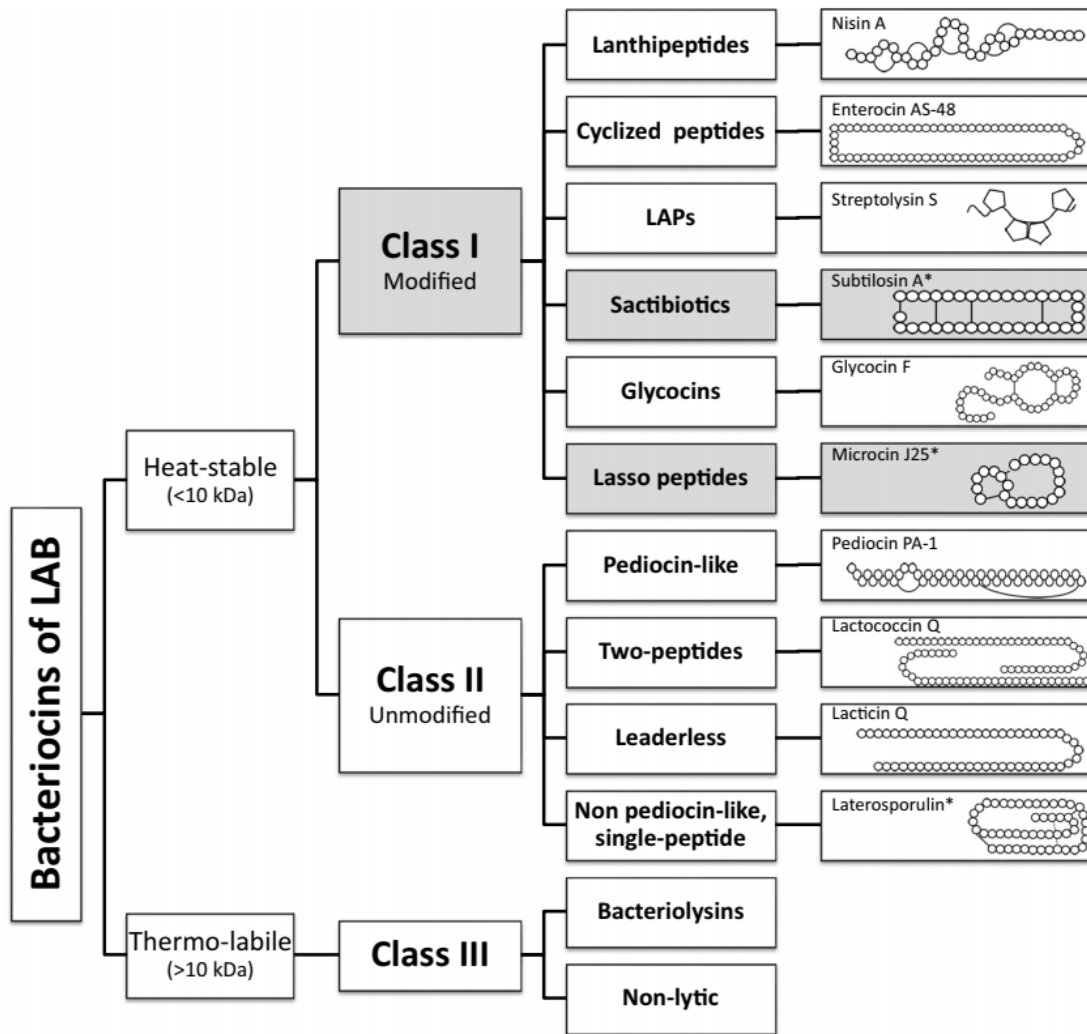


Figura 2-1. Clasificación de bacteriocinas y sus estructuras (Alvarez-Sieiro, Montalbán-López, Mu, & Kuipers, 2016).

2.3.2 Péptidos no ribosomales (Nonribosomal peptides (NRP)).

Los NRP son productos naturales provenientes usualmente de microorganismos como bacterias y hongos, ensamblados por las enzimas no ribosomales sintetases (Nonribosomal Peptide Synthetases NRPSs). Dichas enzimas, a diferencia de los ribosomas, son independientes del ARN mensajero.

Cada enzima no ribosomal sintetasa puede sintetizar solo un tipo de péptido. Los péptidos no ribosomales a menudo tienen estructuras cíclicas y / o ramificadas, pueden contener aminoácidos no proteinógenos que incluyen D-aminoácidos, portan

modificaciones como grupos N-metilo y N-formilo, o están glicosilados, acilados, halogenados o hidroxilados. La construcción de un NRP está ligado al funcionamiento de una NRPSs la cual debe seleccionar, activar y elongar la cadena de la molécula a sintetizar.

Dicha síntesis, sigue la regla de colinealidad en la que para cada módulo de una NRPSs, se requiere un aminoácido individual, de este modo, para la biosíntesis de un heptapéptido se requieren siete módulos (Montavon & Bruner, 2010; Süßmuth & Mainz, 2017). Los propios módulos comprenden dominios de proteínas distintos que albergan los centros catalíticos necesarios para la síntesis de péptidos. A continuación, se señala el paso a paso del mecanismo de acción de la NRPS (figura 2-2).

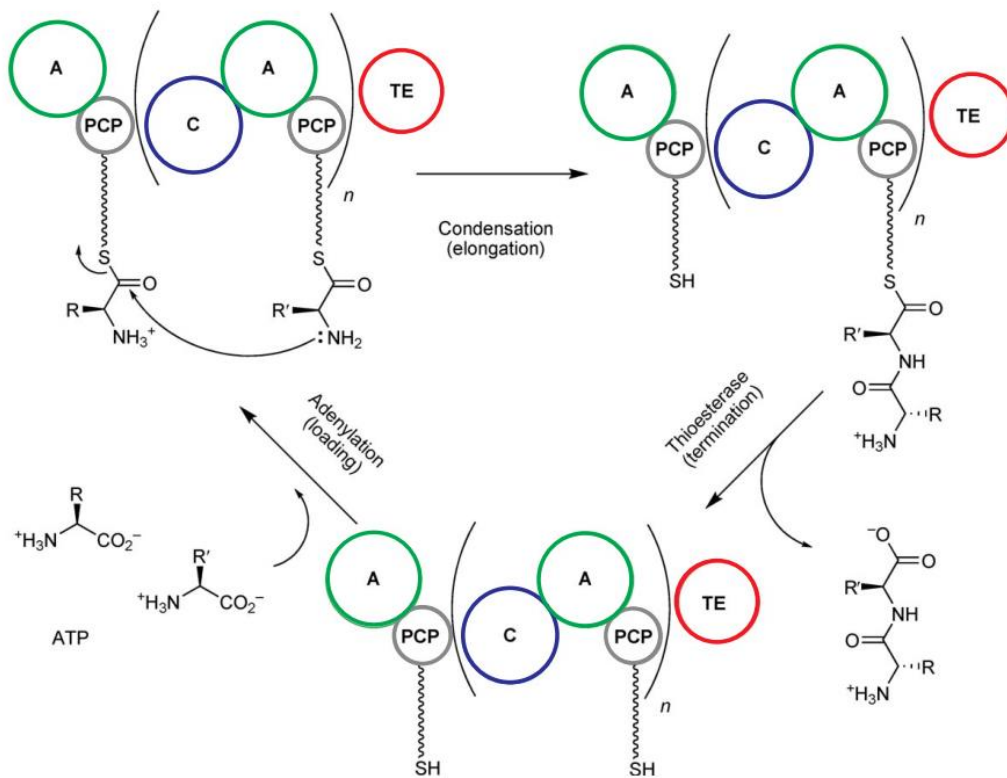


Figura 2-2. Biosíntesis de NRP de un dipeptido (Montavon & Bruner, 2010).

En primer lugar, el dominio de adenilación (**A** (Adenylation)) se encarga de controlar la entrada de sustratos para la síntesis de NRP mediante la selección y activación del aminoácido (carboxilo), dicha activación requiere ATP para ser luego transferido en

forma de adenilato al grupo tiol del dominio de la proteína peptidil portadora (**PCP** (Peptidyl Carrier Protein)), que también es llamado dominio de tiolación (**T** (Thiolation)). La **PCP** representa la unidad de transporte, que permite que los aminoácidos activados y los intermedios de elongación se muevan entre los centros catalíticos (Montavon & Bruner, 2010; Schwarzer, Finking, & Marahiel, 2003). Posteriormente, el aminoácido unido pasa al dominio de condensación (**C** (Condensation)) donde se establece el acoplamiento a la cadena peptídica naciente, generalmente ubicados en el extremo N de un módulo, catalizan la formación de enlaces amida entre dos sustratos. Los dominios de condensación transfieren el aminoácido o péptido desde un dominio de proteína transportadora cadena arriba, al resto amino, del sustrato que se ha cargado previamente en un dominio de proteína transportadora (Miller & Gulick, 2016). Finalmente, al término de la formación del NRP se requiere un dominio adicional que libera la molécula completa, este se denomina dominio tioesterasa (**TE** (Thioesterase)). Donde una vez terminada la síntesis, el dominio **T**, del módulo de terminación, transfiere el péptido maduro al dominio **TE** localizado en el extremo C, el cual cataliza la liberación del péptido de la **NRPS** (Miller & Gulick, 2016; Süssmuth & Mainz, 2017).

Dentro de la gran variedad de metabolitos provenientes de esta ruta biosintética, se destacan dos clases de metabolitos. Por un lado, se encuentran los lipopéptidos, los cuales se les ha reportado una interesante capacidad antimicrobiana, y por otro lado los sideróforos, que tiene un papel sobresaliente en la captación de minerales como el hierro, dejando a este último no disponible para los microorganismos patógenos, pero si para las plantas.

- Lipopéptidos. Son biosintetizados por diversas bacterias, tienen varias funciones, incluida la actividad frente a otros microorganismos (bacterias, hongos y virus); participan en la motilidad bacteriana, el comportamiento de enjambrazón y en la fijación a las superficies (Raaijmakers, de Bruijn, & de Kock, 2006; Raaijmakers, De Bruijn, Nybroe, & Ongena, 2010). El mecanismo de defensa del huésped produce lipopéptidos en respuesta a otros microorganismos. Dos géneros de bacterias, *Bacillus* y *Pseudomonas*, han producido lipopéptidos que se han estudiado de

manera particularmente extensa. Tienen aplicaciones importantes debido a la actividad antibacteriana, antifúngica y antiviral (Hamley, 2015).

Están constituidos por una cola de lípidos con un oligopéptido lineal o cíclico (Raaijmakers et al., 2010). La diversidad estructural de los lipopéptidos se debe a las diferencias en longitud, composición de la cola de ácidos grasos, así como el número, tipo y configuración de los aminoácidos en la parte peptídica. Dentro de sus funciones, estos compuestos exhiben propiedades surfactante, antimicrobiana, antipredación y citotóxica (Raaijmakers & Mazzola, 2012).

Teniendo en cuenta lo anterior, PGPR asociadas al género *Bacillus*, han generado este tipo de metabolitos en su gran mayoría. Se han identificado diversos genes que codifican para la síntesis de surfactina, fengicina y bacilomicina D, los cuales están involucrados en el biocontrol por parte de *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. La bacilomicina D se identificó como el metabolito antifúngico más potente producido *in vitro* por esta cepa (Chowdhury, Hartmann, Gao, & Borriss, 2015). Del mismo modo, Kalai-Grami et al. (2014) detectaron molecularmente genes asociados a NPRPS del grupo de las iturinas, surfactinas, fengicina y bacilomicina D. Adicionalmente, el empleo del secuenciamiento del genoma completo de bacterias promotoras de crecimiento ha demostrado ser una herramienta potente en la búsqueda de nuevos metabolitos. En este sentido, el secuenciamiento del genoma de *Bacillus subtilis* XF-1, reveló que posee genes de la familia de las surfactinas y las fengicinas (Guo et al., 2016).

- Sideróforos. Son metabolitos de bajo peso molecular, hierro-quelantes y son secretados por los microorganismos en condiciones de hierro limitado, solubilizando, transportando y almacenando el hierro (Chu et al., 2010; Hider & Kong, 2010). La producción de sideróforos confiere a los microorganismos productores una ventaja competitiva sobre otras bacterias del medio ambiente, excluyéndolos de su nicho ecológico, adicionalmente las bacterias productoras de sideróforos protegen a las plantas de los fitopatógenos actuando como competidoras, reduciendo la

disponibilidad de hierro necesaria para el crecimiento de los mismos (Beneduzi, Ambrosini, & Passaglia, 2012).

El trabajo realizado por Guo et al. (2016) muestra grupos de genes que codifican la biosíntesis de sideróforos en la PGPR, *Delftia tsuruhatensis* MTQ3, donde al eliminar los tres genes que codifican para NRPSs y obtener los tres mutantes (MTQ3- Δ 1941, MTQ3- Δ 1945, y MTQ3- Δ 1946), éstos, no lograron producir sideróforos al ser comparados con la cepa silvestres (wild- type). Por otro lado, cepas del género *Pseudomonas* se han destacado por generar estas moléculas, un ejemplo se da en menta (*Mentha piperita*), donde al inocular sideróforos producidos por *Pseudomonas putida*, se observa un incremento en el rendimiento de los principales componentes de los aceites esenciales (Santoro, Cappellari, Giordano, & Banchio, 2015). En específico, *Pseudomonas fluorescens*, biosintetiza sideróforos que promueven el crecimiento de las plantas y, además, inhiben el crecimiento de fitopatógenos como *Erwinia carotovora*, *Ralstonia solanacearum*, y *Fusarium oxysporum*. En este sentido, *Pyoverdines* producidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens*, han demostrado ser adecuados para controlar especies de los géneros, *Pythium* y *Fusarium* (Cesa-Luna et al., 2020).

2.3.3 Policétidos (Polyketides (PKs)).

Los policétidos son productos naturales provenientes de un gran número de bacterias de los géneros *Actinobacteria*, *Pseudomonas*, *Myxococcus*, *Bacillus* y *Burkholderia*. Dichos productos son una fuente comprobada de metabolitos secundarios para el tratamiento de enfermedades tanto de humanos y animales, además se han encontrado policétidos con aplicación como agroquímicos, sabores, fragancias, entre otros. De la misma forma, diversos estudios también han mostrado el potencial de estos compuestos en la reducción del colesterol como la estatina, antibióticos como la eritromicina A y antiparasitario como la avermectina (Hertweck, 2009; Till & Race, 2016).

Pese a esa variada actividad que muestra este grupo de metabolitos, su estructura depende de pocos sustratos o bloques de construcción, como son el acetyl-CoA y el

malonil-CoA (Schwarzer & Marahiel, 2001). El mecanismo general de biosíntesis de policétidos comparte grandes similitudes con el de la biosíntesis de ácidos grasos, pero permite una variabilidad mucho mayor de bloques de construcción y modificaciones (reductoras) durante las extensiones de cadena, conduciendo no sólo a cadenas acilo simples, normalmente no ramificadas y completamente reducidas, pero altamente funcionales (Tyc et al., 2016). Para que las reacciones químicas necesarias sucedan es necesario la acción de la enzima policétido sintasa (Polyketide synthase (**PKSs**)), una enzima modular responsable de la incorporación de una unidad de acetato o propionato en la creciente cadena.

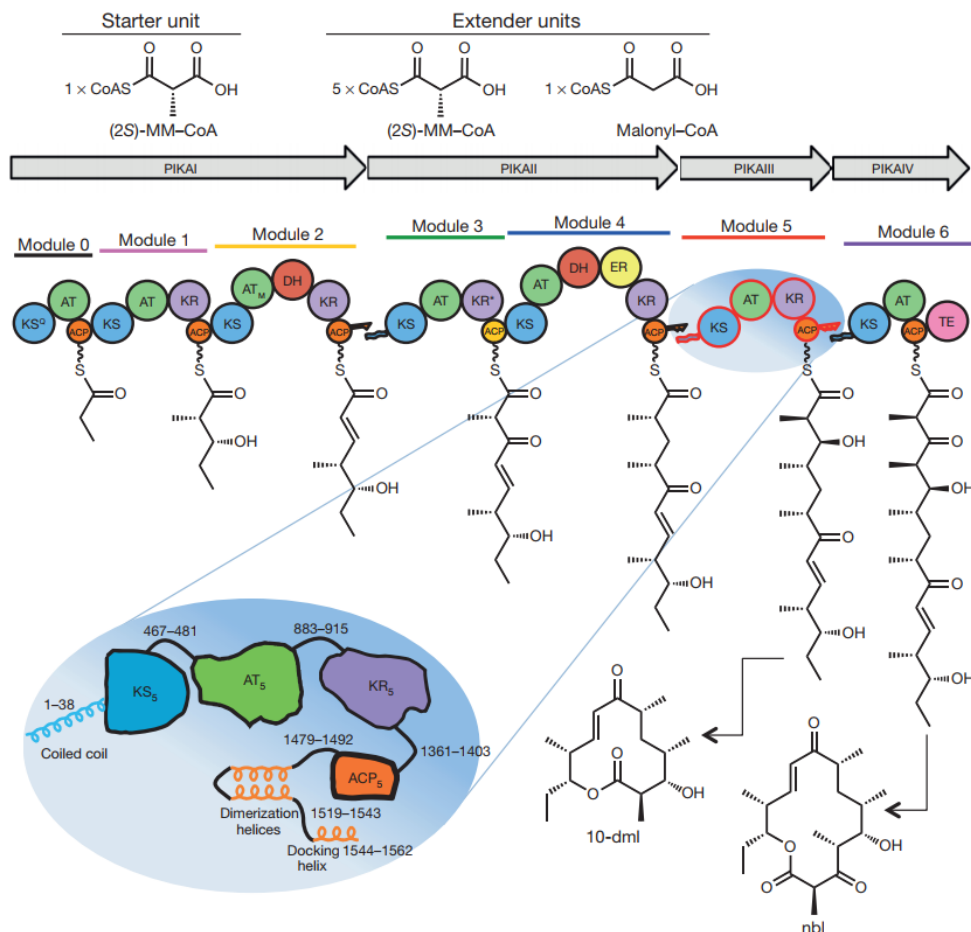


Figura 2-3. Policétido sintasa modular de la pikromicina (Dutta et al., 2014).

Cuatro dominios son esenciales para la formación de los policétidos tal como se aprecia en la figura 2-3. El dominio aciltransferasa (acetyltransferase (**AT**)) es responsable de la

transferencia de bloques de construcción activados al dominio de la proteína portadora de acilo (Acyl Carrier Protein (**ACP**)), también llamado dominio de tiolación (Thiolation (**T**)). En este sentido, al dominio **AT** se puede comparar con el dominio **A** de la **NRPS**, pero este último cumple dos funciones, se encarga de la selección y activación del sustrato. Mientras tanto, el dominio de tiolación de una **PKS** recibe un sustrato activado como malonil o metil malonil-CoA (Schwarzer & Marahiel, 2001). La **ACP** actúa como un sitio de anclaje covalente tanto para la cadena de producto en crecimiento como para las unidades de extensión seleccionadas, siendo semejante al dominio **PCP** en los péptidos norribosomales (Till & Race, 2016). Posteriormente, el dominio cetosintasa (Ketosynthase (**KS**)) cataliza la reacción de elongación (Schaeffers et al., 2016) y finalmente, el dominio tioesterasa (Thioesterase (**TE**)) libera el producto del C-terminal de la **PKS**. Dichos productos se liberan como macrolactonas, después de ciclación de cabeza a cola de la cadena (Dutta et al., 2014).

Uno de los policétidos biosintetizados por PGPR más estudiados, es el 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG)) (Miguel A. Matilla & Krell, 2018). Este compuesto ha mostrado tener potencial antibacteriano, antifúngico, antiviral y antihelmíntico y se ha empleado en el control de enfermedades en cultivos de interés económico (Asadhi et al., 2013; de Souza et al., 2003; Kim, Fuente, Weller, & Thomashow, 2012; Rezzonico et al., 2007; Velusamy, Immanuel, Gnanamanickam, & Thomashow, 2006). Adicionalmente, 2,4-DAPG actúa como señalizador celular sobre algunos organismos benéficos como *Azospirillum* que afectan positivamente a las plantas (Combes-Meynet, Pothier, Moenne-Loccoz, & Prigent-Combaret, 2011).

2.3.4 Compuestos híbridos PKS-NRPs.

Las similitudes estructurales y funcionales entre PKSs y NRPSs, permiten la formación de grupos de genes biosintéticos que contienen elementos de ambas clases de metabolitos.

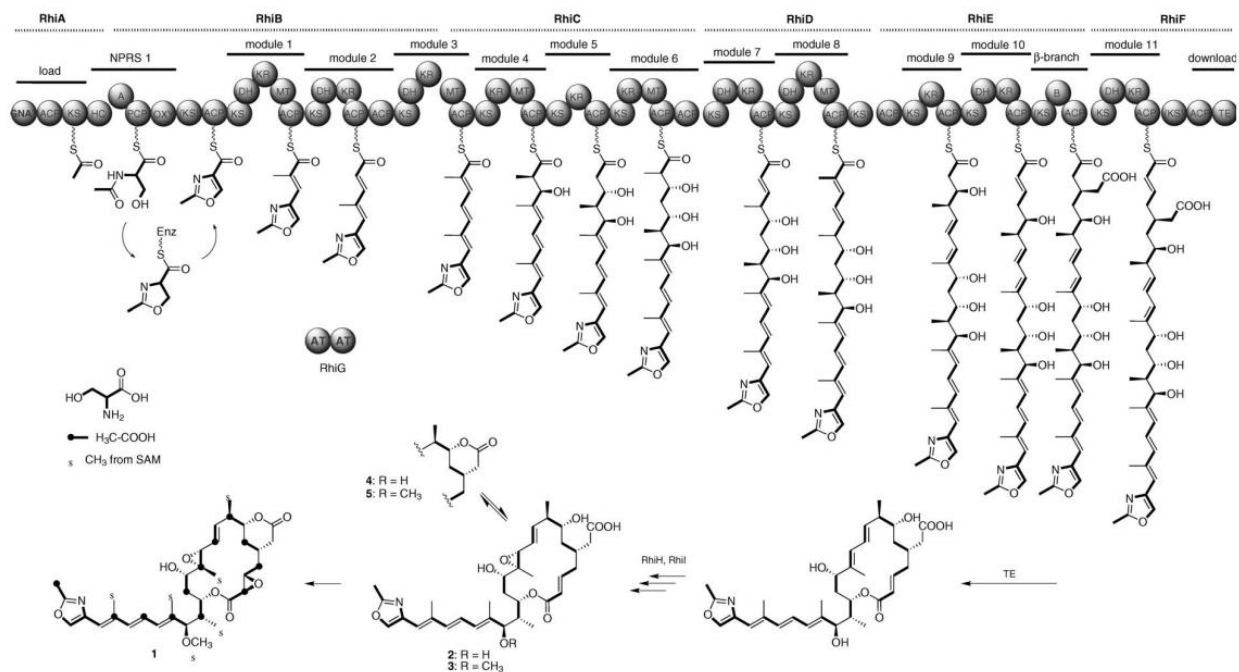


Figura 2-4. Biosíntesis de un compuesto híbrido NRPS-PKS (rizoxina) (Partida-Martinez & Hertweck, 2007).

Estos grupos de genes híbridos NRPS-PKS (Biosynthetic gene clusters (BGCs)) pueden proporcionar más diversidad de posibles metabolitos secundarios producidos por microorganismos. Se han aislado los metabolitos NRPS-PKS híbridos de numerosas bacterias Gram-positivas y Gram-negativas del suelo (Helfrich & Piel, 2016; Hertweck, 2009; Schaefer et al., 2016; Till & Race, 2016). Dichos metabolitos han mostrado tener actividad antiproliferante (Ishida, Lincke, Behnken, & Hertweck, 2010), antibiótica (Seyedsayamdost et al., 2010), antifúngica, anticancer (Esmael, Pupin, Jacques, & Leclère, 2018) y antimotórica (Partida-Martinez & Hertweck, 2007).

Por otra parte, con los avances alcanzados en el campo de la genómica y la bioinformática, se ha obtenido información sobre grupos de genes asociados a PK y NRP, los cuales pueden ser responsables de la generación de nuevos metabolitos y, de esta manera, realizar aproximaciones sobre el rol ecológico que pueden desempeñar dichos metabolitos (Blin et al., 2017; Liang Chen et al., 2019; S.-S. Choi et al., 2018; Guo et al., 2016; Z. Li et al., 2020; Miguel A. Matilla, Nogellova, Morel, Krell, & Salmond, 2016; Miguel A. Matilla, Udaondo, Krell, & Salmond, 2017; H. Wang, Fewer, Holm, Rouhiainen,

& Sivonen, 2014). Lo anterior muestra un panorama alentador para la búsqueda de sustancias bioactivas promisorias que puedan ser útiles en el manejo de enfermedades, así como entender las interacciones en las que participan en el entorno natural. En la tabla 1 se pueden observar diferentes metabolitos obtenidos de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, su función y algunas técnicas empleadas para la identificación.

Tabla 2-1. Metabolitos de rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Clase	Metabolito	Origen	Función	Descubrimiento o Aislamiento	Referencia
Bacteriocina	Pequeña bacteriocina de <i>Rhizobium</i> , N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone	<i>Pseudomonas fluorescens</i> F113	Molécula anteriormente conocida como la pequeña bacteriocina de <i>Rhizobium leguminosarum</i> como consecuencia de sus propiedades inhibitorias del crecimiento. <i>Quorum-sensing</i> .	Extracción de sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria libres de células con diclorometano seguida de HPLC en fase reversa. MS de alta resolución	(Laue et al., 2000)
	Thuricin 17	<i>Bacillus thuringiensis</i> NEB17	Péptido que estimula el crecimiento de varias plantas; reduce la competencia de bacterias estrechamente relacionadas, para ampliar el espacio de nicho disponible promoviendo el crecimiento de las plantas.	Purificado vía HPLC	(K. D. Lee et al., 2009; Subramanian, 2013; Subramanian et al., 2016)
	Plantazolicina	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> or <i>Bacillus velezensis</i> FZB42	Actividad nematocida	LC/TOF-MS con ESI (ESI-TOF-MS); análisis genómico.	(Chowdhury et al., 2015; Z. Liu et al., 2013)
	Carocina D, Zoocina y Colicina E6-1 y Colicina E6-2	<i>Pseudomonas corrugata</i> <i>Pseudomonas mediterranea</i> <i>Pseudomonas brassicacearum</i>		Análisis genómico (<i>Genome mining</i>)	(Trantas et al., 2015)
	R-tailocinas	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> 30-84	La pérdida de producción de una o ambas tailocinas dio lugar a una disminución de la persistencia de <i>P. chlororaphis</i> 30-84 dentro de la rizósfera del trigo cuando compete con la microflora nativa, pero no con el suelo.	Inducción UV; purificación de tailocina; plasmidos y primers	(Dorosky et al., 2018)
Nonribosomal peptide (NRPS)	Surfactina Fengycina	<i>Bacillus subtilis</i> and <i>Bacillus halotolerans</i>	Las bacterias antagonistas produjeron uno o más de los metabolitos antifúngicos	Amplificación de los genes que codifican su producción.	(Chandler et al., 2015; Riaz et al., 2021)

Clase	Metabolito	Origen	Función	Descubrimiento o Aislamiento	Referencia
			Lipopéptidos cíclicos, fengicina y surfactina, en el estado de defensa inducido.		
	Vibrioferina Anfibactinas Crochelina A	<i>Azotobacter chroococcum</i>	La relevancia y las funciones específicas de estos sideróforos en las cepas de <i>A. chroococcum</i> siguen sin estar claras.	HR-LC-MS; Genome mining (antiSMASH, RAST, BLAST análisis homólogos)	(X. Zhang, Baars, & Morel, 2018)
	Fusaricidina A Fusaricidina B, Fusaricidina C, Fusaricidina D, Fusaricidina A(C17)/E(C15)	<i>Paenibacillus polymyxa</i> <i>Paenibacillus kribbensis</i> <i>Paenibacillus peoriae</i>	Mostró actividades antifúngicas relativamente más débiles contra <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> y <i>Magnaporthe oryzae</i> .	MALDI-TOF-MS; Genome mining (antiSMASH)	(M. A. Ali et al., 2021)
	Acromobactina Pioverdina Heterobactina Requichelina Desferrioxamina	<i>Nocardioides simplex</i> <i>Pseudomonas chlororaphis</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i>	Recuperación de los iones metálicos críticos V(III), Ga(III), and In(III) de soluciones de metales mixtos con sideróforos inmovilizados.	Espectrometría de masas de alta resolución (LC-MS (ESI-TOF)); Genome minig (antiSMASH, RAST)	(Hofmann et al., 2021)
	Teixobactina	<i>Eleftheria terrae</i>	Inhibe la síntesis de la pared celular al unirse a un motivo altamente conservado del lípido II (precursor del peptidoglicano) y del lípido III (precursor del ácido teicoico de la pared celular).	iChip; Identificación de grupos de genes biosintéticos; HPLC preparativa	(Ling et al., 2015)
Polyketides (PKS)	Lasalocid Iso-migrastatin	<i>Burkholderia gladioli C101</i>	Sobrenadantes libres de células de <i>B. gladioli</i> C101 para limitar el crecimiento del patógeno vegetal. Se observó una reducción de la gravedad de la enfermedad en función de la dosis.	Grupos de genes biosintéticos (BGCs) usando antiSMASH	(Lim et al., 2009; Shantharaj, Williams, Potnis, & Liles, 2021; L. Smith, Hong, Spencer, & Leadlay, 2008)
	2,4-diacetylphloroglucinol (2,4-DAPG)	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ha demostrado tener un potencial antibacteriano, antifúngico, antiviral y antihelmíntico y se ha utilizado en el control de enfermedades en diferentes cultivos		(Miguel A. Matilla et al., 2016)

Clase	Metabolito	Origen	Función	Descubrimiento o Aislamiento	Referencia
	Oocydin A	<i>Serratia marcescens</i> MSU97 <i>Serratia plymuthica</i>	Muestran actividades antifúngicas y anti oomicete.	LC-MS; Genome minig (antiSMASH)	(Miguel A. Matilla et al., 2017)
	Prodigiosina	<i>Serratia marcescens</i>	Muestran actividades antifúngicas y anti oomicete contra <i>Phytophthora cinnamomi</i>	HRLC-MS	(Granada, Ramírez-Restrepo, López-Luján, Peláez-Jaramillo, & Bedoya-Pérez, 2018)
	Pyoluteorina	<i>Pseudomonas protegens</i> H78	Muestra una actividad antimicrobiana fuerte y de amplio espectro contra hongos y bacterias.	Estrategias combinadas de ingeniería genética	(Shi, Huang, Wang, Guan, & Zhang, 2019)
PKS-NRPS hybrid	Kalimantacina A	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Muestran una actividad antibiótica potente y selectiva contra especies de estafilococos, incluido el SARM.	Purificación por HPLC; NMR	(Thistlethwaite et al., 2017)
	Serratamolide	<i>Serratia marcescens</i>	Muestran actividades antifúngicas y anti oomicete.	HRLC-MS	(Granada et al., 2018)
	Brabantamides A-C	<i>Pseudomonas</i> sp. SH-C52	Presentan una actividad in vitro de moderada a alta contra los patógenos bacterianos Gram-positivos.	HPLC; LC-MS/MS; NMR	(Schmidt et al., 2014)
	Rhizoxina	<i>Paraburkholderia rhizoxinica</i>	Antimitotica	LC-MS; NMR	(Partida-Martinez & Hertweck, 2007; Scherlach, Partida-Martinez, Dahse, & Hertweck, 2006)

2.3.5 Derivados indólicos.

El indol proviene del triptófano por efecto de la enzima triptofanasa sintetizadas tanto por bacterias Gram - positivas y Gram – negativas (J.-H. Lee & Lee, 2010). Algunos autores consideran que el indol es una molécula de señalización intercelular, como una señal de *quorum-sensing* (QS) y que controla diversos aspectos de la fisiología bacteriana. Por otra parte, el indol y sus derivados pueden suprimir la patogénesis bacteriana por la capacidad de inhibir moléculas señalizadoras y la producción de factores de virulencia (J.-H. Lee, Wood, & Lee, 2015).

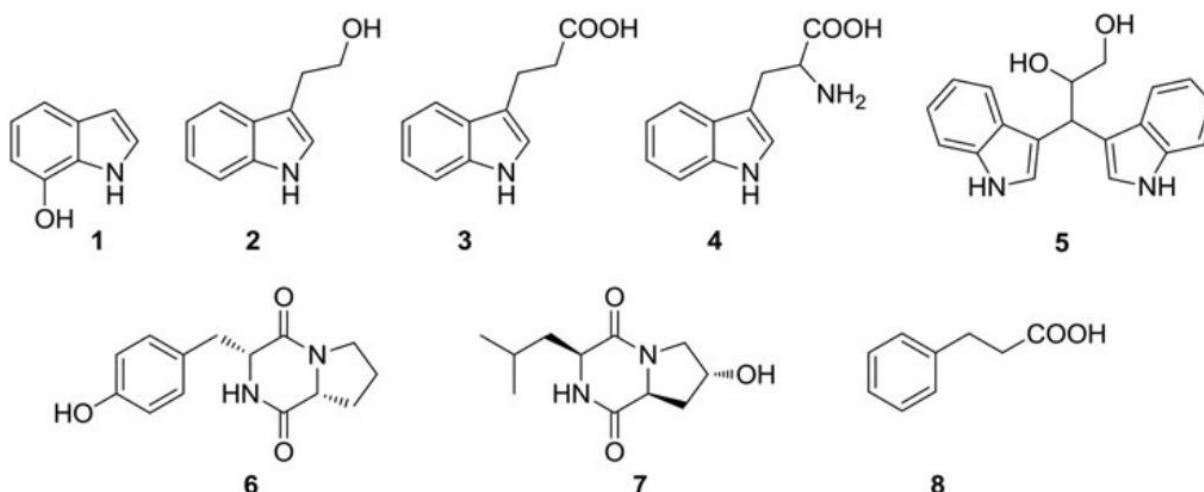


Figura 2-5. Derivados indólicos aislados de bacterias (Rustamova et al., 2019).

Estudios han señalado que el indol y sus derivados inhibieron el crecimiento de *Proteus mirabilis*, un patógeno de las vías urinaria, tal efecto fue generado por dos rizobacterias Zch127 y Cbg70 aisladas de suelo de *Cucurbita pepo* (Calabacín) y *Brassica oleracea* var. capitata L. (Col), respectivamente. Concentraciones inhibitorias submínimas (Sub-MICs) de los dos extractos mostraron una potente actividad antibiofilm con una reducción significativa del biofilm de diez aislados clínicos de *P. mirabilis* (Amer, Wasfi, Attia, & Ramadan, 2021). Por otra parte, el trabajo realizado por Yaikhan et al. (2019) mostró que la formación de biopelículas de *Klebsiella pneumoniae* susceptible al carbapenem fue claramente inducida por la exposición al indol (\approx 2-10 veces), mientras que no se observó ninguna diferencia significativa en la contraparte resistente. Además, la tolerancia a los

antibióticos β -lactámicos de *K. pneumoniae* se vio alterada tras la exposición a indol y/o derivados evaluados mediante la prueba de difusión en disco de Kirby-Bauer.

2.3.6 Compuesto volátiles bacterianos.

Las bacterias además de sintetizar compuestos solubles en agua, son capaces de producir compuestos volátiles, que se difunden con facilidad a través de los poros llenos de aire y gas en el suelo y probablemente desempeñen un rol importante en interacciones a larga distancia, además su influencia se extiende al crecimiento y desarrollo de las plantas (Audrain et al., 2015; Tyc et al., 2016).

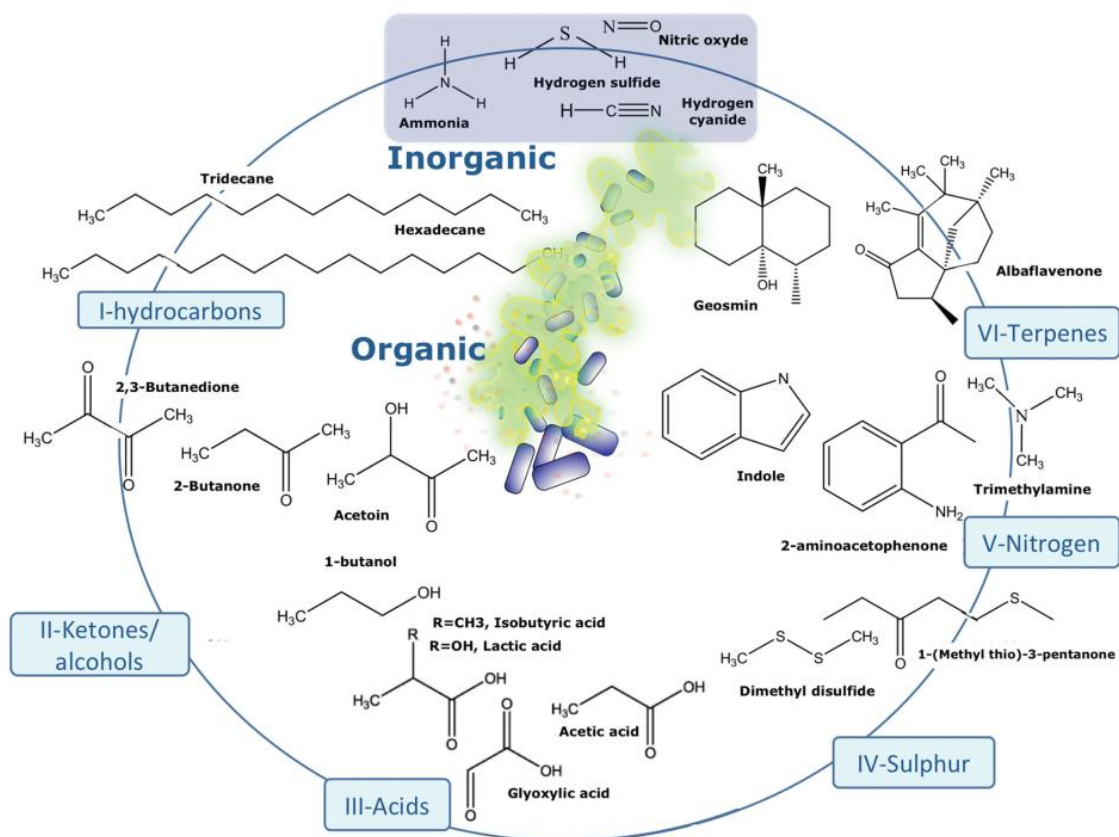


Figura 2-6. Naturaleza química de algunos compuestos volátiles bacterianos (Audrain et al., 2015).

Como se muestra en la figura 2-5, estos compuestos pueden ser de naturaleza orgánica (Volatile Organic Compounds (VOCs)), en los que se incluyen una gran diversidad química de metabolitos como lo son alquenos, alcoholes, cetonas, benzenoides, pirazinas, sulfuros y terpenos (Kanchiswamy, Malnoy, & Maffei, 2015; Lemfack et al.,

2017; Schulz-Bohm, Martín-Sánchez, & Garbeva, 2017). Del mismo modo, se generan compuestos volátiles inorgánicos donde se destacan el óxido de nitrógeno, sulfuro de hidrógeno, amonio y cianuro de hidrogeno (HCN) (Audrain et al., 2015; Jain, Varma, Tuteja, & Choudhary, 2017).

Algunos estudios han mostrado el potencial antimicrobiano de estos compuestos, donde la emisión de disulfuro de dimetilo por parte de bacterias rizosféricas como *P. fluorescens* y *Serratia plymuthica* mostró efecto bacteriostático frente a los fitopatógenos *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium vitis* (Dandurishvili et al., 2011). Asimismo, compuestos volátiles producidos por cepas del género *Bacillus*, fueron eficientes en la inhibición del crecimiento del patógeno de la antracnosis del mango en ensayos desarrollados *in vivo* (Zheng, Shi, Shi, Wang, & Li, 2013). Adicionalmente, la promoción de crecimiento vegetal, es otra de las características de los compuestos volátiles generados por microorganismos del suelo.

Sumado a lo anterior, cepas del género *Bacillus* (GB03 y IN937a) promovieron el crecimiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* y los compuestos responsables de dicha actividad se caracterizaron como 2,3-butanodiol y acetoína (Ryu et al., 2003). También en un estudio reciente, se evaluaron compuestos microbianos volátiles de microbiota asociada a zonas áridas y semiáridas en México en la interacción con *A. thaliana* y *Nicotiana benthamiana*, revelando que el 90% de los aislamientos promovieron el crecimiento de las plantas evaluadas y la composición mayoritaria de esos compuestos fueron esteroides, alcoholes y compuestos que contienen azufre (Camarena-Pozos, Flores-Núñez, López, López-Bucio, & Partida-Martínez, 2019). Toda esta información muestra lo interesante que resulta el estudio de las rizobacterias y sus interacciones, siendo esto un insumo valioso para la obtención de alternativas amigables con el medio ambiente y, sobre todo, para entender las dinámicas que se dan en el suelo.

2.4 ESTRATEGIAS PARA OBTENER SUSTANCIAS BIOACTIVAS MICROBIANAS

Como se ha mencionado con anterioridad, el potencial de las bacterias en general es incalculable, en parte, por su capacidad de usar su maquinaria genética cuando se ve sometida a determinadas condiciones ambientales generando moléculas que pueden ser empleadas en diferentes campos como la biotecnología, medicina, farmacia, entre otros (S.-S. Choi et al., 2018; M. M. Zhang, Qiao, Ang, & Zhao, 2017). Sumado a lo anterior, la manipulación de las rutas metabólicas y las mejoras en las técnicas de secuenciación han permitido llegar a aproximaciones más exactas sobre el rol que pueden cumplir esos compuestos (Begani, Lakhani, & Harwani, 2018; S.-S. Choi et al., 2018; Ishida et al., 2010; Kealey, Creaven, Murphy, & Brady, 2017; Scherlach & Hertweck, 2009). En este apartado, se mencionarán algunas estrategias empleadas en la obtención de metabolitos secundarios microbianos, incluyendo aproximaciones que conjugan herramientas estadísticas, configuración de medios y condiciones de cultivo, así como predicciones *in silico*.

2.4.1 Una cepa muchos compuestos (One strain many compounds (OSMAC)).

Esta estrategia surgió como alternativa a los programas tradicionales de búsqueda de biomoléculas, que requieren presupuestos elevados y sólo pueden ser llevados a cabo por farmacéuticas y compañías biotecnológicas con soportes financieros elevados. Zeeck y colaboradores se centraron en un grupo “pequeño” de organismos para estudiarlos a profundidad y obtener mayor rédito de los productos metabólicos generados por estos organismos (Bode, Bethe, Höfs, & Zeeck, 2002).

Las manipulaciones de las condiciones de cultivo de un microorganismo, se pueden traducir en la promoción de la biosíntesis de metabolitos secundarios, lo que, a su vez, facilita el descubrimiento de nuevos productos naturales. Los parámetros sujetos a ser modificados son la fuente de carbono, nitrógeno, fósforo, pH, temperatura, aireación y forma del matraz, principalmente (Begani et al., 2018; Scherlach & Hertweck, 2009). Adicionalmente, el empleo de diseños estadísticos y estrategias de optimización permiten mejorar la obtención de metabolitos de interés, además de evaluar múltiples

variables a la vez, reduciendo el número de experimentos y costos asociados al experimento (Grahovac et al., 2014; Sharmila et al., 2013).

2.4.2 Optimización.

En cualquier proceso, suele ser interesante explorar las relaciones entre los principales factores de entrada y las características de salida o de calidad. Los métodos estadísticos desempeñan un papel importante en la planificación, realización, análisis e interpretación de los datos de cualquier experimento. Cuando son varias las variables que influyen en una determinada característica de un producto, la mejor estrategia es entonces diseñar un experimento que permita extraer conclusiones válidas, fiables y sólidas de forma eficaz, eficiente y económica (Das & Dewanjee, 2018).

- Un factor a la vez (one-factor-at-a-time (OFAT)). En esta técnica se varía una sola variable, mientras las demás se mantienen constantes. Debido a su facilidad y conveniencia, la OFAT ha sido la opción preferida por los investigadores para diseñar la composición del medio y se ha utilizado en las etapas iniciales en diversos campos. Sin embargo, este método no puede estudiar las interacciones entre los factores y consume más tiempo (Abou-Taleb & Galal, 2018).
- Diseño Plakett Burman (Plakett Burman Design (PBD)). El uso de estrategias estadísticas para evaluar los parámetros o componentes de un medio de cultivo es necesario para obtener las condiciones ideales, sin embargo, no todas las condiciones de cultivo contribuyen a la generación de los metabolitos o la biomasa de interés. Si esto es así, la variable que no contribuye significativamente a la actividad evaluada puede ser eliminada. Plakett Burman es un diseño de dos niveles, que es muy útil para detectar económicamente los principales efectos y asumir que todas las demás interacciones son insignificantes cuando se comparan algunos de los principales efectos importantes, es decir, cuando no hay interacciones, el efecto observado de un factor puede ser superior o inferior al estimado por otros factores (V. Singh et al., 2017; Vaidya, Vyas, & Chhatpar, 2003). Es arreglo estadístico es

empleado en las fases de *Screening*, permitiendo reducir el número de variables a evaluar.

- Diseño central compuesto (Central Composite Design (CCD)). Contiene un diseño factorial incorporado o factorial fraccionado con puntos centrales, consta de tres conjuntos distintos de corridas experimentales; cada factor estudiado presenta dos niveles (+1 y -1) y los puntos centrales, donde las corridas experimentales tienen los valores medios de cada factor utilizado en el diseño factorial. Un CCD se puede denotar como un cubo con esquinas, que representa el producto de los niveles [-1, 1], una estrella o puntos axiales a lo largo de los ejes en o fuera del cubo (Das & Dewanjee, 2018; V. Singh et al., 2017).
- Diseño de Box-Behnken (BBD). Es una alternativa al CCD, es independiente del diseño cuadrático, que no contiene un diseño factorial incrustado o factorial fraccional (Ferreira et al., 2007). En este diseño, las combinaciones de tratamiento están en los puntos medios de los bordes del espacio de proceso y en el centro. Estos diseños son giratorios (o casi giratorios) y requieren 3 niveles de cada factor. Los diseños tienen una capacidad limitada para el bloqueo ortogonal en comparación con los diseños compuestos centrales (Das & Dewanjee, 2018).
- Superficie de respuesta (RSM). La metodología de superficie de respuesta (RSM) se utiliza para describir el uso de diseños experimentales que dan superficies de respuesta a partir de las cuales se deduce información sobre el sistema experimental (Nor, Mohamad, Foo, & Rahim, 2010; Skartland, Mjøs, & Grung, 2011). Es una técnica poderosa para probar variables de procesos múltiples, porque se necesitan menos ensayos experimentales en comparación con el estudio de una variable a la vez (Polak-Berecka, Waśko, Kordowska-Wiater, Targoński, & Kubik-Komar, 2011). Es un enfoque matemático robusto y eficiente que incluye diseños experimentales estadísticos y análisis de regresión múltiple, para buscar la mejor formulación bajo un conjunto de ecuaciones restringidas. La idea principal de RSM es utilizar una secuencia de experimentos diseñados para obtener una respuesta óptima. RSM a

menudo se ha aplicado para optimizar las variables de formulación y la optimización del proceso de fermentación (V. Singh et al., 2017).

Como se detalló anteriormente, la combinación de todas estrategias conllevaría una aproximación eficiente en la búsqueda de un objetivo en particular. OSMAC permitiría explotar el potencial de un organismo al máximo, exigiéndole que exprese genes que pueden estar silenciados a condiciones de cultivo típicas. Ésta aproximación permite aumentar, en algunos casos, hasta un 33% la producción de ácido fusárico, citocalasina D y ácido 3-nitopropiónico en fuentes microbianas (Selegato et al., 2019). Otro estudio reveló que el uso OSMAC propició la producción de un compuesto no reportado previamente (surugamide A), por parte de un endófito de esponjas marinas *Streptomyces* sp. SM17 (Almeida et al., 2019). Del mismo modo, esta estrategia reveló una amplia diversidad de metabolitos secundarios generados por el PGPR *Pantoea agglomerans* Pa con interesantes actividades de alivio al estrés salino y promotora del crecimiento vegetal (Cherif-Silini et al., 2019). Adicionalmente, OSMAC podría servir como un método útil para permitir la activación de los genes silenciosos en el microorganismo y para la formación de metabolitos secundarios activos no reportados anteriormente (J. Zhang et al., 2020). El uso de este tipo de estrategias permitiría ahondar en el conocimiento de bacterias benéficas para las plantas y aprovechar su potencial como productoras de sustancias bioactivas.

2.4.3 Genome mining.

El *Genome mining* proviene de la minería de datos, que a su vez se define como la recopilación, el análisis y la interpretación sistemáticos de montones de datos ("big data") con el objetivo de descubrir nuevos rasgos, relaciones, pautas o tendencias importantes. En el caso de *genome mining*, los datos de la secuenciación del genoma completo de un organismo representa los grandes datos que son interpretados por herramientas bioinformáticas para buscar nuevos catalizadores o metabolitos (Paterson et al., 2016).

El blanco de esta técnica es la enorme diversidad de metabolitos, los principios biosintéticos y por lo tanto las maquinarias biosintéticas que para muchos de estos

compuestos están notablemente conservadas. Ejemplos de clases de metabolitos secundarios que utilizan esos mecanismos conservados son los policétidos (PK), péptidos no ribosomales sintetizados (NRP), Los péptidos ribosómicamente sintetizados y postraduccionalmente modificados (RiPP), aminoglucósidos, entre otros (Ziemert, Alanjary, & Weber, 2016).

En años recientes, se han desarrollado herramientas bioinformáticas de plataforma abiertas para la búsqueda de manera eficiente de genes asociados a los metabolitos, alguna de estas son BAGEL (de Jong, van Hijum, Bijlsma, Kok, & Kuipers, 2006; van Heel et al., 2018), CLUSEAN (CLUster SEquence ANalyzer) (Weber et al., 2009), antiSMASH (The antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell) (Blin et al., 2019; Blin et al., 2017), ClusterFinder (Cimermancic et al., 2014), GNPS (Global Natural Products Social Molecular Networking) (M. Wang et al., 2016) y EvoMining (Cruz-Morales et al., 2016; Sélem-Mojica, Aguilar, Gutiérrez-García, Martínez-Guerrero, & Barona-Gómez, 2019).

El desarrollo de toda esta tecnología ha permitido identificar genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de metabolitos secundarios en secuencias de genomas completos. Estos métodos pueden ser refinados centrando la búsqueda no solo genes individuales, sino también identificando grupos de genes o parte de ellos (partial or complete gene clusters), pudiendo comparar los *Biosynthetic gene clusters* identificados en genomas enviados por los usuarios con una gran colección de BGC de otros microorganismos contenida en la base de datos curada MIBiG (Begani et al., 2018; Kautsar et al., 2019; Ziemert et al., 2016).

Si bien el uso de estas herramientas se ha probado para encontrar nuevas moléculas y, en general cubren una gran gama de metabolitos secundarios, aún no se incluyen mecanismo de reconocimiento de las enzimas de biocontrol y algunas rutas especializadas, como las fitohormonas y los compuestos volátiles, entre otros y deben ser rastreados con herramientas menos potentes como el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Paterson et al., 2016). Diversos estudios se han desarrollado derivando en la identificación de compuesto con actividad antimicrobiana como los policétidos

(Behnken & Hertweck, 2012; R. Chen et al., 2017; Pidot, Ishida, Cyrulies, & Hertweck, 2014; Ross, Opel, Scherlach, & Hertweck, 2014; Valiante et al., 2017; Yang et al., 2016; Ye et al., 2017), péptidos no ribosomales (Liang Chen et al., 2019; Krzyżanowska et al., 2016; K. Liu et al., 2017; Mohimani et al., 2014; Niehs, Dose, Scherlach, Roth, & Hertweck, 2018; Thongkongkaew et al., 2018), bacteriocinas (Alvarez-Sieiro et al., 2016; Letzel, Pidot, & Hertweck, 2014; Lopes et al., 2017; Sandiford, 2017; Zhao & Kuipers, 2016). Sin embargo las rizobacterias son un reservorio de metabolitos que está por explorar aún y estudios como el de Z. Li et al. (2020) presentan el potencial de bacterias como promotoras de crecimiento y el empleo de *genome mining* reveló posibles BGC intactos y novedosos, incluyendo dos NRPS, cuatro híbridos NRPS-PKS y cinco bacteriocinas. El trabajo anterior es solo una muestra con PGPR, pero este tipo de herramientas podrán ampliar el potencial de las bacterias de la rizósfera como generadoras de nuevas moléculas para el manejo de enfermedades en el sector agropecuario.

Teniendo en cuenta lo mencionado en esta aquí, se plantea la siguiente hipótesis de investigación: ¿Es posible obtener sustancias bioactivas a partir de rizobacterias nativas obtenidas de suelos arroceros para el manejo eficaz de *B. glumae* en el sistema productivo del arroz?

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue evaluar el potencial antimicrobiano de extractos bioactivos del aislamiento bacteriano más promisorio proveniente de la rizósfera del cultivo de arroz frente a *Burkholderia glumae*. Para ello, se seleccionó el aislamiento rizosférico nativo del cultivo de arroz del Departamento del Tolima con mayor actividad inhibitoria a partir de extractos crudos de *Kosakonia* sp. S13B3, *Bacillus* sp. S21A1, *Chryseobacterium gleum* S12A1 y *Pantoea* sp. P21C5 frente a *Burkholderia glumae*. Además, se establecieron los parámetros óptimos para la obtención de extractos crudos bioactivos a partir de la bacteria más promisorio y se realizó una aproximación de su composición química. Finalmente, se determinó el potencial metabólico de la rizobacteria más promisorio para el control de *B. glumae* empleando herramientas bioinformáticas.

3 METODOLOGÍA

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Los aislamientos objeto de estudio en este trabajo, fueron obtenidos en un estudio previo realizado por el Grupo de Investigación en Productos Naturales de la Universidad del Tolima. Dichos aislamientos están codificados como S13B3, S21A1, S12A1 y P21C5, los cuales han sido caracterizados como *Kosakonia* sp, *Bacillus* sp, *Chryseobacterium gleum* y *Pantoea* sp respectivamente (Oliveros & Rueda Lorza, 2017). Estas cepas han mostrado un potencial sobresaliente frente distintos fitopatógenos del cultivo de arroz, en especial *B. glumae*.

3.2 SELECCIÓN PRELIMINAR

Se emplearon tres medios de cultivos para determinar qué microorganismos de los mencionados anteriormente, presenta mayor potencial inhibiendo el crecimiento del patógeno *Burkholderia glumae*. Los medios utilizados fueron: Medio Mínimo M9 5X (Na_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; NH_4Cl ; NaCl ; CaCl_2 ; MgSO_4 ; glucosa), medio GYP (glucosa, extracto de levadura, peptona) y medio TSB (caldo tripticasa de soya).

3.2.1 Fermentaciones.

Los cultivos se realizaron en matraces con baffles o deflectores con capacidad de 125 mL y el volumen a fermentar fue 50 mL, a 27 °C en una incubadora con orbital a 150 rpm durante 48 h. A continuación, se realizó una extracción líquido - líquido con acetato de etilo tres veces en una relación 1:1 (Miguel A Matilla, Stöckmann, Leeper, & Salmond, 2012).

Por último, la fase orgánica se recuperó y se filtró con la ayuda de papel filtro que contenía Na_2SO_4 anhidro con el fin de eliminar cualquier rastro de fase acuosa, y luego el solvente se eliminó por evaporación rotativa asistida por vacío en un rotavapor Büchi

R-300, obteniéndose el extracto bacteriano crudo. Los extractos crudos se llevaron a un desecador conectado a una bomba de vacío con el fin de llevar a sequedad total la muestra. Finalmente, las muestras fueron rotuladas y almacenadas a -20 °C hasta su utilización.

3.2.2 Bioensayos.

El potencial de los extractos se determinó mediante la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀), empleando el método de microdilución en caldo recomendado por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Se empleó la metodología M7-A10 (CLSI, 2015) con algunas modificaciones, donde se realizó una curva de concentraciones con 6 réplicas por cada concentración. Se transfirió una colonia (24 h de incubación) a solución salina (NaCl 0,85%) y se agitó vigorosamente en vórtex. La turbidez fue ajustada con la ayuda de un espectrofotómetro UV/VIS Multiskan® GO (Thermo Scientific) a 0,08 – 0,12 a una longitud de onda de 625 nm, para obtener una concentración de $1 - 2 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias por mL (UFC/mL).

Posteriormente, se preparó la solución de los extractos crudos a la concentración deseada en metanol (solución 1) y se diluyó 1/10 en medio Luria (LB). Luego, 100 µL de caldo LB fue añadido en cada pozo (de la fila B a la F) de una microplaca de 96 pozos y los pozos de las filas G y H se emplearon como control de crecimiento y contaminación respectivamente. En la fila A, se agregaron 200 µL de la solución 1 y con una micropipeta multicanal fueron transferidos 100 µL para realizar diluciones dobles del extracto crudo en los pozos (B al F). El inóculo de *Burkholderia glumae* fue diluido 1/150 en medio LB para obtener una suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^6 UFC y se añadieron 100 µL en cada pozo. La microplaca se incubó a 30 °C por 24 h (Balouiri, Sadiki, & Ibnsouda, 2016). Enseguida, se agregaron 30 µL de una solución estéril de Resazurina (0,015%) en cada pozo y se dejaron en incubación por 4 h (Elshikh et al., 2016). Finalmente, se realizó la lectura de la fluorescencia (560 nm/590 nm) en un lector de microplacas multimodal Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX.

3.3 PROCESO DE OPTIMIZACIÓN

Se emplearon diseños estadísticos para determinar qué factores influyen en la bioactividad de los extractos crudos de la rizobacterias más promisorias frente a *Burkholderia glumae*. A la selección previa del medio de cultivo, se incluyó una variación unifactorial de fuentes de carbono (glucosa, glicerol, maltosa, almidón soluble, lactosa, harina de arroz) y nitrógeno (extracto de levadura, urea, sulfato de amonio, nitrato de potasio, harina de chachafruto).

3.3.1 Fuente de carbono.

Se realizó un diseño unifactorial donde se varió un factor a la vez. Se empleó el medio mínimo M9 5X (Na_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; NH_4Cl ; NaCl ; CaCl_2 ; MgSO_4) al cual se le adicionaron como fuente de carbono glucosa, glicerol, maltosa, almidón soluble, lactosa, harina de arroz.

La obtención de los extractos bacterianos se realizó como se describió en la sección 3.2.1., así como la realización de los bioensayos según la metodología propuesta en la sección 3.2.2., la curva de concentraciones evaluada fue 0.015625 – 2 mg/mL, cada concentración 4 réplicas y se realizaron 3 ensayos independientes en el tiempo. Finalmente, se realizó un análisis de varianza de una vía y se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey.

3.3.2 Fuente de nitrógeno.

Se realizó un diseño unifactorial donde se varió un factor a la vez. Se empleó el medio mínimo M9 5X (Na_2HPO_4 ; KH_2PO_4 ; NaCl ; CaCl_2 ; MgSO_4) al cual se le adicionaron como fuente de nitrógeno sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), nitrato de potasio (KNO_3), cloruro de amonio (NH_4Cl), urea, extracto de levadura (Y.E.) y harina de chachafruto (*Erythrina edulis*) (H.Cha). Se tuvo en cuenta la composición porcentual de nitrógeno de cada una de las diferentes fuentes con el fin de equilibrar las proporciones en cada medio resultante.

La obtención de los extractos bacterianos se realizó como se describió en la sección 3.2.1., así como la realización de los bioensayos según la metodología propuesta en la sección 3.2.2., la curva de concentraciones evaluada fue 0.015625 – 2 mg/mL, cada concentración 4 réplicas y se realizaron 3 ensayos independientes en el tiempo. Finalmente, se realizó un análisis de varianza de una vía y se aplicó la prueba de rangos múltiples de Tukey.

3.3.3 Selección de condiciones de cultivo.

Se empleó un diseño Plackett-Burman para discriminar los componentes significativos de los medios, como la fuente de carbono (harina de arroz (H.A.)), fuentes de nitrógeno (extracto de levadura (Y.E.)); harina de chachafruto (H.Cha)), algunas sales (KH_2PO_4 ; Na_2HPO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; NaCl) y pH. Cada una de las variables en el diseño de Plackett-Burman constaron de dos niveles: (-) para el nivel bajo y (+) para el nivel alto (tabla 3-1). Se consideraron los factores que tuvieron un efecto significativo ($p \leq 0.05$) en la bioactividad de los extractos bacterianos crudos (Podleśny et al., 2017). A continuación, se empleó la metodología de superficie de respuestas para determinar los parámetros óptimos en la obtención de extractos bioactivos.

La obtención de los extractos bacterianos se realizó como se describió en la sección 3.2.1., así como la realización de los bioensayos según la metodología propuesta en la sección 3.2.2., la curva de concentraciones evaluada fue 0,0625 – 2 mg/mL, cada concentración con 4 réplicas. Se incluyeron 9 factores en el diseño como se muestra en la tabla 3-1, con dos réplicas cada tratamiento, donde la unidad experimental cada costó de tres matraces con baffles o deflectores. Se seleccionaron los tratamientos que presentan efectos significativos en la obtención de CI_{50} bajas (variable respuesta) y se apoyaron estos resultados con el diagrama de Pareto de efecto estandarizados.

Tabla 3-1. Variables seleccionadas para el diseño Plackett–Burman

Códigos factores	Factores	Niveles	
		-1	+1
A (g/L)	H.A.	2	20
B (g/L)	Y.E.	0	10
C (g/L)	H. Cha	0	5
D (g/L)	KH_2PO_4	0	3

E (g/L)	Na ₂ HPO ₄	0	6
F (g/L)	MgSO ₄ * 7H ₂ O	0,2	0,5
G (g/L)	MnSO ₄ * H ₂ O	0,02	0,05
H (g/L)	NaCl	0	0,5
J	pH	6	8

-1, rango mínimo de variable; +1 rango máximo de variable. Fuente: autor.

3.3.4 Optimización condiciones de cultivo.

Un diseño Box-Behnken fue utilizado para la optimización del efecto de las variables significativas resultantes del diseño Plackett-Burman y que influyen sobre la respuesta, es decir el efecto de los extractos sobre el crecimiento del patógeno. Se incluyeron tres factores, harina de arroz (H.A.), extracto de levadura (Y.E.) y harina de chachafruto (H.Cha.). El análisis de la varianza (ANOVA) se utilizó para el análisis estadístico del modelo, compuesto por la prueba F de Fisher, la probabilidad asociada P(F), el coeficiente de determinación R² y el coeficiente de correlación R que mide la bondad del ajuste del modelo de regresión.

La obtención de los extractos bacterianos se realizó como se describió en la sección 3.2.1., así como la realización de los bioensayos según la metodología propuesta en la sección 3.2.2., la curva de concentraciones evaluada fue 0,03125 – 2 mg/mL, cada concentración con 4 réplicas.

Por último, se realizó una fermentación las condiciones óptimas y validar los resultados obtenidos. Para ello se siguieron los procedimientos descritos en los numerales 3.2.1 y 3.2.2, donde se varió el volumen a fermentar (100 mL) y el tamaño del matraz (500 mL).

3.4 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE EXTRACTO OPTIMIZADO

3.4.1 Cromatografía flash.

Se utilizó la cromatografía preparativa flash sobre sílice gel para fraccionar el extracto crudo bacteriano. La columna de vidrio (diámetro interno de 6 cm; longitud de 55 cm) se empacó con gel de sílice (gel de sílice 60, Merck, DE) en hexano. A continuación, se mezclaron 240 mg de la muestra con gel de sílice 60 en acetato de etilo y se eliminó el

disolvente a presión reducida a 45 °C (rotavapor Büchi R-300). La muestra pulverizada se añadió en la parte superior de la columna. El caudal de gas (aire comprimido) se fijó en 2 pulgadas por minuto.

Los solventes empleados como fase móvil fueron hexano (Merck) y acetato de etilo (Panreac). Se empleó una elución en gradiente donde se fue aumentando la concentración de acetato de etilo en un 10% cada 100 mL de fase móvil. Las fracciones se colectaron manualmente y se corrieron en una cromatografía de capa delgada (TLC, por sus siglas en inglés), y los disolventes se eliminaron bajo presión reducida a 45 °C (rotavapor Büchi R-300).

3.4.2 Resonancia magnética nuclear (RMN).

Los experimentos bidimensionales en RMN como son COSY H-H; HSQC y HMBC nos brindan información adicional. Los extractos bioactivos fueron evaluados con una espectrofotometría de resonancia magnética nuclear (RMN) en un espectrofotómetro VARIAN AS400 MHz Mercury plus (Varian, Inc., Palo alto, CA, USA), con 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C . Los espectros fueron registrados en CD_3OD a 25 °C.

3.4.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HRLC-MS).

La separación se realizó usando una columna C18 de fase reversa. El disolvente A fue ácido fórmico al 0,1% (v/v) en agua y el disolvente B acetonitrilo (MeCN). El gradiente de disolvente fue: inicialmente 5% de B, durante 3 min, gradiente lineal de 5% a 98% de B en 35 min, y luego se mantuvo a 98% de B durante 5 min, a un caudal de 0,1 mL / min. Los espectros de masas de alta resolución se registraron en un espectrómetro de masas Exactite Orbitrap (Thermo) usando ionización por electrospray. Las masas moleculares se usaron para generar la fórmula molecular y se compararon con bases de datos para conocer si se han reportado previamente (Granada et al., 2018).

3.5 ANÁLISIS GENÓMICO

3.5.1 Secuenciación del genoma, ensamble y anotación.

La bacteria se cultivó por duplicado en agar tripticasa de soya (TSA, Bioskar Diagnostic, solo en Francia) a 37 °C durante 48 horas, luego se transfirieron 10 colonias a 15 ml de medio líquido TSB y se incubaron a 37 °C durante 36 horas, de estos, 10 ml se transfirieron de cultivo en fase logarítmica media a tardía (0,5 a 0,7 a una densidad óptica de 600) a un tubo cónico y se sedimentaron las células mediante centrifugación a 7500 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. El aislamiento de ADN genómico se realizó a partir de este sedimento. Brevemente, luego se lisaron en presencia de proteinasa K, y el ADN se purificó mediante extracción con fenol:cloroformo, seguida de precipitación con etanol. Finalmente, el ADN se resuspendió y almacenó en buffer TE. La cuantificación y estimación de la calidad y pureza del ADN genómico se realizó mediante espectrofotómetro (Nanodrop N-1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EE. UU.). La integridad del ADN se probó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 % y se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio bajo iluminación UV. Siguiendo los requerimientos del Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG-CRG, Barcelona, España), la muestra tenía una concentración mínima de 50 ng/μl, la concentración también se estimó en un fluorómetro (Qubit 4, Thermo Fisher Scientific).

Las bibliotecas de extremos emparejados de inserción corta para la secuenciación del genoma completo se prepararon con un protocolo libre de PCR utilizando el kit KAPA HyperPrep (Roche, Basilea, Suiza) con algunas modificaciones. En resumen, según el ADN de partida disponible, se cortaron de 0,4 a 1,0 μg de ADN genómico en un Covaris™ LE220-Plus (Covaris, Brighton, Reino Unido) para alcanzar el tamaño de fragmento de ~400 pb. El tamaño del ADN fragmentado se seleccionó para el intervalo de fragmentos de 220 a 550 pb con perlas AMPure XP (Agencourt, Beckman Coulter, Nyon, Suiza). Los fragmentos de ADN genómico seleccionados por tamaño se repararon en los extremos, se adenilaron y se ligaron adaptadores compatibles con la plataforma Illumina con índices duales únicos e identificadores moleculares únicos (Integrated DNA Technologies, Lovaina, Bélgica). La calidad de las bibliotecas se controló en un

bioanalizador Agilent 2100 con el ensayo DNA 7500 (Agilent, Madrid, España) para tamaño y cuantificación mediante Kapa Library Quantification Kit para plataformas Illumina (Roche). Las bibliotecas se secuenciaron en una plataforma NovaSeq6000 (Illumina, San Diego, CA, EE. UU.) en modo de extremo emparejado con una longitud de lectura de 2x151+17+8 pb siguiendo el protocolo del fabricante para la indexación dual. El análisis de imágenes, la llamada de bases y la puntuación de calidad de la ejecución se procesaron utilizando el software Real-Time Analysis (RTA 3.4.4, Illumina) del fabricante y seguido de la generación de un archivo de secuencia FASTQ, de 3,82 GB y una cobertura de 152 X.

- Análisis filogenético. Empleando la plataforma PATRIC 3.6.12 se realizó el análisis filogenético empleando genomas de referencia y representativos. La referencia más cercana y los genomas representativos fueron identificados por Mash/MinHash (Ondov et al., 2016). Las familias de proteínas globales PATRIC (PGFams) (Davis et al., 2016) se seleccionaron de estos genomas para determinar la ubicación filogenética de este genoma. Las secuencias de proteínas de estas familias se alinearon con MUSCLE (Edgar, 2004), y los nucleótidos de cada una de esas secuencias se asignaron a la alineación de proteínas.

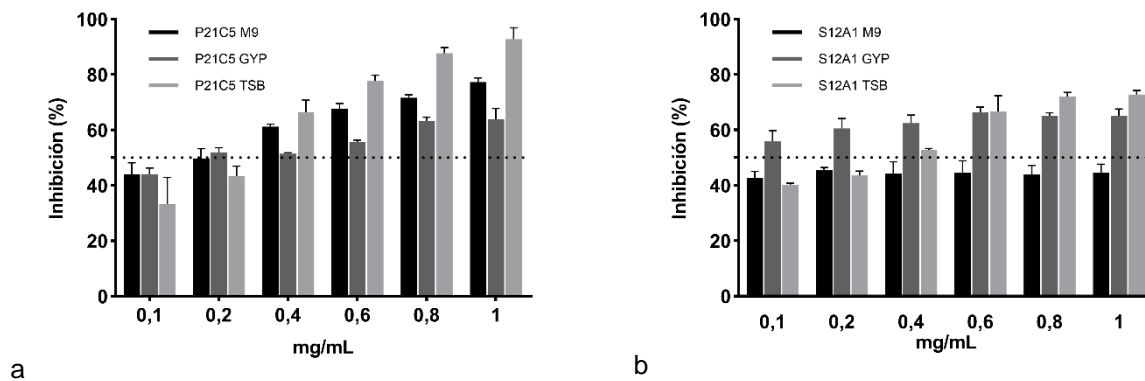
3.6 PREDICCIÓN DE GENES ASOCIADOS A METABOLITOS SECUNDARIOS

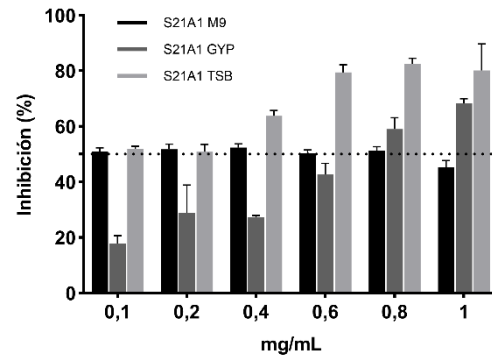
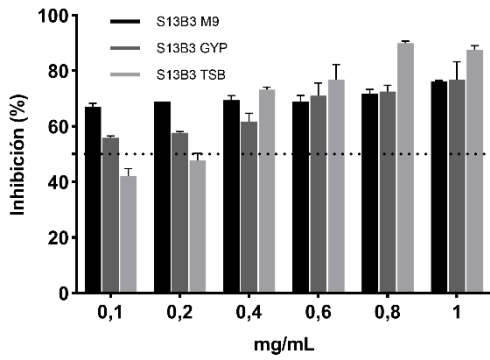
La predicción de genes fue realizada con PRIMS 4 (Chemistry Development Kit1, HMMER, BLAST, BioJava, and FIMO) (Skinnider et al., 2020), BAGEL4 (van Heel et al., 2018), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes database (KEGG, <http://www.kegg.jp/kegg/>). La herramienta web antibiotics and secondary metabolite analysis shell 6.1.1 (antiSMASH 6.1.1) (Blin et al., 2017) se empleó para identificar genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos bioactivos. Esta herramienta permitió una rápida identificación, anotación y análisis de grupos de genes asociados a la biosíntesis de metabolitos en genomas bacterianos. Dicha herramienta, integra y enlaza un gran número de herramientas de análisis de metabolitos *in silico* que se han publicado anteriormente (Blin et al., 2017).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 SELECCIÓN PRELIMINAR

Los cuatro aislamientos evaluados mostraron porcentajes de inhibición superiores al 50% frente a *B. glumae*. En la figura 4.1 se pueden apreciar la incidencia de diferentes medios de cultivo sobre la generación de extractos crudos bacterianos. Donde resalta el medio tripticasa de soya que, a mayores concentraciones de extracto, presentó actividades más altas. Este medio posee los componentes mínimos para el crecimiento de microorganismos que no necesitan requerimientos especiales, dando a las bacterias evaluadas una fuente de nitrógeno y carbono adecuada para biosíntesis de metabolitos bioactivos, lo cual queda de manifiesta al presentar en promedio los porcentajes de inhibición superiores al 65%, los más altos de los tres medios evaluados. A pesar de las diferencias observadas, no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tres medios evaluados para nivel de significancia del 95% (ver Anexo A.).





c d
Figura 4-1. Efecto de medios de cultivo en la producción de extractos crudos bioactivos frente a *Burkholderia glumae*. a. *Pantoea* sp. P21C5. b. *Chryseobacterium gleum* S12A1. c. *Kosakonia* sp. S13B3. d. *Bacillus* sp. S21A1. Fuente: autor

Por otra parte, la cepa S13B3 produjo los extractos bioactivos con mayor actividad y presentó un potencial interesante, incluso al interactuar con un medio mínimo como M9, al generar extractos crudos con porcentaje de inhibición por encima del 50% después de la fermentación en dicho medio de cultivo, superior a cualquiera de las cepas evaluadas. En general S13B3 mostró una mayor actividad en sus extractos, como se observa en la figura 4.2, mostrándose como una cepa que puede responder de manera adecuada a los cambios de condiciones para la generación de sustancias bioactivas.

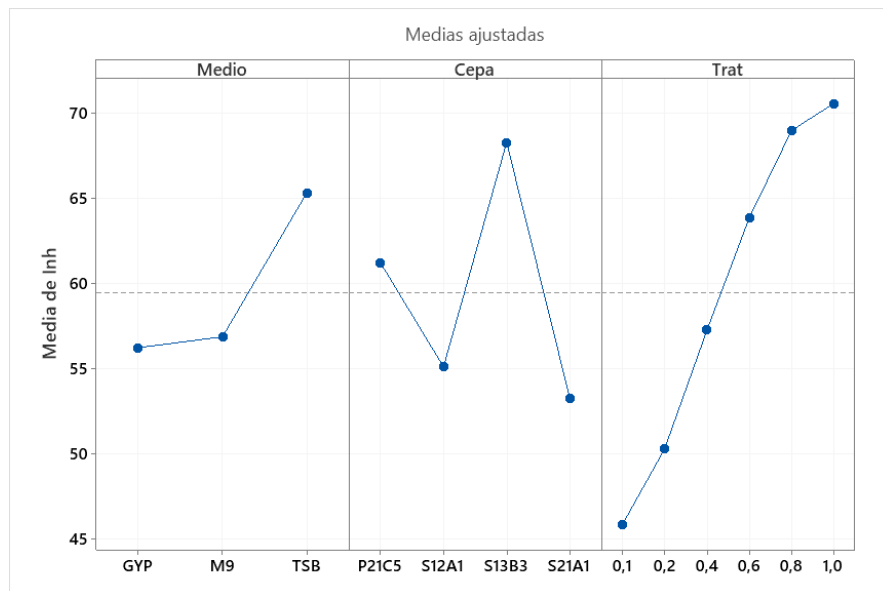


Figura 4-2. Gráfica de efectos principales para el porcentaje de inhibición de extractos crudos bacterianos. Fuente: autor

Diversos estudios han mostrado que las condiciones de cultivo tienen efectos sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios bioactivos (Abou-Taleb & Galal, 2018; Bode et al., 2002; Grahovac et al., 2014; Ndlovu et al., 2017; V. Singh et al., 2017). Medios con los nutrientes mínimos como M9 son versátiles, ya que al ser enriquecidos con fuentes de carbono, nitrógeno, sales o metales pueden actuar como moduladores de genes responsables de biosíntesis de metabolitos secundarios, que en determinados casos, son los responsables de la actividad de las sustancia producidas por las microorganismos (Selegato et al., 2019; Wu et al., 2018; J. Zhang et al., 2020). Teniendo en cuenta lo anterior y los resultados obtenidos, se determina que la cepa S13B3 es la más promisorio para la producción de sustancias bioactivas frente al fitopatógeno del cultivo de arroz *Burkholderia glumae*. Además, el medio mínimo M9 es el más adecuado para realizar la optimización para obtención de un extracto crudo bioactivo frente a dicho fitopatógeno.

4.2 PROCESO DE OPTIMIZACIÓN

4.2.1 Fuente de carbono.

El potencial de S13B3 *in vitro* frente al fitopatógeno del cultivo de arroz *B. glumae*, fue evidente. Por ello se desarrolló la optimización de las condiciones de cultivo para obtener un extracto bioactivo con un potencial aún mayor.

Diferentes fuentes de carbono fueron evaluadas de manera independiente para determinar cómo el metabolismo del carbono influye sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios bioactivos. En orden de la actividad de los extractos obtenidos las fuentes de carbono fueron H.A.>Mal>Glu>Alm=Lac>Gly. En este sentido, se observó que azúcares tipo disacáridos como la maltosa generan un incremento en la bioactividad de los metabolitos producidos por S13B3, como se puede apreciar en la figura 4-3. Allí es evidente que la maltosa incide en la producción de un extracto crudo con capacidad de inhibir el 50% del crecimiento del fitopatógeno (Concentración Inhibitoria 50 (C_{I50})) con una concentración 2,3 veces menor que los extractos obtenidos de la glucosa.

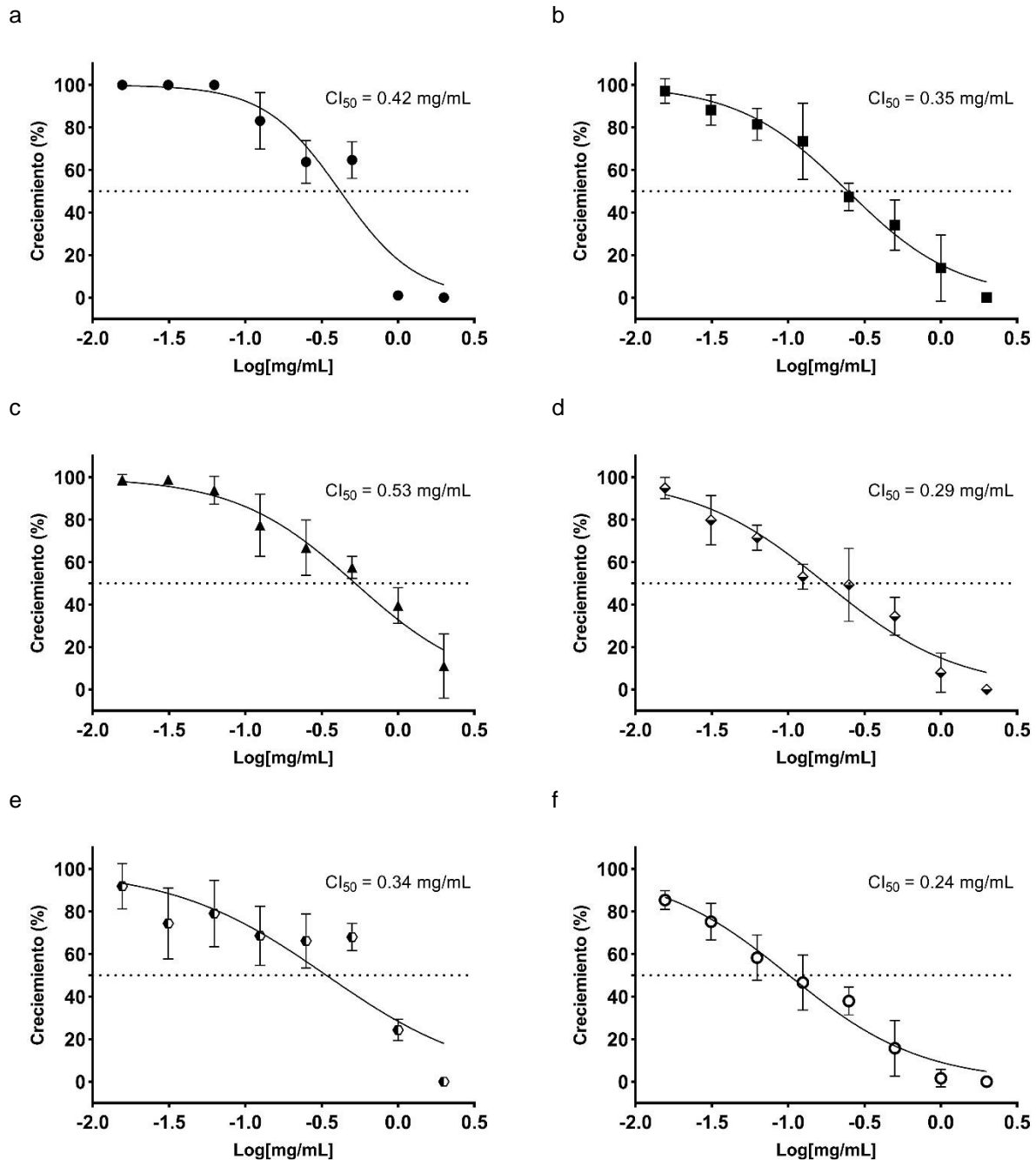


Figura 4-3. Efecto de la fuente de carbono sobre la actividad de extractos crudo de S13B3 sobre *B. glumae*. Extractos bacterianos: a. Glucosa (Glu); b. Almidón (Alm); c. Glicerol (Gly); d. Maltosa (Mal); e. Lactosa (Lac); f. Harina de arroz (H.A.). Fuente: autor.

En ese mismo sentido, la harina de arroz (H.A.) es un mejor sustrato para la producción de extractos bioactivos con CI₅₀ 1,8 y 1,2 veces más bajas frente a la glucosa y la maltosa, respectivamente (Figura 4-3), mostrando el potencial de esta fuente de carbono

para generar sustancias bioactivas. Lo anterior podría deberse a que la harina de arroz no solo aporta sacáridos al medio de cultivo, sino también, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas y minerales que favorecen el crecimiento celular y la generación de metabolitos secundarios responsables de la actividad observada (D. Chen, Xue, Chen, Li, & Wang, 2016). Este sustrato se ha empleado para potenciar la obtención de sustancias de interés de organismos como los actinomicetos frente patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Kocuria rhizophila* y *Escheriacia coli* (Prasetiyo, Santoso, & Maryanto, 2021), así como optimización de medios de cultivo para obtener enzimas de tipo lipasa por *Bacillus cereus* (Vasiee, Behbahani, Yazdi, & Moradi, 2016). Lo anterior, refuerza la idea que la harina de arroz es la fuente de carbono más adecuada para ser sujeto de optimización en la búsqueda de las condiciones ideales para promover la producción de metabolitos bioactivos de S13B3.

4.2.2 Fuente de nitrógeno.

El efecto de diferentes fuentes de nitrógeno, donde se incluyeron nitrógeno orgánico (urea, extracto de levadura (Y.E.) y harina de chachafruto (*Erythrina edulis*) (H.Cha)) y nitrógeno inorgánico (sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), nitrato de potasio (KNO₃), cloruro de amonio (NH₄Cl), fue evaluado sobre la generación de extractos crudos bioactivos de S13B3 y sus efectos sobre el fitopatógeno *B. glumae*.

En general, exceptuando la urea, las fuentes de nitrógeno orgánicas favorecieron la obtención de extractos crudos con mayor actividad, como se muestra en la figura 4-4. Estos sustratos generaron Cl₅₀ cinco veces menores que las obtenidas por las fuentes de nitrógeno inorgánicas. Además, se destaca el extracto de levadura (figura 4-4e), la cual permitió que la cepa S13B3 generara los extractos crudos con mayor actividad durante los ensayos realizados. Del mismo modo, la harina de chachafruto (figura 4-4f) presentó un comportamiento similar limitando el crecimiento *in vitro* de *B. glumae*, generando Cl₅₀ de 0,27 mg/mL en promedio.

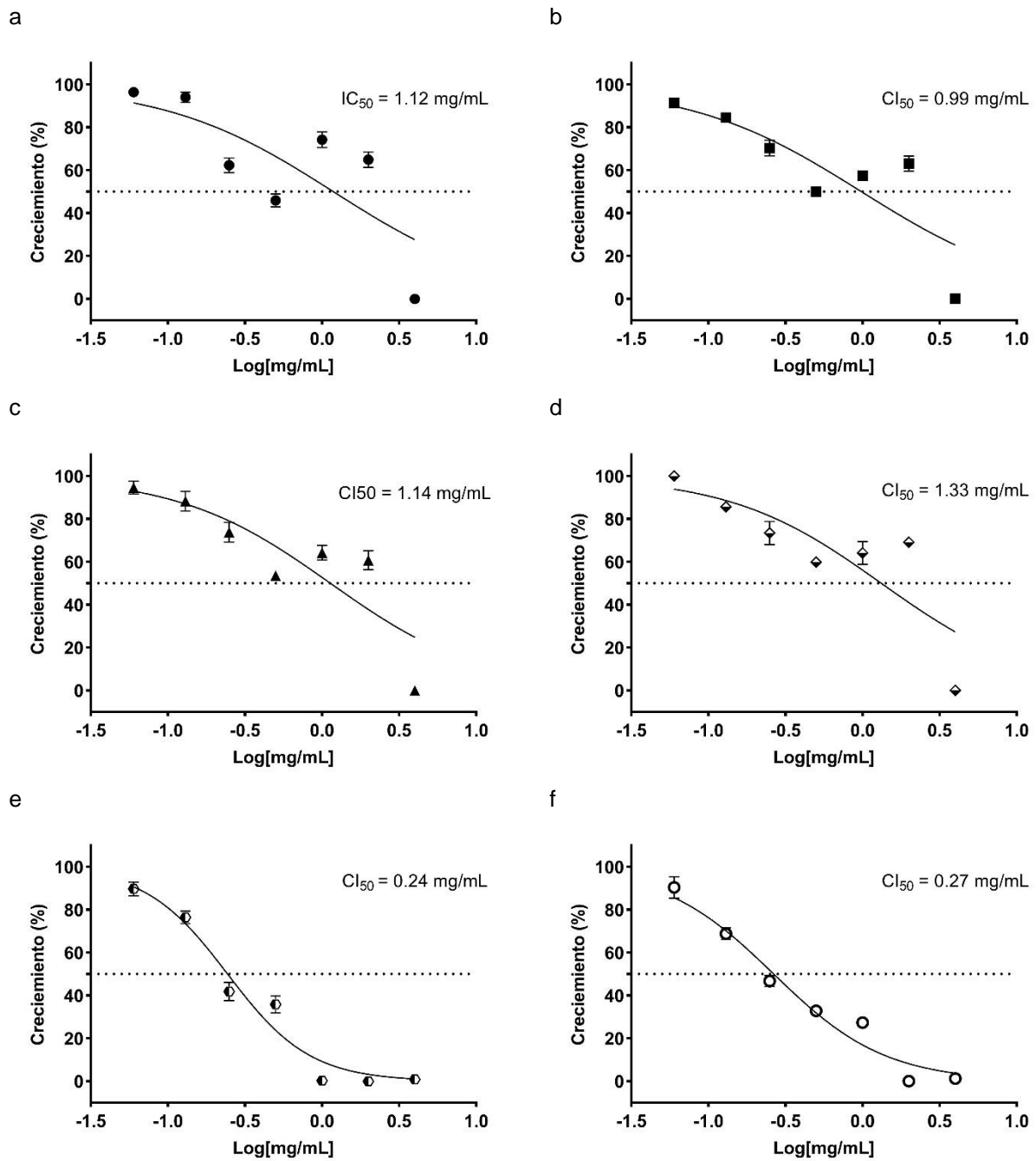


Figura 4-4. Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la actividad de extractos crudo de S13B3 sobre *B. glumae*. Extractos bacterianos: a. $(NH_4)_2SO_4$; b. KNO_3 ; c. NH_4Cl ; d. Urea; e. Extracto de levadura (Y.E.); f. Harina de chachafruto (*Erythrina edulis*) (H. Cha). Fuente: autor.

Después de la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno es la más abundante en los medios de fermentación, incluso algunos organismos solamente emplean nitrógeno

como fuente de energía (Kampen, 2014). Teniendo en cuenta lo anterior y los resultados obtenidos, algunos estudios han mostrado el efecto de fuentes de nitrógeno sobre la generación de metabolitos secundarios bioactivos, tal es el caso de Grahovac et al. (2014) quienes evaluaron diferentes sustratos sobre la producción de metabolitos producidos por *Streptomyces hygroscopicus*, obteniendo los extractos con mayor actividad los que contenían las proporciones más altas de extracto de levadura. Del mismo modo, estudios realizados en *E. coli* mostraron que unas mayores concentraciones de fuentes de nitrógeno orgánicas favorecen el crecimiento celular, específicamente el extracto de levadura, y aumenta la síntesis de metabolitos (Han et al., 2021).

Los resultados resaltados hasta aquí muestran el potencial del extracto de levadura, compuesta por aminoácidos, péptidos y vitaminas solubles en agua, que tienen una asimilación lenta en los procesos fermentativos, evitando las limitaciones por la concentración de nitrógeno en el medio (Barrios-González, 2018). Del mismo modo, lo observado con la harina de chachafruto y su tendencia a contribuir en la generación de CI_{50} bajas por parte de S13B3, podría suponer un fenómeno similar, debido a su contenido relativamente alto en proteínas (~20%) que aporta diversidad de aminoácidos tal como lisina, leucina, fenilalanina, triptófano, prolina, entre otros (Silva Gama, 2020), sin embargo no hay estudios encaminados en emplear este sustrato en procesos fermentativos que busquen generar sustancias bioactivas de bacterias del suelo. Los resultados alcanzados demuestran que tanto el extracto de levadura (Y.E.) y la harina de chachafruto (H.Cha) son fuentes de nitrógeno que promueven la obtención de extractos crudos bioactivos por parte de la cepa S13B3 en función de generar CI_{50} bajas, por tanto fueron incluidas en la optimización de las condiciones de cultivo.

El efecto antimicrobiano mostrado por la cepa S13B3 podrían explicarse gracias al aprovechamiento por parte de la bacteria de los sustratos suministrados. Por ejemplo, el aporte de sustratos ricos en aminoácidos (harina de arroz, extractos de levadura y harina de chachafruto) conllevan a la obtención de extractos crudos con mayor actividad y contrasta con los medios que no contienen dichos sustratos. Es bien conocido que las

rizobacterias tienen la capacidad de generar metabolitos de tipo indólico (Amer et al., 2021; P. Kumar, Lee, & Lee, 2021; Palmieri & Petrini, 2019) gracias a que poseen una gran capacidad para metabolizar el triptófano por diversas rutas metabólicas (Spaepen, Vanderleyden, & Remans, 2007). Sumado a lo anterior, el triptófano ha sido identificado como un precursor principal de las vías de biosíntesis de ácido indol acético en las bacterias (Spaepen et al., 2007). Como ya se mencionó, el indol y sus derivados pueden suprimir la patogénesis bacteriana por la capacidad de inhibir moléculas señalizadoras y la producción de factores de virulencia (J.-H. Lee et al., 2015). Adicionalmente, diversos estudios demuestran que el indol y sus derivados inhibieron tiene un efecto antimicrobiano importante frente a patógenos de interés (Aman & Rai V, 2016; Amer et al., 2021; Palmieri & Petrini, 2019; Rustamova et al., 2019).

4.2.3 Selección de condiciones de cultivo.

Basados en los resultados obtenidos en los ensayos realizados con diversas fuentes de carbono como de nitrógeno, se probó el modelo experimental Plackett-Burman para limitar el número de variables estudiadas, donde la corrida seis produjo el extracto con mayor actividad seguida de la corrida 4 (Tabla 4-1).

El análisis de varianza reveló un valor F de 2,42, un valor p de 0,047, así como una falta de ajuste no significativa (0,327), indicando que el modelo es significativo (Anexo B), sin embargo, el modelo requirió mejorar el ajuste. Por tanto, se procedió a realizar una selección de términos escalonada paso a paso con un nivel de significancia más amplio, que permitió aumentar la significancia del modelo (0,000) y mejorar el ajuste (61,92%). Los valores de p para los factores A, B, C fueron significativos, lo que indican que inciden sobre las CI_{50} s de los extractos evaluados, mientras que los demás factores no son significativos a un nivel de 95%. El diagrama de Pareto (figura 4-5) indica que los factores extracto de levadura (B) y harina de chachafruto (C) influyen en la obtención de extractos crudos con mayor bioactividad, mientras que la harina de arroz (A) genera CI_{50} más altas. La siguiente ecuación podría predecir las CI_{50} s derivada del modelo Plackett-Burman Eq 1:

$$\ln(CI_{50}) = -0,194 + 0,01756(H.A.) - 0,0438(Y.E.) - 0,0938(H.Cha) \quad (1)$$

Tabla 4-1. Diseño experimental y resultados del diseño Plackett-Burman (DPB) para CI_{50} de extractos crudos de S13B3.

Corrida	Variables									Actividad antimicrobiana	
	A	B	C	D	E	F	G	H	J	Act. CI_{50} (mg/mL)	Pred. CI_{50} (mg/mL)
	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	g/L	-		
1	2	10	0	0	0	0,5	0,05	0,5	6	0,41	0,52
2	11	5	2,5	1,5	3	0,35	0,035	0,25	7	0,77	0,69
3	11	5	2,5	1,5	3	0,35	0,035	0,25	7	0,63	0,69
4	2	0	5	3	6	0,2	0,05	0,5	6	0,27	0,47
5	2	0	0	0	0	0,2	0,02	0	6	1,19	0,99
6	2	10	5	0	6	0,2	0,02	0	8	0,24	0,44
7	11	5	2,5	1,5	3	0,35	0,035	0,25	7	0,52	0,69
8	20	0	0	0	6	0,5	0,05	0	8	0,82	1,14
9	2	10	0	0	0	0,5	0,05	0,5	6	0,36	0,52
10	2	10	5	0	6	0,2	0,02	0	8	0,36	0,44
11	2	0	0	3	6	0,5	0,02	0,5	8	1,00	0,98
12	20	10	0	3	0	0,2	0,02	0,5	8	0,59	0,75
13	2	10	5	3	0	0,5	0,05	0	8	0,44	0,30
14	11	5	2,5	1,5	3	0,35	0,035	0,25	7	0,64	0,69
15	20	10	0	3	6	0,2	0,05	0	6	0,78	0,71
16	11	5	2,5	1,5	3	0,35	0,035	0,25	7	0,70	0,69
17	2	0	0	3	6	0,5	0,02	0,5	8	1,03	0,98
18	20	0	0	0	6	0,5	0,05	0	8	1,41	1,14
19	20	0	5	0	0	0,2	0,05	0,5	8	0,85	0,66
20	20	10	0	3	0	0,2	0,02	0,5	8	0,87	0,75
21	20	0	5	3	0	0,5	0,02	0	6	0,63	0,81
22	20	0	5	3	0	0,5	0,02	0	6	0,72	0,81
23	2	0	0	0	0	0,2	0,02	0	6	1,08	0,99
24	11	5	2,5	1,5	3	0,35	0,035	0,25	7	0,73	0,69
25	20	10	5	0	6	0,5	0,02	0,5	6	0,60	0,47
26	20	10	5	0	6	0,5	0,02	0,5	6	0,63	0,47
27	2	0	5	3	6	0,2	0,05	0,5	6	0,63	0,47
28	20	0	5	0	0	0,2	0,05	0,5	8	0,54	0,66
29	2	10	5	3	0	0,5	0,05	0	8	0,46	0,30
30	20	10	0	3	6	0,2	0,05	0	6	0,70	0,71

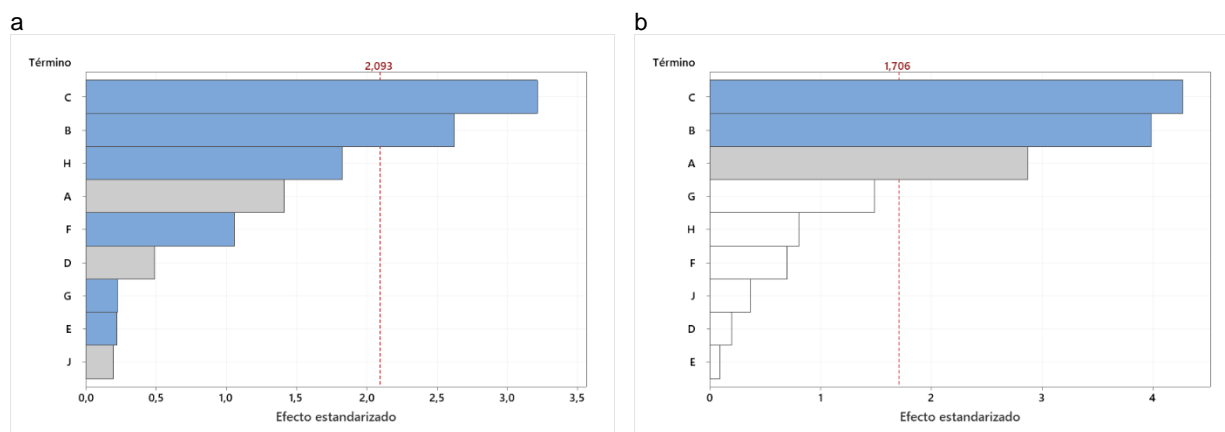


Figura 4-5. Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para DPB. a. $\alpha=0,05$; b. $\alpha=0,10$. A = H.A.; B = Y.E.; C = H. Cha; D = KH_2PO_4 ; E = Na_2HPO_4 ; F = $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; G = $MnSO_4 \cdot H_2O$; H = NaCl; J = pH. En azul los factores disminuyen la CI_{50} ; En gris los factores que aumentan la CI_{50} ; En blanco los factores que fueron excluidos del modelo. Fuente: autor.

Estos resultados refuerzan lo discutido en la sección anterior, donde se mencionó la relevancia de la fuente de nitrógeno sobre la generación de metabolitos secundarios bioactivos por parte de la cepa S13B3, resaltando la harina de chachafruto, que al aumentar su concentración en el medio de cultivo influye en la producción de metabolitos secundarios bioactivos (Anexo B). Por otra parte, algunos autores han descrito que algunos minerales como los empleados en el diseño Plackett-Burman inciden sobre la producción de dichos metabolitos, pero dicha influencia puede ser positiva o negativa (Manikandan, Gowdaman, Duraimurugan, & Prabakaran, 2019; Rajeswari, Jose, Amiya, & Jebakumar, 2015; Vasiee et al., 2016).

4.2.4 Optimización.

El efecto antimicrobiano de extractos crudos generados por la cepa S13B3 fue optimizado, con el fin de minimizar la CI_{50} a través de la metodología de superficie de respuesta del diseño Box – Behnken. Treinta y nueve experimentos fueron realizados con diferentes concentraciones de harina de arroz (A), extracto de levadura (B) y harina de chachafruto (C). Las respuestas obtenidas (Tabla 5-2) fueron calculadas con un modelo polinomio de segundo orden Eq. 2.

$$CI_{50} = 0,1749 - 0,0426 A + 0,0279 B - 0,0489 C + 0,00844 A^2 - 0,000921 B^2 + 0,005398 C^2 - 0,000272 A * B - 0,00101 A * C + 0,000113 B * C \quad (2)$$

Tabla 4-2. Diseño experimental y resultados del diseño Box-Behnken (DBB) para CI_{50} de extractos crudos de S13B3.

Corrida	Variables			Actividad antimicrobiana	
	A g/L	B g/L	C g/L	Act, CI_{50} (mg/mL)	Pred, CI_{50} (mg/mL)
1	2,5	5	10	0,30	0,27
2	2,5	20	2,5	0,22	0,21
3	2,5	12,5	6,25	0,23	0,22
4	0	12,5	10	0,38	0,44
5	5	12,5	10	0,39	0,38
6	2,5	5	2,5	0,14	0,14
7	5	20	6,25	0,23	0,22
8	5	12,5	2,5	0,25	0,26
9	2,5	12,5	6,25	0,23	0,22
10	0	12,5	10	0,53	0,44

11	5	5	6,25	0,18	0,16
12	2,5	20	10	0,38	0,35
13	0	12,5	2,5	0,31	0,29
14	0	12,5	2,5	0,35	0,29
15	0	20	6,25	0,30	0,28
16	2,5	5	2,5	0,10	0,14
17	5	5	6,25	0,15	0,16
18	0	20	6,25	0,26	0,28
19	5	20	6,25	0,19	0,22
20	2,5	5	2,5	0,18	0,14
21	0	5	6,25	0,16	0,20
22	0	12,5	2,5	0,23	0,29
23	0	5	6,25	0,22	0,20
24	2,5	5	10	0,21	0,27
25	5	12,5	2,5	0,23	0,26
26	2,5	20	2,5	0,21	0,21
27	2,5	12,5	6,25	0,19	0,22
28	5	20	6,25	0,25	0,22
29	2,5	20	2,5	0,23	0,21
30	0	5	6,25	0,22	0,20
31	5	12,5	2,5	0,28	0,26
32	2,5	5	10	0,25	0,27
33	0	20	6,25	0,26	0,28
34	5	5	6,25	0,19	0,16
35	5	12,5	10	0,36	0,38
36	2,5	20	10	0,33	0,35
37	5	12,5	10	0,37	0,38
38	0	12,5	10	0,46	0,44
39	2,5	20	10	0,34	0,35

El análisis de varianza (tabla 4-3) del modelo expuesto anteriormente fue significativo con un valor F de 22,34 un valor p de 0,000. El coeficiente de determinación R^2 muestra que dicho modelo explica la variabilidad del 87,39% y el R^2 ajustado de 83,48%, unos valores que ratifican la significancia del modelo obtenido. Por otra parte, los coeficientes de la regresión lineal presentan un gran impacto sobre la CI_{50} acorde a los valores p [$pA = (0,002)$, $pB = (0,000)$, $pC = (0,000)$], lo que indica que la harina de arroz, extracto de levadura y la harina de chachafruto tienen una incidencia elevada como sustrato sobre la bioactividad de los extractos crudos producidos por S13B3.

Sumado a los anterior, la harina de arroz favorece la obtención de valores bajos de CI_{50} , mientras que los factores B y C aumentan dichos valores. Los coeficientes cuadráticos fueron significativos y el efecto negativo del coeficiente B^2 determinó la tendencia a

obtener una Cl_{50} baja a medida que los valores del parámetro aumentaban y acrecentar la Cl_{50} a medida que los valores del parámetro disminuyeron por encima de lo definido.

El modelo matemático permitió obtener superficies de respuesta que tienen las variables independientes y la interacción de las mismas sobre la Cl_{50} , como se muestra en la figura 4-6, donde se aprecia la actividad mostrada por los extractos para cada par de variables y conservando la otra variable constante en la mitad de la concentración evaluada. Los valores óptimos sugeridos por el modelo fueron 2,88 g/L de harina de arroz, 5 g/L de extracto de levadura y 4,77 g/L de harina de chachafruto (anexo C).

Tabla 4-3. Análisis de varianza del diseño Box-Behnken (DBB).

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	0,271093	87,39%	0,271093	0,030121	22,34	0,000
Lineal	3	0,151249	48,76%	0,151249	0,050416	37,39	0,000
A (H.A)	1	0,015504	5,00%	0,015504	0,015504	11,50	0,002
B (Y.E)	1	0,032516	10,48%	0,032516	0,032516	24,12	0,000
C (H.Cha)	1	0,103228	33,28%	0,103228	0,103228	76,56	0,000
Cuadrado	3	0,118339	38,15%	0,118339	0,039446	29,26	0,000
A ² (H.A*H.A)	1	0,019100	6,16%	0,019059	0,019059	14,14	0,001
B ² (Y.E*Y.E)	1	0,059732	19,26%	0,018396	0,018396	13,64	0,001
C ² (H.Cha*H.Cha)	1	0,039507	12,74%	0,039507	0,039507	29,30	0,000
Interacción de 2 factores	3	0,001506	0,49%	0,001506	0,000502	0,37	0,774
H.A*Y.E	1	0,000311	0,10%	0,000311	0,000311	0,23	0,635
H.A*H.Cha	1	0,001074	0,35%	0,001074	0,001074	0,80	0,380
Y.E*H.Cha	1	0,000121	0,04%	0,000121	0,000121	0,09	0,767
Error	29	0,039101	12,61%	0,039101	0,001348		
Falta de ajuste	3	0,002484	0,80%	0,002484	0,000828	0,59	0,628
Error puro	26	0,036616	11,80%	0,036616	0,001408		
Total	38	0,310194	100,00%				

La metodología aplicada permitió optimizar la concentración a la cual se generan extractos crudos con mayor actividad, representas en Cl_{50} pequeñas, mostrando una disminución de 1,71 veces comparada con las obtenidas antes de la optimización. Estudios han mostrado el potencial de este tipo de metodologías para aumentar hasta en 250 veces el rendimiento de la producción de metabolitos secundarios de *Pseudomonas aeruginosa* LV (Bedoya et al., 2019). Así mismo, Ahsan et al., (2017) emplearon una metodología de superficie de respuesta que permitió obtener las concentraciones del medio de cultivo para aumentar la producción de metabolitos secundarios por parte de *Streptomyces diastatochromogenes* KX852460 frente al fitopatógeno *Rhizoctonia solani* AG-3. Además, se optimizó la producción de un

exopolisacárido con actividad para promover el crecimiento de plantas por parte de cepa *Kosakonia cowanii* LT-1 empleando un diseño Box- Behnken, el cual aportó información sobre la combinación de los factores evaluados (Gao et al., 2020). Los resultados obtenidos en este estudio señalan que fuentes poco convencionales en los medios de cultivos pueden ser sustratos valiosos para contribuir en la producción de metabolitos secundarios bioactivos por parte de bacterias obtenidas de la rizósfera del cultivo de arroz.

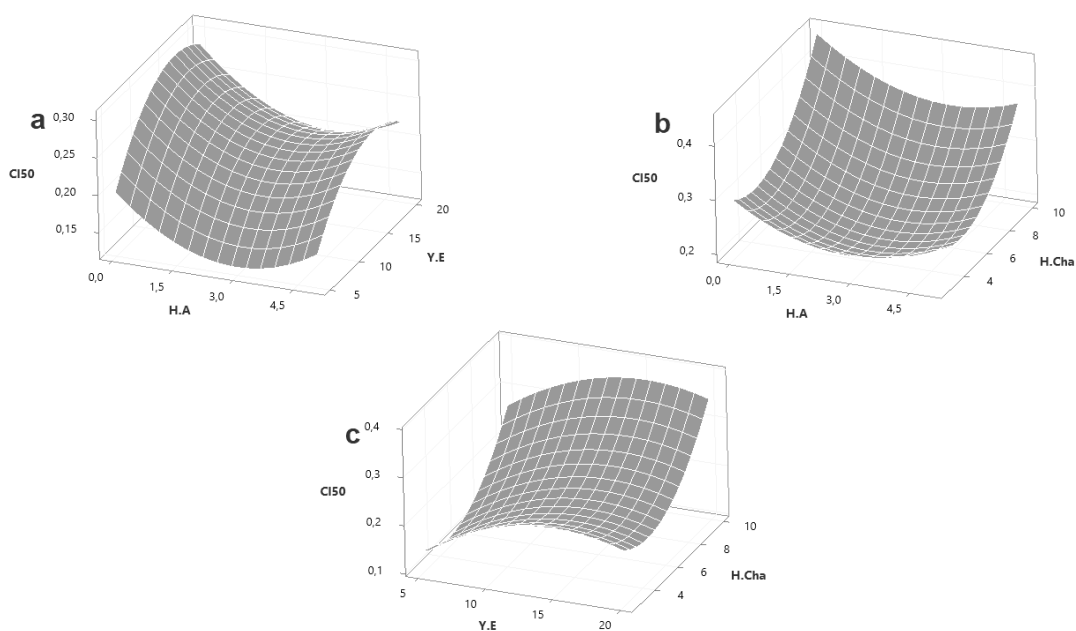


Figura 4-6. Superficie de respuesta para CI_{50} de extractos crudos de S13B3. Los gráficos tridimensionales muestran la influencia de (a) extracto de levadura (Y.E) y harina de arroz (H.A), (b) harina de chachafruto (H.Cha) y harina de arroz, y (c) harina de chachafruto y extracto de levadura sobre la CI_{50} de extractos crudos de S13B3.

4.3 CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

4.3.1 Cromatografía flash.

Se evaluaron extractos crudos previos a la optimización y extractos optimizados (figura 4-7). Un total de seis fracciones fueron obtenidas, las cuales se etiquetaron como F1, F2, F3 (no optimizadas) y F1 Op, F2 Op, F3 Op (optimizadas). Las muestras fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que se evaluó su bioactividad y se llevó a cabo la caracterización química. En los dos momentos se pudo apreciar que la primera fracción

presentó un mayor peso, aproximadamente un 31% del contenido total del extracto crudo.

En el caso del extracto optimizado, la segunda fracción representó un 10% y la tercera fracción un 22%. Adicionalmente, los ensayos antimicrobianos mostraron que las fracciones 1 presentan porcentajes de inhibición del 100% frente a *B. glumae* con concentraciones ocho veces menores que la de un extracto crudo, lo que indica que los metabolitos bioactivos generados por la rizobacteria poseen una polaridad no muy elevada al observarse en las cromatografías de capa delgada en la parte superior del corrido cromatográfico, como se aprecia en las cromatografías de capa delgada (figura 4-8).



Figura 4-7. Cromatografía flash de extractos crudos de S13B3. Fuente: autor.

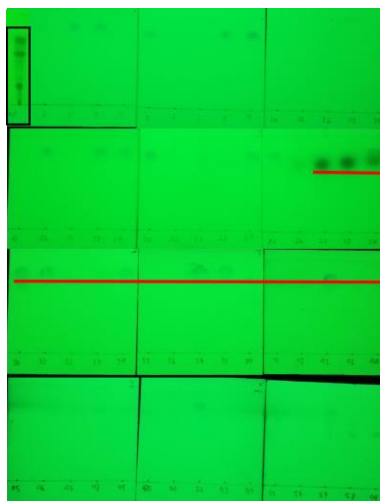


Figura 4-8. Cromatografías en capa delgada de fracciones del extracto crudo generado por la cepa S13B3. En el recuadro negro se remarca el extracto crudo y en rojo se señala la fracción 1 del extracto bioactivo generado por la cepa S13B3. Fuente: autor.

4.3.2 Resonancia magnética nuclear (RMN).

El proceso de elucidación estructural comenzó con la comparación de los diferentes espectros de RMN de protón de la fracción bioactiva; se analizaron las diferentes regiones del mismo, junto con los espectros de carbono 13 y bidimensionales (COSY; HSQC; HMBC). Se seleccionan todas las características estructurales observadas (segmentos de la molécula) y con esta información se propuso la estructura del compuesto predominante en F1.

El espectro ^1H muestra claramente 6 señales, todas en la región de aromáticos y vinílicos (^1H RMN (300 MHz, MeOD) δ 7,55 (d, $J = 7,7$ Hz, 1H); 7,38 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H); 7,21 (d, $J = 3,3$ Hz, 1H); 7,09 (t, $J = 6,8$ Hz, 1H); 7,00 (t, $J = 7,0$ Hz, 1H); 6,44 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H)). Se observa que el anillo aromático es un sistema orto sustituido. Las multiplicidades para este son doblete-triplete-triplete-doblete (observado claramente en el experimento COSY) y un doble enlace con un H sobre cada carbono del doble enlace (H(A) – H(B)), como se observa en la tabla 4-4 y en las figuras 4-9; 4-11.

Tabla 4-4. Análisis espectro de resonancia magnética nuclear ^1H fracción 1 (bioactiva).

	Nombre	Desplazamiento	H's	Integral	Clase	J's
1	F (d)	7,38	1	1,00	d	8,03

2	E (d)	7,55	1	1,00	d	7,69
3	D (t)	7,09	1	1,00	t	6,82, 6,82
4	C (t)	7,00	1	1,00	t	6,96, 6,96
5	B (d)	7,21	1	1,00	d	3,28
6	A (d)	6,44	1	1,00	d	2,84

Multiplicidad entre paréntesis. d=doblete; t=triplete.

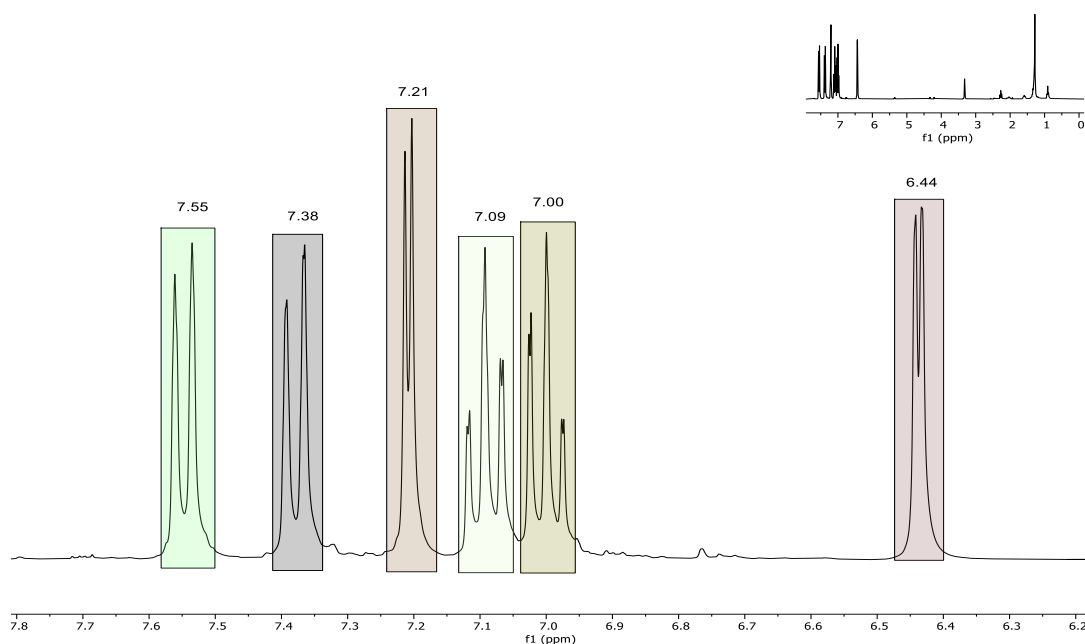


Figura 4-9. Espectro de resonancia magnética nuclear ^1H fracción 1 (bioactiva).

Por otro lado, en los experimentos de carbono 13 se observan 8 señales, 2 de ellas con menor intensidad (δ 137,60, 129,38) lo que indica que son carbonos cuaternarios, esto último verificado con el DEPT. 6 señales corresponden a carbonos metinos (CH) cada señal de carbono se corresponde con una señal de protones. ^{13}C NMR (75 MHz, MeOD) δ 137,6; 129,4; 125,4; 122,1; 121,1; 119,9; 112,1; 102,2.

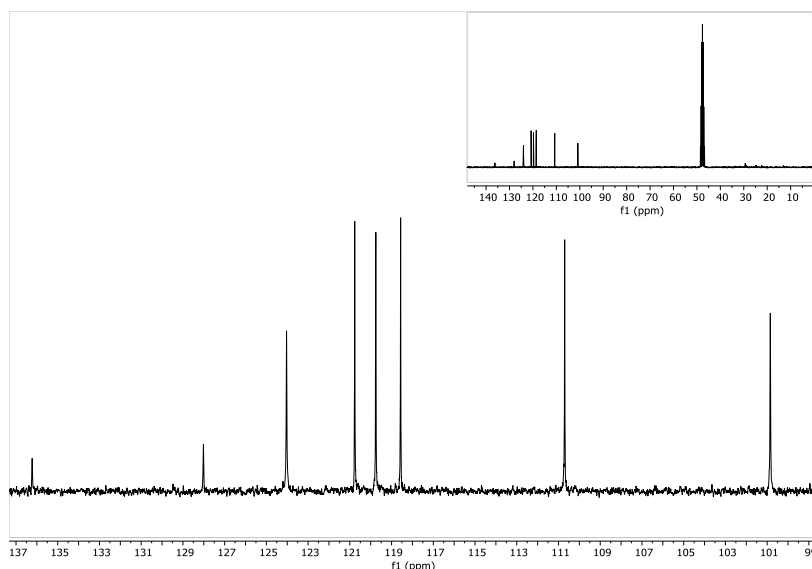


Figura 4-10. Espectro de resonancia magnética nuclear ^{13}C fracción 1 (bioactiva).

Los experimentos COSY H-H (COrelated SpectroscopY) permitieron determinar qué señales surgen de los protones vecinos y da como resultado los sistemas de spin que se muestran en la figura 4-11.

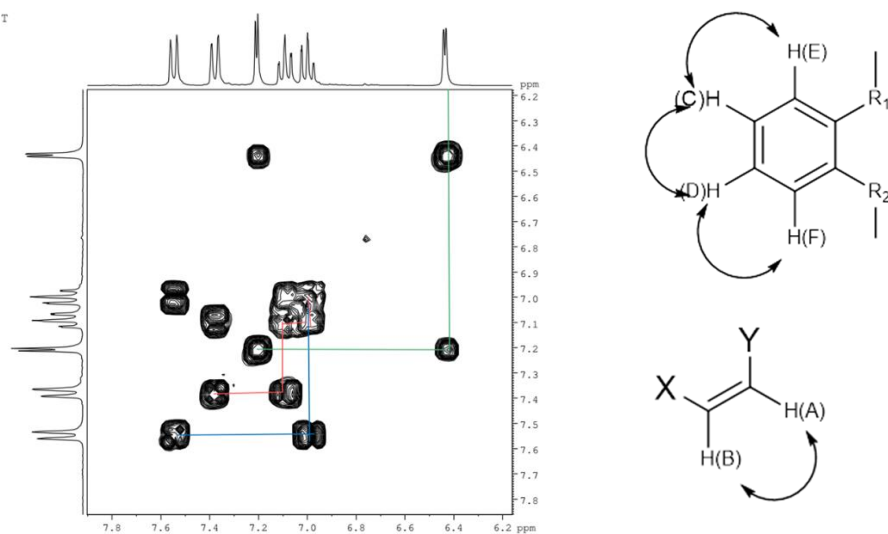


Figura 4-11. Espectro COSY H-H y sistemas spin resultantes para fracción 1 (bioactiva).

El experimento bidimensional HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) se usó para determinar las correlaciones de enlace simple protón-carbono, donde los protones se encuentran a lo largo del eje F2 (X) observado y los carbonos están a lo largo del eje F1 (Y), ver figura 4-12.

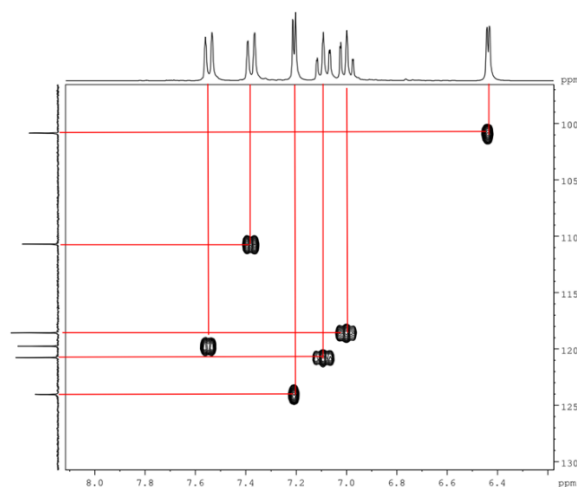
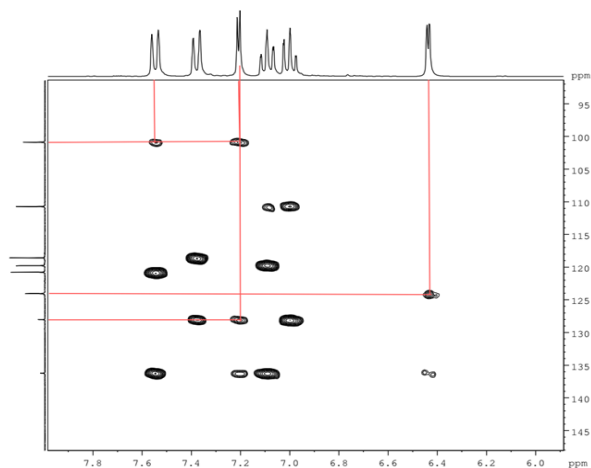


Figura 4-12. HSQC. Correlación C – H de fracción 1 (bioactiva). Eje X espectro ^1H ; eje Y espectro ^{13}C . Las líneas en rojo señalan la correlación entre el átomo de hidrógeno y el átomo de carbono.

Del mismo modo, la correlación C-H a larga distancia 3 enlaces (en ocasiones 2 o 4 enlaces) mediante HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), muestra claramente que hay correlaciones entre los protones del sistema H(A) – H(B) con los carbonos aromáticos y de los protones aromáticos con los carbonos H(A) – H(B), esto indica que dicho sistema está conectado al anillo aromático. En la estructura se representa con flechas las correlaciones representativas en HMBC que indican la conexión entre los dos sistemas de spin (figura 4-13 (b)).

a



b

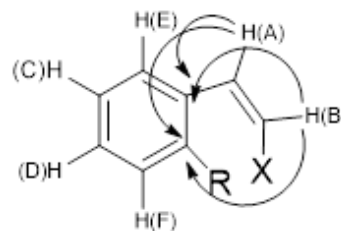


Figura 4-13. HMBC. Correlación C – H a larga distancia de fracción 1 (bioactiva) a. Eje X espectro ^1H ; eje Y espectro ^{13}C . Las líneas en rojo señalan la correlación entre el átomo de hidrógeno y el átomo de carbono.

Considerando que el compuesto proviene de extractos generados por una cepa bacteria obtenida de la rizósfera del cultivo de arroz, y basados en la información arrojada por los diferentes experimentos de RMN 1D y 2D se propone como hipótesis estructural la molécula que se muestra en la figura 4-14. Los compuestos de tipo indólico son muy comunes en los sistemas biológicos por lo que es muy probable que X corresponda al nitrógeno (P. Kumar et al., 2021; X. Wang et al., 2017), esto se puede verificar usando la espectrometría de masas. Finalmente, en la fracción 1 presenta algunas características similares al indol, el patrón de sustitución es similar con desplazamientos químicos diferentes, parece estar sustituido en la posición 3 como es usual en los compuestos de tipo indólico, sin embargo, se evidencian una gran cantidad de impurezas que hacen imposibles extraer más información del espectro, como se puede apreciar en el anexo D.

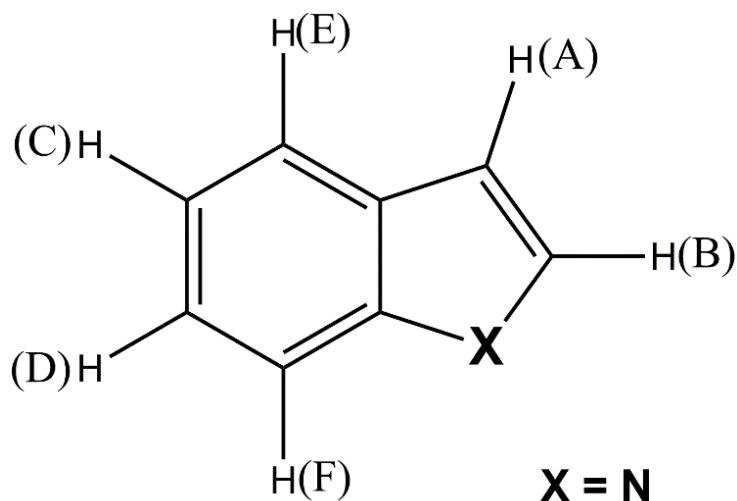


Figura 4-14. Estructura compuesto mayoritario en la fracción bioactiva 1 (F1).

4.3.3 Cromatografía líquida de alta resolución (HRLC-MS).

En la búsqueda de la región con m/z 118 – 119 en modo positivo, se encontró un pico de intensidad grande de masa 118,0650, consistente con el ion $M+H^+$ C_8H_8N (calc. 118,0651) en prácticamente todas las muestras, tal como se muestra en la figura 4-15.

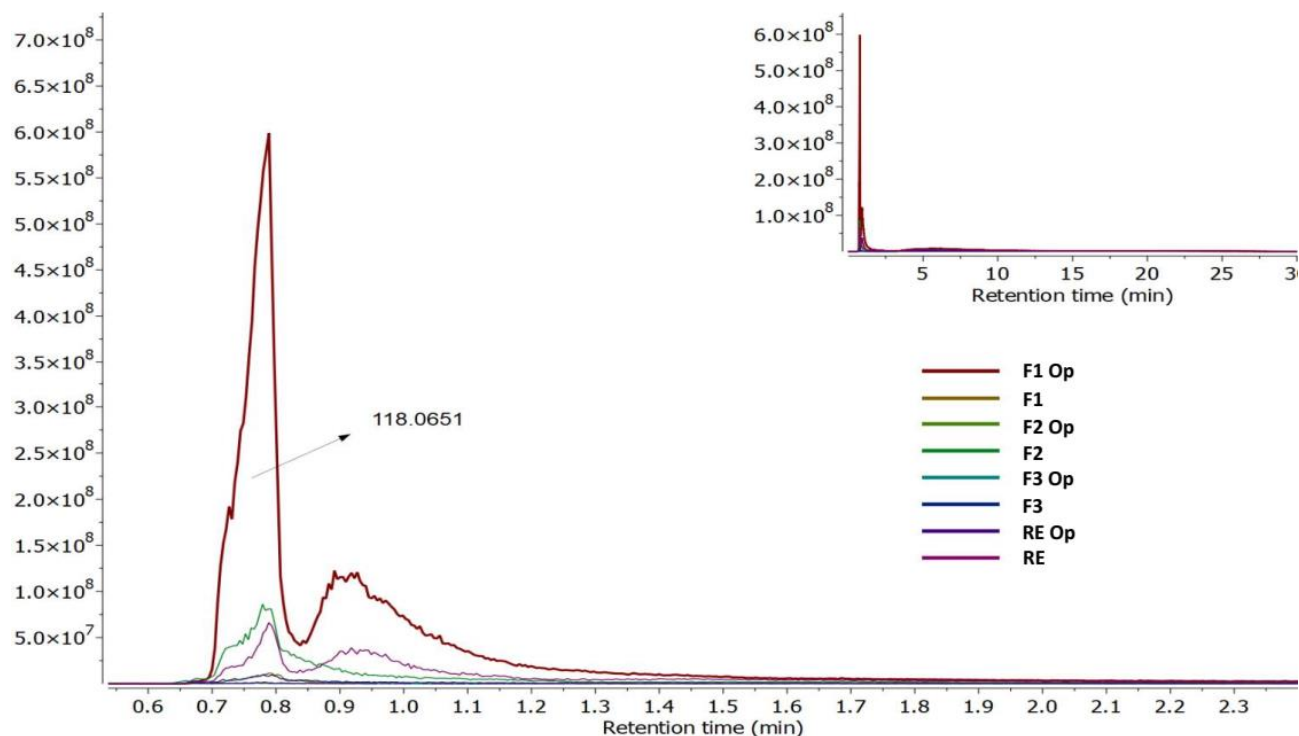


Figura 4-15. Pico basado en la región comprendida entre 118 – 119 m/z. F1 Op: fracción 1 optimizada; F1: fracción 1; F2 Op: fracción 2 optimizada; F2: fracción 2; F3 Op: fracción 3 optimizada; F3: fracción; RE Op: extracto crudo optimizado; RE: extracto crudo.

Los resultados obtenidos muestran una relación directamente proporcional entre la bioactividad de las fracciones y los extractos crudos evaluados, con el aumento del indol (118.0650, consistente con el ion $M+H^+$ C_8H_8N) en las muestras evaluadas frente a *B. glumae*. Según se mencionó anteriormente, al concentrar el derivado indólico en la fracción 1 optimizada, se obtiene una bioactividad ocho veces mayor que la que presentó el extracto crudo. Por otro lado, la optimización permitió obtener las condiciones ideales para que la cepa S13B3 genere una mayor producción de metabolitos bioactivos.

Asociado a lo anterior, el efecto de comunidades bacterianas aislada de suelos orgánicos ha generado la supresión de la enfermedad generada por fitopatógenos (Ando et al., 2022). Dentro de los géneros más representativos se encuentra *Streptomyces* que ha sido ampliamente estudiado, generando un gran número de moléculas bioactivas frente a fitopatógenos del cultivo de arroz, entre ellos *B. glumae* (Betancur et al., 2020; Ngalimat et al., 2021; Suárez-Moreno et al., 2019). Sin embargo, algunas familias menos

estudiadas como las *Enterobacteriaceae*, pero con gran relevancia en la rizósfera de las plantas, son generadores de metabolitos bioactivos (Cernava et al., 2019; Ji et al., 2020). Especialmente, se ha reportado que algunas cepas presentan la habilidad de biotransformar el indol en compuestos de interés (Qu et al., 2015).

En el caso de metabolitos bioactivos derivados del indol se destaca el estudio realizado por Amer et al. (2021), donde se inhibió el crecimiento de *Proteus mirabilis*, un patógeno de las vías urinaria, tal efecto fue generado por dos rizobacterias del género *Enterobacter* Zch127 y Cbg70 aisladas de suelo de *Cucurbita pepo* (Calabacín) y *Brassica oleracea* var. capitata L. (Col), respectivamente. Metabolitos de naturaleza similar fueron caracterizados en extractos producidos por *Pantoea ananatis* 4G-9, generaron un fuerte efecto antimicrobiano frente a *Mycosphaerella musicola* (Aman & Rai V, 2016). Además, cinco derivados indólicos (1H-indol-7-ol, triptofol, ácido 3-indolpropiónico, triptófano, 3,3-di(1H-indol-3-il) propano-1,2-diol) procedentes de *Pantoea ananatis* VERA8, presentaron bioactividad frente a células B16 (Rustamova et al., 2019). Así mismo, Peñaloza et al. (2020) realizaron estudios sobre el efecto de extractos generados por cepas de *Enterobacter tabaci* sobre *B. glumae*, donde en el perfil metabolómico fueron identificados algunos metabolitos de naturaleza indólica como triptofol, proveniente de la ruta del triptófano, el cual ha mostrado bioactividad frente a patógenos de interés clínico como *Campylobacter jejuni* (Palmieri & Petrini, 2019).

4.4 ANÁLISIS GENÓMICO

Los datos crudos producto del secuenciamiento fueron procesados y se les evaluó la calidad con la herramienta FastQC. Se pudo comprobar que la calidad de los reads es buena, como se puede apreciar en el anexo E. Posteriormente, los datasets R1 y R2 fueron concatenados. Con los datos concatenados se realizó el ensamblaje empleando la herramienta SPADES, obteniendo así los contigs y los scaffolds. El resultado del ensamblaje generó 73 contigs, con una longitud de 4.899.359 pares de bases y un contenido promedio de G+C de 55%.

4.4.1 Anotación del genoma de S13B3.

El genoma de la cepa bacteriana caracterizada inicialmente como *Kosakonia* sp., pertenece al dominio Bacteria y la taxonomía que le corresponde es la siguiente:

Organismos celulares > Bacteria > Proteobacteria > Gammaproteobacteria > Enterobacterales > Enterobacteriaceae > Enterobacter.

Este genoma tiene 4.606 secuencias codificantes de proteínas (CDS), 87 genes de ARN de transferencia (ARNt) y 12 genes de ARN ribosómico (ARNr). La anotación incluye 531 proteínas hipotéticas y 4.075 proteínas con asignaciones funcionales. Estas proteínas incluyen 1.278 enzimas con números de la comisión de enzimas (EC numbers) (Schomburg et al., 2004), 1.048 con ontología de genes (GO) (Ashburner et al., 2000) y 914 proteínas que se asignaron a rutas en la base de datos KEGG (Kanehisa, Sato, Kawashima, Furumichi, & Tanabe, 2015).

Adicionalmente, la plataforma PATRIC permitió la anotación dos tipos de familias de proteínas (Davis et al., 2016), el cual presenta 4.484 proteínas que pertenecen a la familia de proteínas específicas del género (PLFams) *Enterobacter* y 4.514 proteínas que pertenecen a la familia de proteínas de género cruzado (PGFams). Adicionalmente, se obtuvo un subsistema, el cual es un conjunto de proteínas que juntas implementan un proceso biológico específico o un complejo estructural (Overbeek et al., 2005), y la anotación PATRIC incluye un análisis de los subsistemas exclusivos de cada genoma. En la figura 4-16 se proporciona una descripción general de los subsistemas del genoma de S13B3. El número de ARN ribosómicos y ARN de transferencia es típico de las bacterias del suelo que responden rápidamente a la disponibilidad de nutrientes en constante cambio. Características similares han sido reportadas en otros integrantes de la familia *Enterobacteriaceae* (Andrés-Barrao et al., 2017).

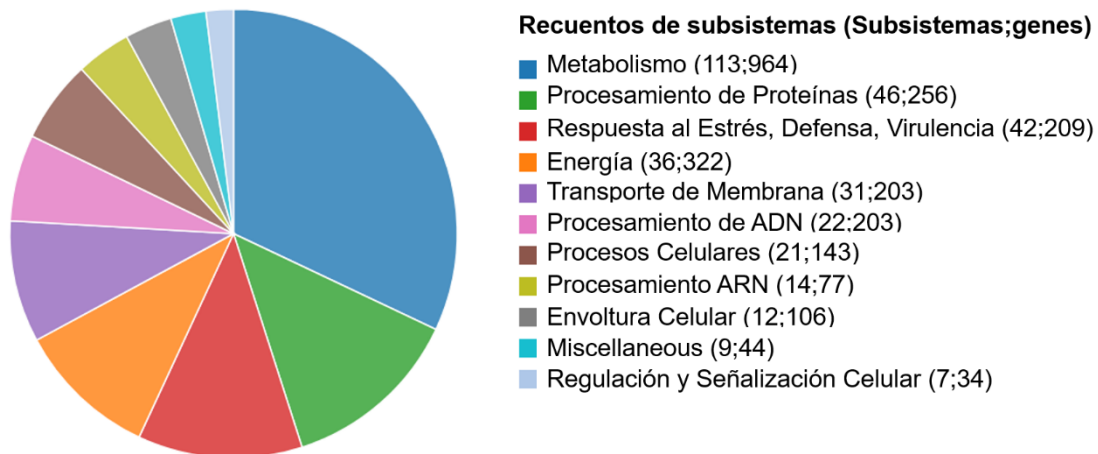


Figura 4-16. Subsistemas anotados en el genoma de la cepa S13B3.

En la figura 4-17 se proporciona una visualización gráfica circular de la distribución de las anotaciones del genoma. Esto incluye, de los anillos externos a los internos, los contigs, CDS en la cadena directa (forward), CDS en la cadena inversa (reverse), genes de ARN, CDS con homología con genes de resistencia antimicrobianos conocidos, CDS con homología para conocer factores de virulencia, contenido de GC y sesgo de GC. Los colores del CDS en la cadena directa e inversa indican el subsistema al que pertenecen estos genes presentados en la figura 4-16.

- Genes especiales. Algunos de los genes anotados tienen homología con transportadores conocidos (Saier et al., 2015), factores de virulencia (Lihong Chen, Zheng, Liu, Yang, & Jin, 2015; Mao et al., 2014), dianas farmacológicas (Law et al., 2013; Zhu et al., 2009) y genes de resistencia a antibióticos (McArthur et al., 2013). En la tabla 4-5 se proporciona el número de genes y la base de datos fuente específica donde se encontró la homología.
- Genes de resistencia a los antimicrobianos. Algunos genes asociados a resistencia antibiótica fueron anotados en el genoma de S13B3. Se debe mencionar que la presencia de genes relacionados con resistencia antibiótica no implica que el organismo sea resistente a los antibióticos. En la tabla 4-6 se presentan algunos de los mecanismos de resistencia a los antibióticos en S13B3.

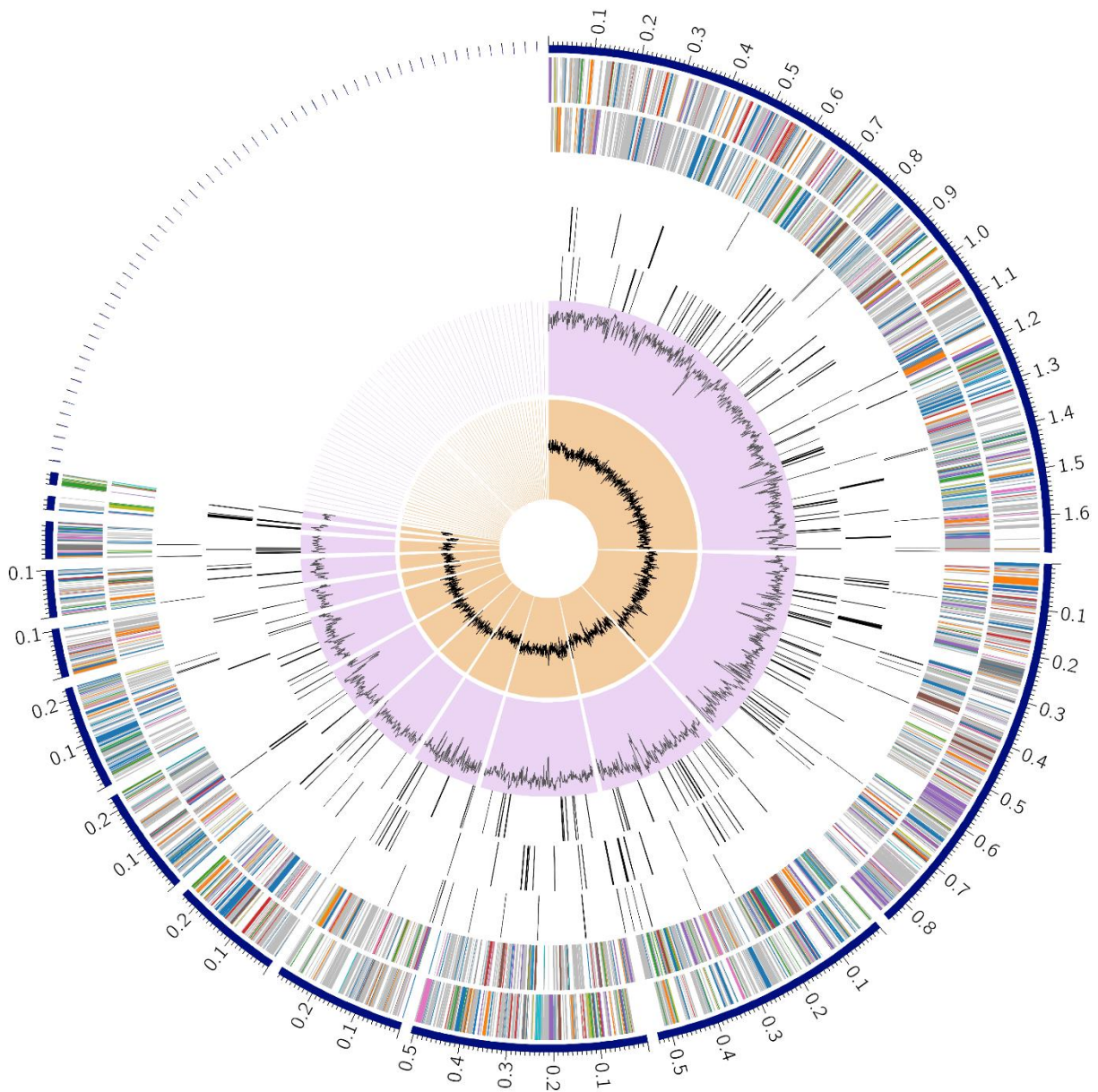


Figura 4-17. Distribución de las anotaciones del genoma de S13B3.

Tabla 4-5. Genes especiales anotados en el genoma de S13B3.

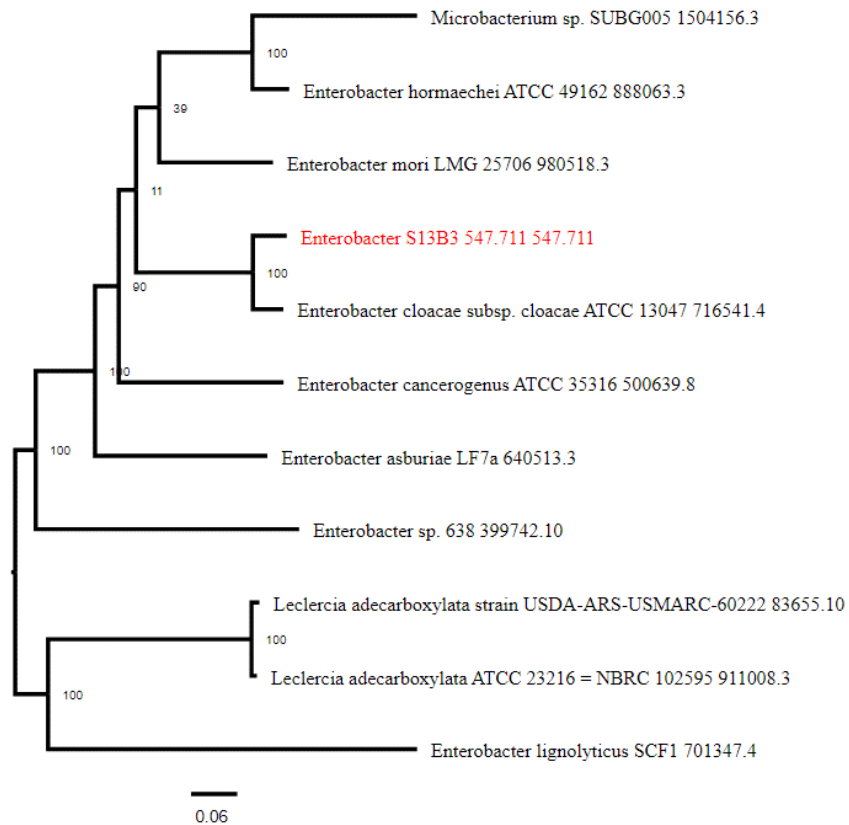
Función	Fuente	Genes
Resistencia antibiótica	CARD	58
Resistencia antibiótica	NDARO	4
Resistencia antibiótica	PATRIC	66
Dianas farmacológicas	DrugBank	311
Dianas farmacológicas	TTD	56
Transporte	TCDB	569
Factor de virulencia	PATRIC_VF	120
Factor de virulencia	VFDB	23
Factor de virulencia	Victors	149

Tabla 4-6. Genes de resistencia a los antimicrobianos.

Mecanismo	Genes
Enzima de activación de antibióticos	KatG
Enzima de inactivación de antibióticos	Familia CMH
Clúster, casete u operón de genes de resistencia a antibióticos	MarA, MarB, MarR
Blanco de antibióticos en especies susceptibles	Alr, Ddl, dxr, EF-G, EF-Tu, folA, Dfr, folP, gyrA, gyrB, inhA, fabI, Iso-tRNA, kasA, MurA, rho, rpoB, rpoC, S10p, S12p
Proteína de protección de la diana antibiótica	BcrC
Bomba de eflujo que confiere resistencia a los antibióticos	AcrAB-TolC, AcrAD-TolC, AcrEF-TolC, AcrZ, EmrAB-TolC, EmrD, MacA, MacB, MdfA/Cmr, MdtABC-TolC, MdtL, SugE, TolC/OpmH
Gen que confiere resistencia por ausencia	gidB
Proteína que altera la carga de la pared celular que confiere resistencia a los antibióticos	GdpD, PgsA
Proteína moduladora la permeabilidad a los antibióticos	OccD6/OprQ, OprB
Regulador que modula la expresión de genes de resistencia a antibióticos	AcrAB-TolC, EmrAB-TolC, H-NS, OxyR

- Análisis filogenético. El análisis filogenético reveló que la cepa previamente identificada como *Kosakonia* sp S13B3 mediante la comparación de secuencias 16s del gen rADN, pertenece al género *Enterobacter*, como se aprecia en la figura 4-18. La cepa S13B3 tiene cercanía con la cepa *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047. Este tipo de reclasificaciones son comunes en géneros tan cercanos como *Kosakonia* y *Enterobacter*, y es posible que existan secuencias en bases de datos reportadas como *Kosakonia* que en realidad correspondan a *Enterobacter* (Brady, Cleenwerck, Venter, Coutinho, & De Vos, 2013). En este sentido, al emplear secuencias más específicas para una familia tan amplia como la *Enterobacteriaceae* se obtienen aproximaciones más robustas que permiten llegar a la reclasificación de la cepa S13B3, en adelante *Enterobacter cloacae* S13B3.

Figura 4-18. Árbol filogenético de *Enterobacter cloacae* S13B3.



4.5 PREDICCIÓN DE GENES

4.5.1 Genes potenciales asociados al crecimiento de las plantas.

La anotación del genoma de *E. cloacae* S13B3 reveló diferentes genes que contribuyen directa o indirectamente en la capacidad que podría tener la cepa S13B3 como promotor del crecimiento vegetal, tal como se indica en la tabla 4-7.

En la anotación del genoma, diferentes genes relacionados con la biosíntesis de sideróforos fueron identificados. Estos incluyen síntesis y transporte de enterobactina (*entC*), transportadores ABC de hierro-enterobactina/sideróforo (*fepB*, *fepC*, *fepD*, *fepG*), transportador ABC de hidroxamato de hierro (*fhuC*). También presenta genes *trp* (*trpA*, *trpB*) implicados en la biosíntesis del triptófano, usado en diversos procesos biológicos, incluida la producción de ácido indol acético (AIA) (Ghosh, Ghosh, & Maiti, 2011; Hayat et al., 2010). Este análisis también incluye grupos de genes que harían posible la

solubilización de fosfato y potasio, como se demostró en el estudio de Peñaloza Atuesta et al. (2020) empleando dos cepas de *Enterobacter*.

Tabla 4-7. Genes potencialmente asociados con rasgos promotores del crecimiento vegetal (PGP) en el genoma de *E. cloacae* S13B3.

Función	Gen	Descripción
Producción de sideroforos	<i>fepB</i>	Proteína periplásmica de unión a enterobactina férrica FepB
	<i>entS</i>	Exportador de enterobactina EntS
	<i>fepD</i>	Permeasa del transportador ABC del sideróforo Fe ³⁺
	<i>fepG</i>	Permeasa transportadora ABC de hierro-enterobactina
	<i>fepC</i>	Proteína de unión a ATP del transportador ABC de enterobactina de hierro
Producción de AIA	<i>fhuC</i>	Transportador ABC Proteína de unión a ATP Fe ³⁺ -hidroxamato FhuC
	<i>trpB</i>	Subunidad beta de triptófano sintasa
	<i>trpA</i>	Subunidad alfa de la triptófano sintasa
Solubilización de fosfato	<i>phoU</i>	Proteína del complejo de señalización de fosfato PhoU
	<i>pstB</i>	Transportador de fosfato ABC proteína de unión a ATP PstB
	<i>pstA</i>	Transportador de fosfato ABC permeasa PstA
	<i>pstC</i>	Permeasa transportadora ABC de fosfato PstC
	<i>pstS</i>	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC de fosfato PstS
	<i>phoA</i>	Fosfatasa alcalina
	<i>ppk1</i>	Polifosfato quinasa 1
	<i>glpT</i>	Transportador de glicerol-3-fosfato
	<i>gapA</i>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
	<i>uhpT</i>	Hexosa-6-fosfato:antiportador de fosfato
	<i>phnC</i>	Proteína de unión a ATP del transportador ABC de fosfonato
	<i>phnD</i>	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC de fosfonato
	<i>phnE</i>	Transportador de fosfonato ABC, proteína permeasa PhnE
	<i>trkH</i>	Sistema Trk transportador de potasio TrkH
	<i>kup</i>	Transportador de potasio de baja afinidad Kup
Solubilización de potasio	<i>kefG</i>	Proteína auxiliar del sistema de salida de potasio regulada por glutatión
	<i>kefB</i>	Proteína del sistema de salida de potasio regulada por glutatión KefB
	<i>trkA</i>	Sistema Trk transportador de potasio TrkA
	<i>kdpB</i>	Subunidad KdpB de la ATPasa transportadora de potasio
	<i>kefC</i>	Proteína del sistema de salida de potasio regulada por glutatión KefC
Metabolismo del nitrógeno	<i>kefF</i>	Sistema de salida de potasio regulado por glutatión
	<i>glnG</i>	Proteína reguladora de nitrógeno NR(I)
Reducción de nitrito/nitrato	<i>narK</i>	Transportadora de nitrato / nitrito NarK

4.5.2 Genes potenciales asociados a metabolitos secundarios.

La búsqueda de metabolitos secundarios con posible actividad antimicrobia fue realizado a través de la plataforma The antibiotics & Secondary Metabolite Analysis Shell (antiSMASH ver. 6.1.1) (Blin et al., 2021). El análisis *in silico* del genoma de *E. cloacae* S13B3 revela la presencia de algunos grupos de genes asociados a la biosíntesis de metabolitos secundarios como tiopéptidos, péptidos no ribosomales (NRPS), siberóforos, polienos de arilo e híbridos de policétidos y péptidos no ribosomales, como se aprecia en la tabla 4-8 y la figura 4-19.

Tabla 4-8. Grupos de genes detectados en *E. cloacae* S13B3.

Región	Tipo	Inicio	Final	Clúster conocido más similar	Sim	
Región 1.1	Tiopéptidos	957.319	983.616	O-antigen	Saccharide	14%
Región 1.2	NRPS	1.284.115	1.327.972	colicin V	RiPP	3%
Región 2.1	Sideróforo	546.463	560.891	aerobactin	Other	66%
Región 4.1	NRPS,T1PKS	406.585	454.321	Saquayamycin A	Polyketide	5%
Región 6.1	polienos de arilo	73.029	116.622	aryl polyenes	Other	88%

NRPS: péptidos no ribosomales; T1PKS: Policétido sintasa; Sim: Similitud

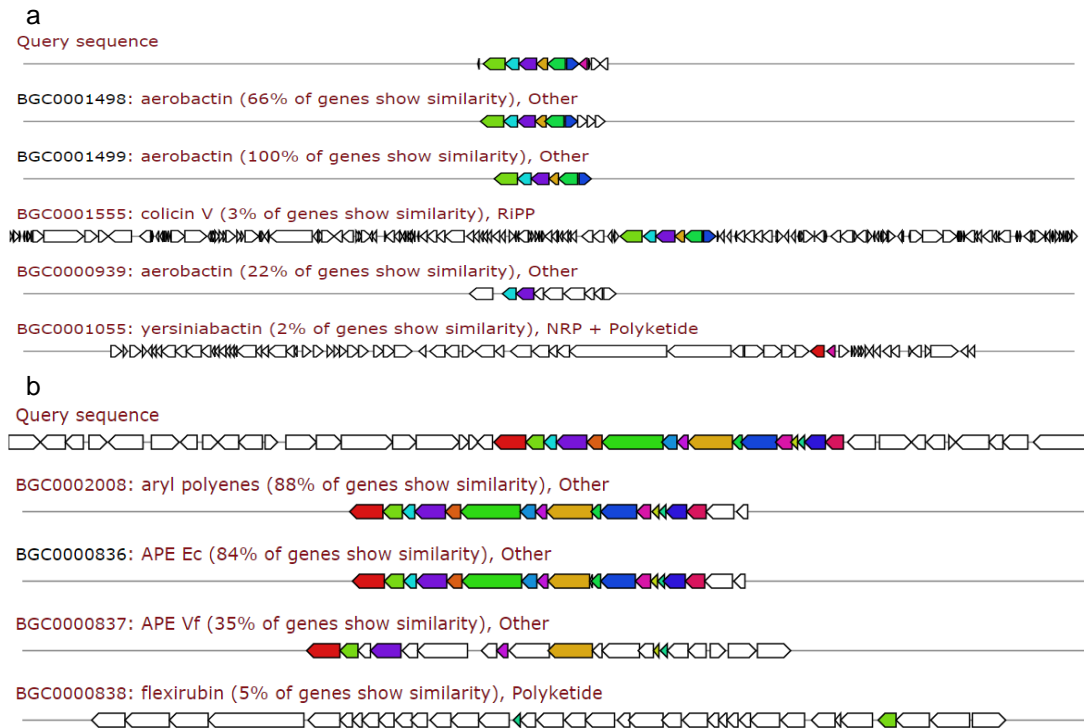


Figura 4-19. Grupos de genes detectados en la secuencia del genoma de *E. cloacae* S13B3. a. Aerobactina; b. polienos de arilo (aryl polyenes)

Los sideróforos no solo son esenciales para el crecimiento de algunas bacterias, sino que desempeñan un rol importante en el transporte de metales no ferrosos, la protección contra el estrés oxidativo, la actividad antibiótica, las interacciones entre especies y la virulencia (Kramer, Özkaya, & Kümmerli, 2020). La presencia de sideróforos, como las aerobactinas, ha estado relacionado con la supresión de enfermedades de plantas. Estudios han mostrado que las deleciones en mutantes de *Pantoea ananatis* incide en una pérdida de la bioactividad frente a cepas patógenas (O. Choi et al., 2022).

Adicionalmente, la generación de este tipo de metabolitos le daría una ventaja competitiva a *E. cloacae* S13B3 frente a sus pares en la rizósfera, confiriéndole un sistema de captación de hierro de alta afinidad (O. Choi et al., 2022). Además, estos resultados refuerzan las características de S13B3 como promotor de crecimiento vegetal en cuanto a la producción de sideróforos con afinidad al hierro. Pues si bien, el hierro es uno de los elementos más abundantes en la tierra, su biodisponibilidad está extremadamente restringida porque forma agregados de hidróxido férrico insolubles en condiciones aeróbicas y pH neutro (Nairz & Weiss, 2020). Aquí es donde cobra aún más importancia las características mencionadas de la cepa S13B3, debido a esas restricciones, las bacterias han desarrollado muchas estrategias efectivas para eliminar el hierro de su entorno (Lin et al., 2017).

Teniendo en cuenta estos resultados, al realizar una búsqueda en la región m/z 564 – 565 en modo positivo del extracto crudo optimizado y en la fracción 1 optimizada de S13B3, se encontró un pico de intensidad grande de masa 564,429, consistente con el ion $M+H^+$ $C_{22}H_{36}N_4O_{13}$ (calc. 564.227) como se muestra en la figura 4-20, lo que corroboraría la predicción realizada con genome mining correspondiente a la aerobactina y que la cepa S13B3 estaría biosintetizando este tipo de metabolitos.

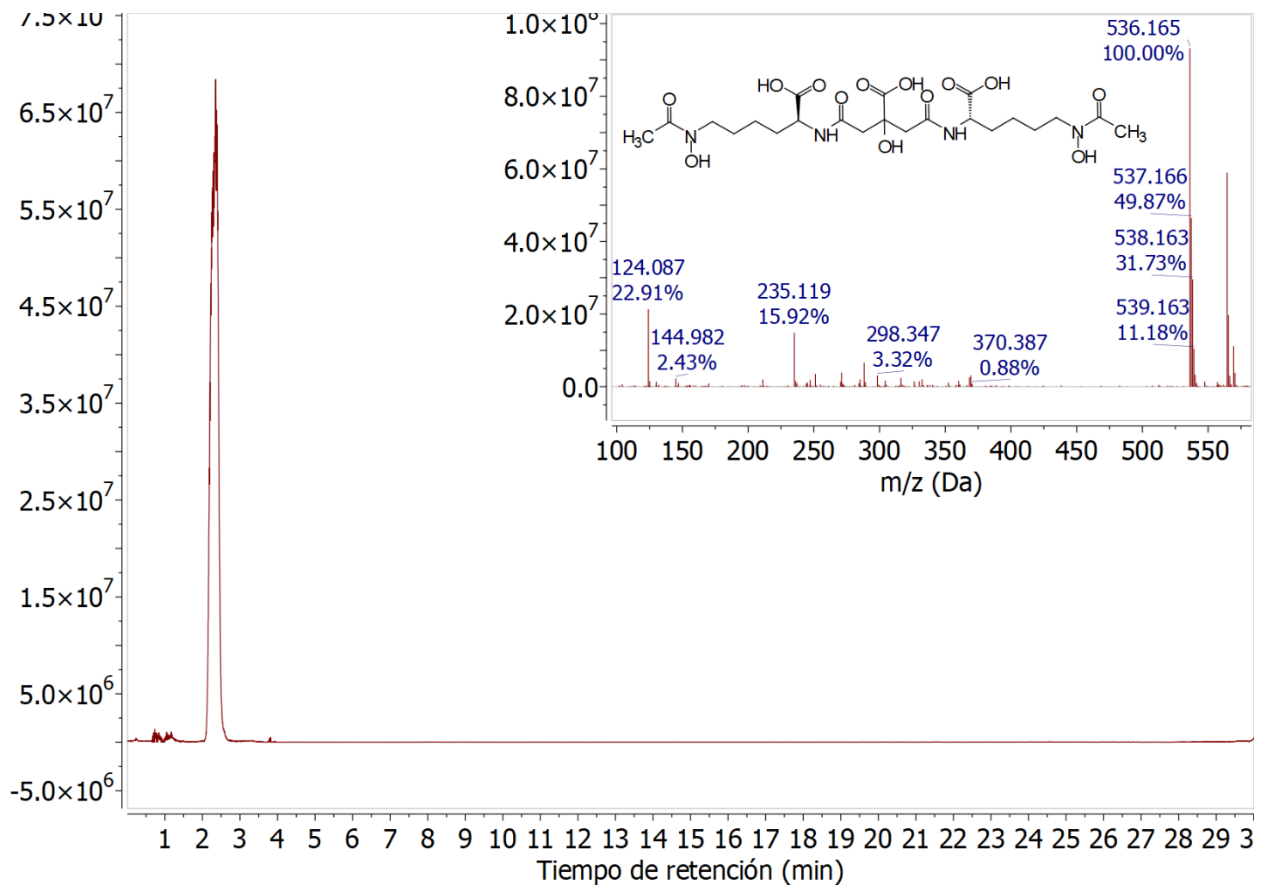


Figura 4-20. Pico basado en la región comprendida entre 564 – 565 m/z.

Por otro lado, existen un gran número de genes biosintéticos (BGC, biosynthetic gene cluster) que codifican para los polienos de arilo (aryl polyenes) (Chevrette et al., 2020). Estos están asociados a bacterias gran negativas y su rol no está claro; sin embargo, la presencia de BGC de polienos de arilo en bacterias simbiotes lleva a la especulación de la evasión del sistema inmunitario del huésped es su función principal (W. C. Lee et al., 2021). Lo anterior, va en la misma línea del potencial de S13B3 como promotor de crecimiento vegetal. Además, estudios donde se compara la estructura de los polienos de arilo bacterianos con la de los carotenos y su sistema de polienos, generando interés en los pigmentos con características que abarcan la fotoprotección y la habilidad estabilizadora de especies reactivas de oxígeno (Schöner et al., 2016).

5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVA

En este trabajo, se evaluó el potencial de bacterias nativas de la rizósfera de cultivos de arroz del Departamento del Tolima en Colombia. Estas bacterias son capaces de generar sustancias bioactivas frente a *Burkholderia glumae*. Se evidencia que la composición de los medios de cultivo incide sobre la bioactividad de los extractos crudos generados frente al fitopatógeno y la cepa S13B3 mostró mayor potencial a los estímulos producidos por los diferentes medios de cultivo evaluados, destacándose el medio de cultivos con nutrientes mínimos que permitió la generación extractos bioactivos más potentes. Lo anterior, señala la habilidad que tiene esta cepa bacteriana para adaptarse a diferentes condiciones de cultivo para generar metabolitos de interés frente a fitopatógenos del cultivo de arroz de origen bacteriano.

El uso de fuentes de carbono como la harina de arroz mostró ser un sustrato adecuado para generación de metabolitos bioactivos por parte de la cepa S13B3, permitiendo obtener extractos crudos con una actividad superior a los obtenidos con el medio base. Por otra parte, las fuentes de nitrógeno extracto de levadura y harina de chachafruto inciden en la biosíntesis de metabolitos bioactivos por parte de S13B3, manifestados en la obtención de CI_{50} menores a 0,27 mg/mL.

La optimización permitió determinar que los sustratos harina de arroz, extracto de levadura y harina de chachafruto influyen en la producción de metabolitos secundarios bioactivos. Donde la harina de arroz favorece a la obtención de valores bajos de CI_{50} mientras que los otros dos sustratos tienen a aumentar dichos valores. El modelo matemático propone que los valores óptimos para la generación de un extracto crudo bioactivo frente al fitopatógeno del cultivo del arroz *Burkholderia glumae* son 2,88 g/L de harina de arroz, 5 g/L de extracto de levadura y 4,77 g/L de harina de chachafruto, lo que permitió obtener $CI_{50} > 0,10$ mg/mL, mejorando considerablemente el potencial del extracto versus el extracto no optimizado.

El extracto crudo optimizado de la cepa S13B3 exhibió una gran abundancia de indol, el cual está presente en la fracción bioactiva en mayor proporción. Los experimentos de RMN y LC-MS, indican que existe una correlación directa entre el contenido de indol en las fracciones obtenidas del extracto crudo con la bioactividad frente a *B. glumae*. Esto podría ser una herramienta que permita monitorear la generación de las sustancias bioactivas responsables de producir un efecto antimicrobiano en S13B3.

La cepa S13B3 caracterizada inicialmente como *Kosakonia* sp. mediante la comparación de secuencias 16s del gen rADN, posterior a los análisis genómicos que incluyeron secuenciación, ensamble y anotación del genoma, permiten determinar que S13B3 pertenece al género *Enterobacter*, dicha cepa tiene cercanía con la cepa *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC 13047. En general, el empleo de secuencias específicas permite una clasificación más exacta de los organismos, especialmente en bacterias, donde una pequeña variación de nucleótidos puede incidir en dicha clasificación taxonómica.

Adicionalmente, se detectaron genes responsables de la biosíntesis de metabolitos asociados a la promoción del crecimiento de plantas, tales como sideróforos, triptófano, así como la solubilización de fosfato y potasio. Del mismo modo, se detectaron grupos de genes asociados a la biosíntesis de metabolitos secundarios como tiopéptidos, péptidos no ribosomales (NRPS), sideróforos, polienos de arilo e híbridos de policétidos y péptidos no ribosomales. Lo anterior indica que la cepa S13B3 tiene un potencial a nivel de genes, la cual podría ser sometida a estudios donde se busque aprovechar dicho potencial.

Finalmente, en este estudio se evidencia la versatilidad de las bacterias aisladas de suelos arroceros en cabeza de *Enterobacter cloacae* S13B3, en cuanto al aprovechamiento de sustratos provenientes del sistema productivo del arroz como la harina de arroz, así como beneficiarse de una fuente poco convencional como la harina de chachafruto. Por otro lado, estudios encaminados a determinar el mecanismo o los mecanismos de acción que emplea esta bacteria podrían dar información valiosa sobre

el rol ecológico que pueden tener los metabolitos generados por este integrante de la microbiota circundante de la raíz de las plantas del cultivo de arroz en el Departamento del Tolima.

ANEXOS

Anexo A. Análisis estadísticos selección preliminar

Comparaciones por parejas de Tukey: Medio

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución SC	Ajust. MC	Ajust. Valor F	Valor p
Modelo	4	1,39204	66,18%	1,39204	0,348009	12,23 0,000
Lineal	4	1,39204	66,18%	1,39204	0,348009	12,23 0,000
H.A	1	0,11725	5,57%	0,11725	0,117250	4,12 0,053
Y.E	1	0,57632	27,40%	0,57632	0,576321	20,26 0,000
H. Cha	1	0,62995	29,95%	0,62995	0,629953	22,14 0,000
MnSO4 * H2O	1	0,06851	3,26%	0,06851	0,068512	2,41 0,133
Error	25	0,71130	33,82%	0,71130	0,028452	
Curvatura	1	0,00335	0,16%	0,00335	0,003346	0,11 0,739
Falta de ajuste	7	0,32157	15,29%	0,32157	0,045939	2,02 0,112
Error puro	17	0,38638	18,37%	0,38638	0,022728	
Total	29	2,10333	100,00%			

Medio N Media Agrupación

TSB 72 65,3082 A

M9 72 56,8741 A

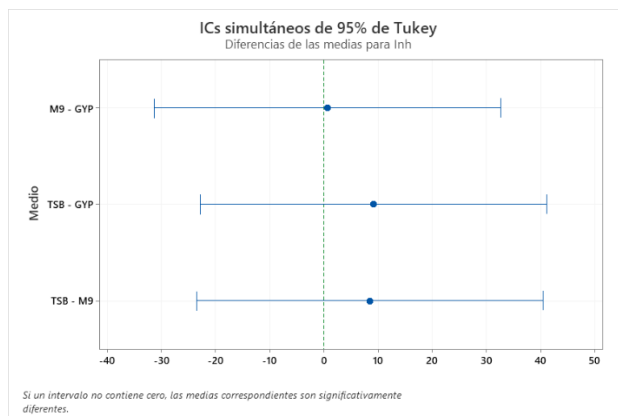
GYP 72 56,2332 A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de Medio	Diferencia de niveles	Diferencia EE	de diferencia GL	IC simultáneo de 95%	de Valor T	Valor p ajustado
M9 - GYP	0,64	1,67	170,816	(-31,31. 32,59)	0,38	0,928
TSB - GYP	9,08	1,67	170,816	(-22,87. 41,02)	5,42	0,174
TSB - M9	8,43	1,67	170,816	(-23,51. 40,38)	5,04	0,186

Nivel de confianza individual = 96,67%



Comparaciones por parejas de Tukey: Cepa

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

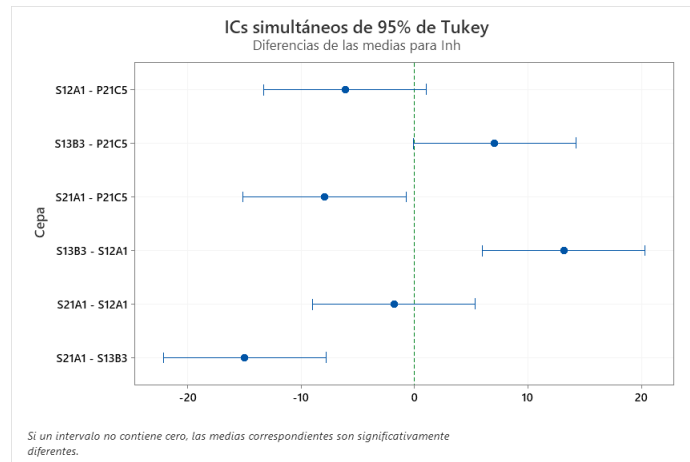
Cepa	N	Media	Agrupación
S13B3	54	68,2637	A
P21C5	54	61,2216	A B
S12A1	54	55,1110	B C
S21A1	54	53,2910	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Pruebas simultáneas de Tukey para diferencias de las medias

Diferencia de Cepa niveles	Diferencia de medias	EE de diferencia	de GL	IC simultáneo de 95%	Valor T	Valor p ajustado
S12A1 - P21C5	-6,11	1,95	197,938	(-13,28. 1,05)	-3,14	0,087
S13B3 - P21C5	7,04	1,95	197,938	(-0,12. 14,21)	3,62	0,053
S21A1 - P21C5	-7,93	1,95	197,938	(-15,10. -0,77)	-4,07	0,034
S13B3 - S12A1	13,15	1,95	197,938	(5,99. 20,32)	6,76	0,004
S21A1 - S12A1	-1,82	1,95	197,938	(-8,98. 5,34)	-0,94	0,789
S21A1 - S13B3	-14,97	1,95	197,938	(-22,14. -7,81)	-7,69	0,002

Nivel de confianza individual = 98,59%



Anexo B. Análisis estadísticos selección de condiciones de cultivo.

Análisis de Varianza 1

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	10	1,66477	0,166477	2,42	0,047
Lineal	9	1,65053	0,183393	2,67	0,034
H.A	1	0,13697	0,136974	1,99	0,174
Y.E	1	0,47278	0,472780	6,88	0,017
H. Cha	1	0,70895	0,708947	10,31	0,005
KH2PO4	1	0,01649	0,016490	0,24	0,630

Na2HPO4	1	0,00333	0,003325	0,05	0,828
MgSO4 * 7H2O	1	0,07690	0,076896	1,12	0,303
MnSO4 * H2O	1	0,00359	0,003594	0,05	0,822
NaCl	1	0,22883	0,228831	3,33	0,084
pH	1	0,00270	0,002699	0,04	0,845
Curvatura	1	0,01424	0,014237	0,21	0,654
Error	19	1,30596	0,068735		
Falta de ajuste	2	0,16110	0,080550	1,20	0,327
Error puro	17	1,14486	0,067345		
Total	29	2,97073			

Resumen del modelo

	S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
	0,262173	56,04%	32,90% 0,00%

Análisis de Varianza 2

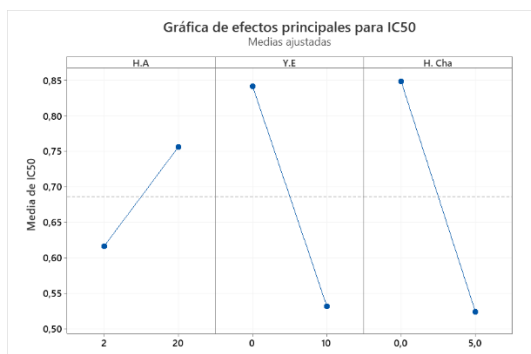
Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	3,07039	61,92%	3,07039	1,02346	14,09	0,000
Lineal	3	3,07039	61,92%	3,07039	1,02346	14,09	0,000
A (H.A)	1	0,59925	12,08%	0,59925	0,59925	8,25	0,008
B (Y.E)	1	1,15043	23,20%	1,15043	1,15043	15,84	0,000
C (H. Cha)	1	1,32071	26,63%	1,32071	1,32071	18,19	0,000
Error	26	1,88828	38,08%	1,88828	0,07263		
Curvatura	1	0,01129	0,23%	0,01129	0,01129	0,15	0,701
Falta de ajuste	8	0,98549	19,87%	0,98549	0,12319	2,35	0,066
Error puro	17	0,89150	17,98%	0,89150	0,05244		
Total	29	4,95867	100,00%				

Resumen del modelo

S	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)	PRESS	R-cuad. (pred)	AICc	BIC
0,269493	61,92%	57,53%	2,62929	46,98%	14,67	19,18

Coefficientes codificados

Término	Efecto	Coef	EE del coef.	IC de 95%	Valor T	Valor p	FIV
Constante		-0,4539	0,0492	(-0,5550 - 0,3528)	-9,23	0,000	
A (H.A)	0,3160	0,1580	0,0550	(0,0449 - 0,2711)	2,87	0,008	1,00
B (Y.E)	-0,4379	-0,2189	0,0550	(-0,3320 - 0,1059)	-3,98	0,000	1,00
C (H. Cha)	-0,4692	-0,2346	0,0550	(-0,3477 - 0,1215)	-4,26	0,000	1,00



Anexo C. Análisis estadísticos optimización.

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	9	0,271093	87,39%	0,271093	0,030121	22,34	0,000
Lineal	3	0,151249	48,76%	0,151249	0,050416	37,39	0,000
A (H.A)	1	0,015504	5,00%	0,015504	0,015504	11,50	0,002
B (Y.E)	1	0,032516	10,48%	0,032516	0,032516	24,12	0,000
C (H.Cha)	1	0,103228	33,28%	0,103228	0,103228	76,56	0,000
Cuadrado	3	0,118339	38,15%	0,118339	0,039446	29,26	0,000
A ² (H.A*H.A)	1	0,019100	6,16%	0,019059	0,019059	14,14	0,001
B ² (Y.E*Y.E)	1	0,059732	19,26%	0,018396	0,018396	13,64	0,001
C ² (H.Cha*H.Cha)	1	0,039507	12,74%	0,039507	0,039507	29,30	0,000
Interacción de 2 factores	3	0,001506	0,49%	0,001506	0,000502	0,37	0,774
H.A*Y.E	1	0,000311	0,10%	0,000311	0,000311	0,23	0,635
H.A*H.Cha	1	0,001074	0,35%	0,001074	0,001074	0,80	0,380
Y.E*H.Cha	1	0,000121	0,04%	0,000121	0,000121	0,09	0,767
Error	29	0,039101	12,61%	0,039101	0,001348		
Falta de ajuste	3	0,002484	0,80%	0,002484	0,000828	0,59	0,628
Error puro	26	0,036616	11,80%	0,036616	0,001408		
Total	38	0,310194	100,00%				

Resumen del modelo

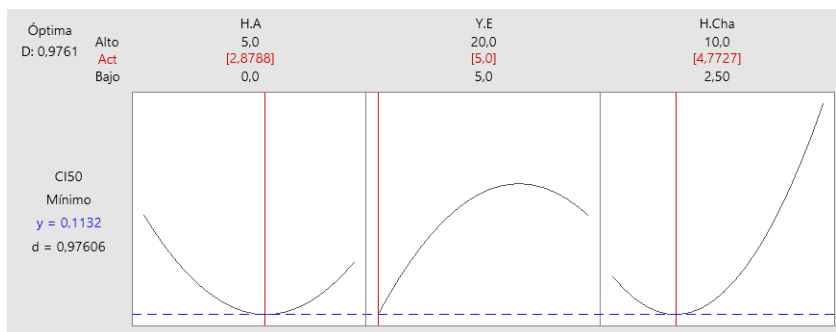
S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	PRESS	R-cuad. (pred)	AICc	BIC
0,0367192	87,39%	83,48%	0,0700957	77,40%	-126,85	-118,33

Coefficientes codificados

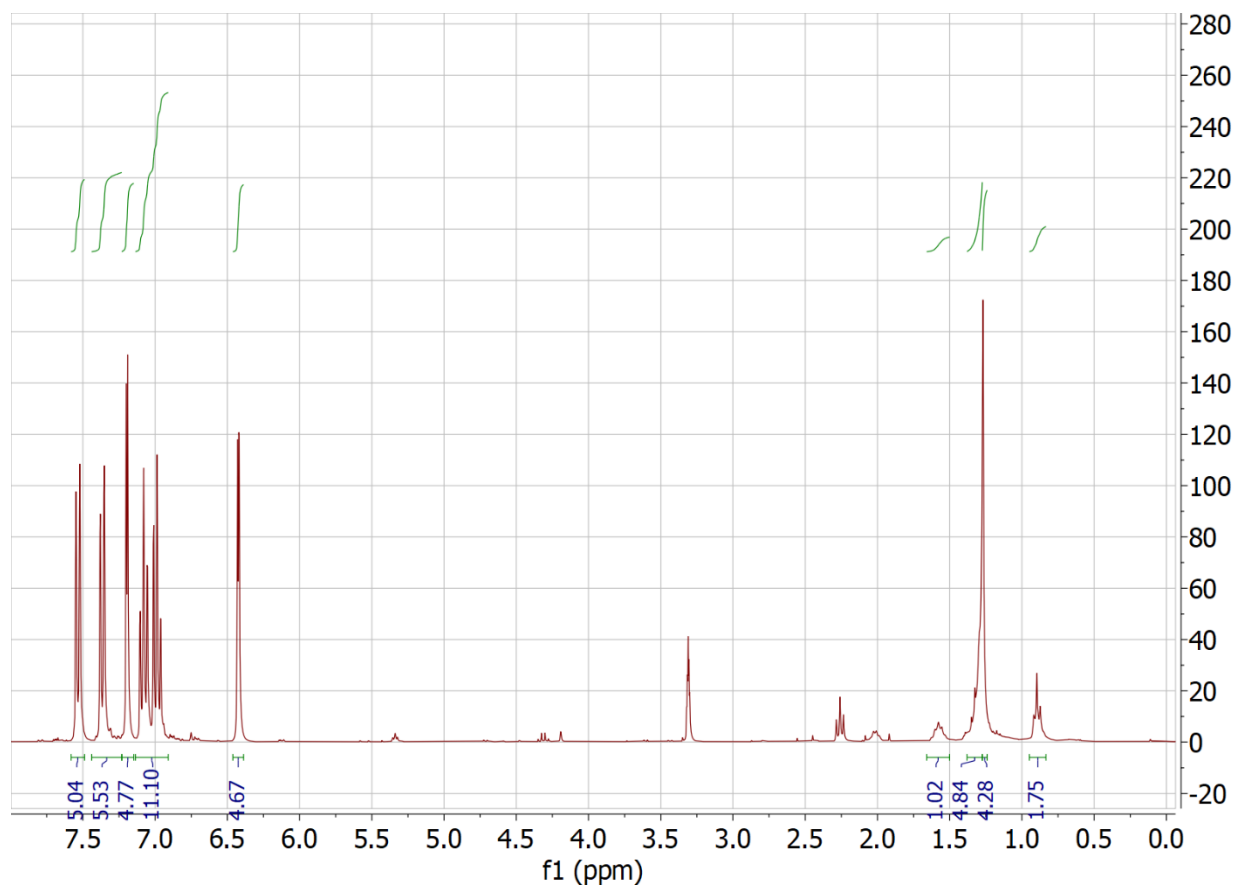
Término	Coef	EE del coef.	IC de 95%	Valor T	Valor p	FIV
Constante	0,2159	0,0212	(0,1725. 0,2592)	10,18	0,000	
A (H.A)	-0,02542	0,00750	(-0,04075. -0,01009)	-3,39	0,002	1,00
B (Y.E)	0,03681	0,00750	(0,02148. 0,05214)	4,91	0,000	1,00
C (H.Cha)	0,06558	0,00750	(0,05025. 0,08091)	8,75	0,000	1,00
A ² (H.A*H.A)	0,0527	0,0140	(0,0240. 0,0814)	3,76	0,001	1,35
B ² (Y.E*Y.E)	-0,0518	0,0140	(-0,0805. -0,0231)	-3,69	0,001	1,35
C ² (H.Cha*H.Cha)	0,0759	0,0140	(0,0472. 0,1046)	5,41	0,000	1,35
H.A*Y.E	-0,0051	0,0106	(-0,0268. 0,0166)	-0,48	0,635	1,00
H.A*H.Cha	-0,0095	0,0106	(-0,0311. 0,0122)	-0,89	0,380	1,00
Y.E*H.Cha	0,0032	0,0106	(-0,0185. 0,0249)	0,30	0,767	1,00

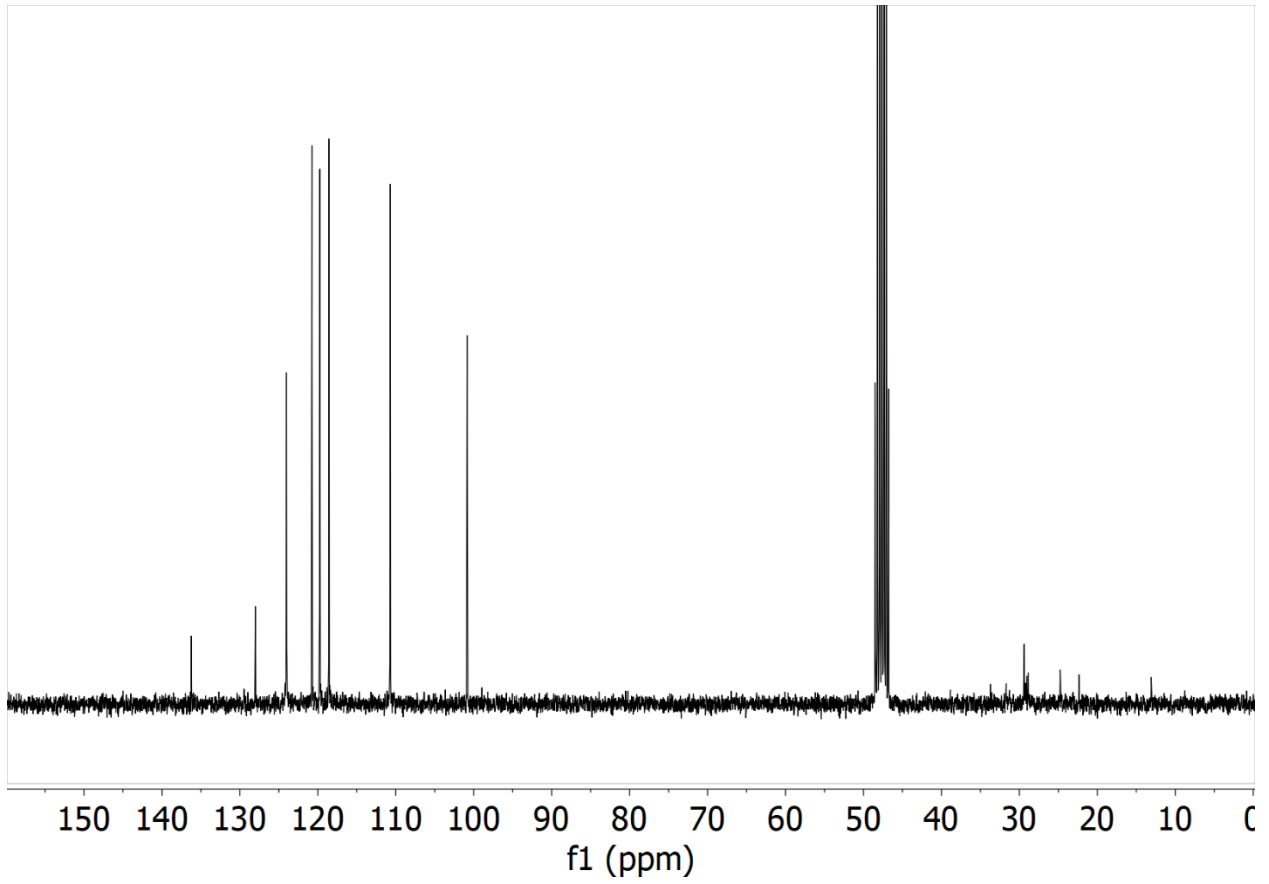
Predicción de respuesta múltiple

Variable	Valor de configuración		
H.A	2,87879		
Y.E	5		
H.Cha	4,77273		
Respuesta Ajuste	EE de ajuste	IC de 95%	IP de 95%
CI50	0,1132	0,0154	(0,0816. 0,1447) (0,0317. 0,1946)

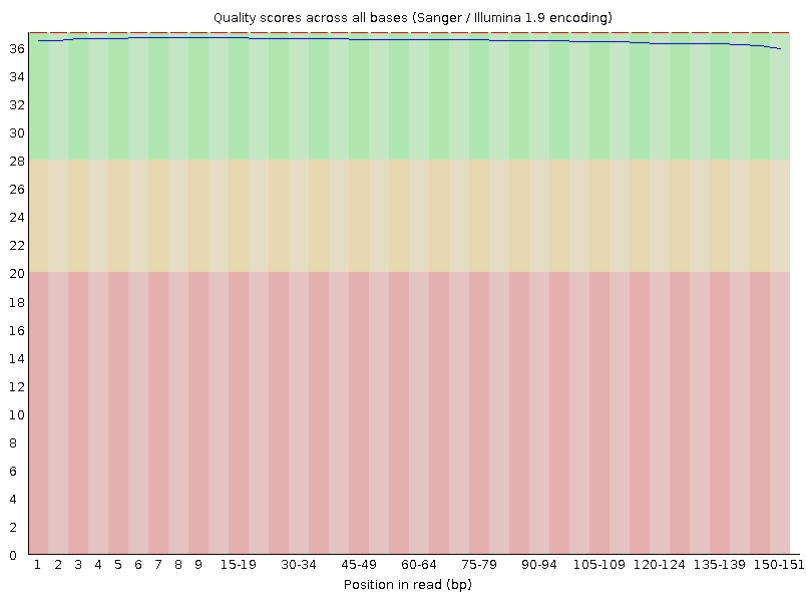


Anexo D. Análisis instrumental





Anexo E. Análisis genómico



Calidad de reads secuenciamiento cepa S13B3

6 REFERENCIAS

- Abou-Taleb, K. A., & Galal, G. F. (2018). A comparative study between one-factor-at-a-time and minimum runs resolution-IV methods for enhancing the production of polysaccharide by *Stenotrophomonas daejeonensis* and *Pseudomonas geniculata*. *Annals of Agricultural Sciences*, 63(2), 173-180. doi:10.1016/j.aosas.2018.11.002
- Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20. doi:10.1016/j.jksus.2013.05.001
- Ahsan, T., Chen, J., Wu, Y., & Irfan, M. (2017). Application of response surface methodology for optimization of medium components for the production of secondary metabolites by *Streptomyces diastatochromogenes* KX852460. *AMB Express*, 7(1), 96. doi:10.1186/s13568-017-0388-z
- Ali, A., Khan, M. H., Bano, R., Rashid, H., Raja, N. I., & Chaudhry, Z. (2009). Screening of Pakistani rice (*Oryza sativa*) cultivars against *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. *Pakistan Journal of Botany*, 41(5), 2595-2604.
- Ali, M. A., Lou, Y., Hafeez, R., Li, X., Hossain, A., Xie, T., . . . An, Q. (2021). Functional Analysis and Genome Mining Reveal High Potential of Biocontrol and Plant Growth Promotion in Nodule-Inhabiting Bacteria Within *Paenibacillus polymyxa* Complex. *Frontiers in Microbiology*, 11(3627). doi:10.3389/fmicb.2020.618601
- Almeida, E. L., Kaur, N., Jennings, L. K., Carrillo Rincón, A. F., Jackson, S. A., Thomas, O. P., & Dobson, A. D. W. (2019). Genome Mining Coupled with OSMAC-Based Cultivation Reveal Differential Production of Surugamide A by the Marine Sponge Isolate *Streptomyces* sp. SM17 When Compared to Its Terrestrial Relative *S. albidoflavus* J1074. *Microorganisms*, 7(10), 394. doi:10.3390/microorganisms7100394
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939-2951. doi:10.1007/s00253-016-7343-9
- Aman, M., & Rai V, R. (2016). Antifungal activity of novel indole derivative from endophytic bacteria *Pantoea ananatis* 4G-9 against *Mycosphaerella musicola*. *Biocontrol Science and Technology*, 26(4), 476-491. doi:10.1080/09583157.2015.1126223

- Amer, M. A., Wasfi, R., Attia, A. S., & Ramadan, M. A. (2021). Indole Derivatives Obtained from Egyptian Enterobacter sp. Soil Isolates Exhibit Antivirulence Activities against Uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Antibiotics*, *10*(4), 363. doi:10.3390/antibiotics10040363
- Ando, S., Kasahara, M., Mitomi, N., Schermer, T. A., Sato, E., Yoshida, S., . . . Takahashi, H. (2022). Suppression of rice seedling rot caused by *Burkholderia glumae* in nursery soils using culturable bacterial communities from organic farming systems. *Journal of Plant Pathology*. doi:10.1007/s42161-022-01066-6
- Andrés-Barrao, C., Lafi, F. F., Alam, I., de Zélicourt, A., Eida, A. A., Bokhari, A., . . . Saad, M. M. (2017). Complete Genome Sequence Analysis of Enterobacter sp. SA187, a Plant Multi-Stress Tolerance Promoting Endophytic Bacterium. *Frontiers in Microbiology*, *8*. doi:10.3389/fmicb.2017.02023
- Asadhi, S., Bhaskara Reddy, B. V., Sivaprasad, Y., Prathyusha, M., Murali Krishna, T., Vijay Krishna Kumar, K., & Raja Reddy, K. (2013). Characterisation, genetic diversity and antagonistic potential of 2,4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens* isolates in groundnut-based cropping systems of Andhra Pradesh, India. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *46*(16), 1966-1977. doi:10.1080/03235408.2013.782223
- Ashburner, M., Ball, C. A., Blake, J. A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J. M., . . . Sherlock, G. (2000). Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, *25*(1), 25-29. doi:10.1038/75556
- Audrain, B., Farag, M. A., Ryu, C.-M., & Ghigo, J.-M. (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiology Reviews*, *39*(2), 222-233. doi:10.1093/femsre/fuu013
- Bach, A. T., & Díaz, M. (2008). Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la agricultura. *Revista Agricultura Orgánica*(3), 35-38.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71-79. doi:10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R., & Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial cooperation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*, *56*. doi:10.1093/jxb/eri197
- Barrios-González, J. (2018). Chapter 13 - Secondary Metabolites Production: Physiological Advantages in Solid-State Fermentation. In A. Pandey, C. Larroche, & C. R. Soccol (Eds.), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (pp. 257-283): Elsevier.

- Bedoya, J. C., Dealis, M. L., Silva, C. S., Niekawa, E. T. G., Navarro, M. O. P., Simionato, A. S., . . . Andrade, G. (2019). Enhanced production of target bioactive metabolites produced by *Pseudomonas aeruginosa* LV strain. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, *17*, 545-556. doi:10.1016/j.bcab.2018.12.024
- Begani, J., Lakhani, J., & Harwani, D. (2018). Current strategies to induce secondary metabolites from microbial biosynthetic cryptic gene clusters. *Annals of Microbiology*, *68*(7), 419-432. doi:10.1007/s13213-018-1351-1
- Behnken, S., & Hertweck, C. (2012). Cryptic Polyketide Synthase Genes in Non-Pathogenic *Clostridium* SPP. *PLoS One*, *7*(1), e29609. doi:10.1371/journal.pone.0029609
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and molecular biology*, *35*(4 (suppl)), 1044-1051. doi:10.1590/s1415-47572012000600020
- Bertrand, S., Schumpp, O., Bohni, N., Monod, M., Gindro, K., & Wolfender, J.-L. (2013). De Novo Production of Metabolites by Fungal Co-culture of *Trichophyton rubrum* and *Bionectria ochroleuca*. *Journal of Natural Products*, *76*(6), 1157-1165. doi:10.1021/np400258f
- Betancur, L. A., Forero, A. M., Vinchira-Villarraga, D. M., Cárdenas, J. D., Romero-Otero, A., Chagas, F. O., . . . Ramos, F. A. (2020). NMR-based metabolic profiling to follow the production of anti-phytopathogenic compounds in the culture of the marine strain *Streptomyces* sp. PNM-9. *Microbiological Research*, *239*, 126507. doi:10.1016/j.micres.2020.126507
- Bhandari, G., Nautiyal, N., & Sharma, M. (2020). Assessment of Genes and Enzymes of Microorganisms of High Altitudes and Their Application in Agriculture. In R. Goel, R. Soni, & D. C. Sual (Eds.), *Microbiological Advancements for Higher Altitude Agro-Ecosystems & Sustainability* (pp. 307-326). Singapore: Springer Singapore.
- Blin, K., Shaw, S., Kloosterman, A. M., Charlop-Powers, Z., van Wezel, G. P., Medema, Marnix H., & Weber, T. (2021). antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W29-W35. doi:10.1093/nar/gkab335 %J Nucleic Acids Research
- Blin, K., Shaw, S., Steinke, K., Villebro, R., Ziemert, N., Lee, S. Y., . . . Weber, T. (2019). antiSMASH 5.0: updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W81-W87. doi:10.1093/nar/gkz310

- Blin, K., Wolf, T., Chevrette, M. G., Lu, X., Schwalen, C. J., Kautsar, S. A., . . . Medema, M. H. (2017). antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification. *Nucleic Acids Research*, *45*(W1), W36-W41. doi:10.1093/nar/gkx319
- Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R., & Zeeck, A. (2002). Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *ChemBioChem*, *3*(7), 619-627. doi:10.1002/1439-7633(20020703)3:7<619::AID-CBIC619>3.0.CO;2-9
- Brady, C., Cleenwerck, I., Venter, S., Coutinho, T., & De Vos, P. (2013). Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Systematic and Applied Microbiology*, *36*(5), 309-319. doi:10.1016/j.syapm.2013.03.005
- Camarena-Pozos, D. A., Flores-Núñez, V. M., López, M. G., López-Bucio, J., & Partida-Martínez, L. P. (2019). Smells from the desert: Microbial volatiles that affect plant growth and development of native and non-native plant species. *Plant, Cell & Environment*, *42*(4), 1368-1380. doi:10.1111/pce.13476
- Castilla, L. A., Pineda, D., Ospina, J., Echeverri, J., Perafan, R., Garces, G., . . . Diaz, A. (2010). Cambio climático y producción de arroz *Revista Arroz*, *58*(589), 4 - 11.
- Cernava, T., Erlacher, A., Soh, J., Sensen, C. W., Grube, M., & Berg, G. (2019). Enterobacteriaceae dominate the core microbiome and contribute to the resistome of arugula (*Eruca sativa* Mill.). *Microbiome*, *7*(1), 13. doi:10.1186/s40168-019-0624-7
- Cesa-Luna, C., Baez, A., Quintero-Hernández, V., De la Cruz-Enríquez, J., Castañeda-Antonio, M. D., & Muñoz-Rojas, J. (2020). The importance of antimicrobial compounds produced by beneficial bacteria on the biocontrol of phytopathogens. *Acta Biológica Colombiana*, *25*(1). doi:10.15446/abc.v25n1.76867
- Chandler, S., Van Hese, N., Coutte, F., Jacques, P., Höfte, M., & De Vleeschauwer, D. (2015). Role of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in mounting

- induced immunity in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 91, 20-30. doi:10.1016/j.pmpp.2015.05.010
- Chen, D., Xue, Y., Chen, M., Li, Z., & Wang, C. (2016). Optimization of submerged fermentation medium for citrinin-free monascin production by *Monascus*. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 46(8), 772-779. doi:10.1080/10826068.2015.1135461
- Chen, L., Shi, H., Heng, J., Wang, D., & Bian, K. (2019). Antimicrobial, plant growth-promoting and genomic properties of the peanut endophyte *Bacillus velezensis* LDO2. *Microbiological Research*, 218, 41-48. doi:10.1016/j.micres.2018.10.002
- Chen, L., Zheng, D., Liu, B., Yang, J., & Jin, Q. (2015). VFDB 2016: hierarchical and refined dataset for big data analysis—10 years on. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D694-D697. doi:10.1093/nar/gkv1239 %J Nucleic Acids Research
- Chen, R., Zhang, Q., Tan, B., Zheng, L., Li, H., Zhu, Y., & Zhang, C. (2017). Genome Mining and Activation of a Silent PKS/NRPS Gene Cluster Direct the Production of Totopotensamides. *Organic Letters*, 19(20), 5697-5700. doi:10.1021/acs.orglett.7b02878
- Cherif-Silini, H., Thissera, B., Bouket, A. C., Saadaoui, N., Silini, A., Eshelli, M., . . . Yahiaoui, B. (2019). Durum Wheat Stress Tolerance Induced by Endophyte *Pantoea agglomerans* with Genes Contributing to Plant Functions and Secondary Metabolite Arsenal. *International journal of molecular sciences*, 20(16), 3989. doi:10.3390/ijms20163989
- Chevrette, M. G., Gutiérrez-García, K., Selem-Mojica, N., Aguilar-Martínez, C., Yañez-Olvera, A., Ramos-Aboites, H. E., . . . Barona-Gómez, F. (2020). Evolutionary dynamics of natural product biosynthesis in bacteria. *Natural Product Reports*, 37(4), 566-599. doi:10.1039/C9NP00048H
- Chica, J., Tirado, Y. C., & Barreto, J. M. (2016). Indicadores de competitividad del cultivo del arroz en Colombia y Estados Unidos. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 33(2), 16-31. doi:10.22267/rcia.163302.49
- Choi, O., Cho, J., Kang, B., Lee, Y., Kim, J., & Alexandre, G. (2022). Negatively Regulated Aerobactin and Desferrioxamine E by Fur in *Pantoea ananatis* Are Required for Full Siderophore Production and Antibacterial Activity, but Not for Virulence. *Applied and environmental microbiology*, 88(6), e02405-02421. doi:10.1128/aem.02405-21

- Choi, S.-S., Katsuyama, Y., Bai, L., Deng, Z., Ohnishi, Y., & Kim, E.-S. (2018). Genome engineering for microbial natural product discovery. *Current Opinion in Microbiology*, 45, 53-60. doi:10.1016/j.mib.2018.02.007
- Choudhary, M., Ghasal, P. C., Yadav, R. P., Meena, V. S., Mondal, T., & Bisht, J. K. (2018). Towards Plant-Beneficiary Rhizobacteria and Agricultural Sustainability. In V. S. Meena (Ed.), *Role of Rhizospheric Microbes in Soil: Volume 2: Nutrient Management and Crop Improvement* (pp. 1-46). Singapore: Springer Singapore.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Frontiers in Microbiology*, 6(780). doi:10.3389/fmicb.2015.00780
- Chung, I. M., Kim, K. H., Ahn, J. K., Chun, S. C., Kim, C. S., Kim, J. T., & Kim, S. H. (2002). Screening of allelochemicals on barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) and identification of potentially allelopathic compounds from rice (*Oryza sativa*) variety hull extracts. *Crop Protection*, 21(10), 913-920. doi:10.1016/S0261-2194(02)00063-7
- Cimermancic, P., Medema, M. H., Claesen, J., Kurita, K., Wieland Brown, L. C., Mavrommatis, K., . . . Fischbach, M. A. (2014). Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. *Cell*, 158(2), 412-421. doi:10.1016/j.cell.2014.06.034
- CLSI. (2015). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition M07-A10*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Combes-Meynet, E., Pothier, J. F., Moenne-Loccoz, Y., & Prigent-Combaret, C. (2011). The *Pseudomonas* secondary metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol is a signal inducing rhizoplane expression of *Azospirillum* genes involved in plant-growth promotion. *Mol Plant Microbe Interact*, 24. doi:10.1094/mpmi-07-10-0148
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777. doi:10.1038/nrmicro1273
- Cruz-Morales, P., Kopp, J. F., Martínez-Guerrero, C., Yáñez-Guerra, L. A., Selem-Mojica, N., Ramos-Aboites, H., . . . Barona-Gómez, F. (2016). Phylogenomic Analysis of Natural Products Biosynthetic Gene Clusters Allows Discovery of Arseno-Organic Metabolites in Model Streptomyces. *Genome biology and evolution*, 8(6), 1906-1916. doi:10.1093/gbe/evw125
- Dandurishvili, N., Toklikishvili, N., Ovadis, M., Eliashvili, P., Giorgobiani, N., Keshelava, R., . . . Chernin, L. (2011). Broad-range antagonistic rhizobacteria *Pseudomonas*

- fluorescens and *Serratia plymuthica* suppress *Agrobacterium* crown gall tumours on tomato plants. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), 341-352. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04891.x
- Dane - Fedearroz. (2018). Encuesta nacional de arroz mecanizado II semestre de 2017.
- Das, A. K., & Dewanjee, S. (2018). Chapter 3 - Optimization of Extraction Using Mathematical Models and Computation. In S. D. Sarker & L. Nahar (Eds.), *Computational Phytochemistry* (pp. 75-106): Elsevier.
- Davis, J. J., Gerdes, S., Olsen, G. J., Olson, R., Pusch, G. D., Shukla, M., . . . Yoo, H. (2016). PATtyFams: Protein Families for the Microbial Genomes in the PATRIC Database. *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00118
- de Jong, A., van Hijum, S. A. F. T., Bijlsma, J. J. E., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2006). BAGEL: a web-based bacteriocin genome mining tool. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_2), W273-W279. doi:10.1093/nar/gkl237
- de Oliveira, A. G., Murate, L. S., Spago, F. R., Lopes, L. d. P., Beranger, J. P. d. O., Martin, J. A. B. S., . . . Andrade, G. (2011). Evaluation of the antibiotic activity of extracellular compounds produced by the *Pseudomonas* strain against the *Xanthomonas citri* pv. *citri* 306 strain. *Biological Control*, 56(2), 125-131. doi:10.1016/j.biocontrol.2010.10.008
- de Souza, J. T., Arnould, C., Deulvot, C., Lemanceau, P., Gianinazzi-Pearson, V., & Raaijmakers, J. M. (2003). Effect of 2,4-diacetylphloroglucinol on pythium: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. *Phytopathology*, 93(8), 966-975. doi:10.1094/phyto.2003.93.8.966
- Devescovi, G., Bigirimana, J., Degrassi, G., Cabrio, L., LiPuma, J. J., Kim, J., . . . Venturi, V. (2007). Involvement of a quorum-sensing-regulated lipase secreted by a clinical isolate of *Burkholderia glumae* in severe disease symptoms in rice. *Applied and environmental microbiology*, 73(15), 4950-4958. doi:10.1128/AEM.00105-07
- Dorosky, R. J., Pierson, L. S., & Pierson, E. A. (2018). *Pseudomonas chlororaphis* Produces Multiple R-Tailocin Particles That Broaden the Killing Spectrum and Contribute to Persistence in Rhizosphere Communities. *Applied and environmental microbiology*, 84(18), e01230-01218. doi:10.1128/aem.01230-18
- Dutta, S., Whicher, J. R., Hansen, D. A., Hale, W. A., Chemler, J. A., Congdon, G. R., . . . Skiniotis, G. (2014). Structure of a modular polyketide synthase. *Nature*, 510, 512. doi:10.1038/nature13423

- Ebbole, D. J. (2007). Magnaporthe as a model for understanding host-pathogen interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 45, 437-456. doi:10.1146/annurev.phyto.45.062806.094346
- Echeverri, J. (2016). "Mal del pie", objetivo prioritario de la investigación en arroz *Revista Arroz*, 64(524), 10-19.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797. doi:10.1093/nar/gkh340
%J Nucleic Acids Research
- El Euch, I. Z., Frese, M., Sewald, N., Smaoui, S., Shaaban, M., & Mellouli, L. (2018). Bioactive secondary metabolites from new terrestrial *Streptomyces* sp. TN82 strain: Isolation, structure elucidation and biological activity. *Medicinal Chemistry Research*, 27(4), 1085-1092. doi:10.1007/s00044-017-2130-4
- Elshikh, M., Ahmed, S., Funston, S., Dunlop, P., McGaw, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2016). Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. *Biotechnology Letters*, 38(6), 1015-1019. doi:10.1007/s10529-016-2079-2
- Esmaeel, Q., Pupin, M., Jacques, P., & Leclère, V. (2018). Nonribosomal peptides and polyketides of Burkholderia: new compounds potentially implicated in biocontrol and pharmaceuticals. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(30), 29794-29807. doi:10.1007/s11356-017-9166-3
- Espinal, C., Martínez, H., & Ortiz, L. (2005). La cadena del arroz en Colombia una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia*, 38.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., . . . dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186. doi:10.1016/j.aca.2007.07.011
- Figueiredo, M. d. V. B., Seldin, L., de Araujo, F. F., & Mariano, R. d. L. R. (2011). Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications. In *Plant growth and health promoting bacteria* (pp. 21-43): Springer.
- Fory, P. A., Triplett, L., Ballen, C., Abello, J. F., Duitama, J., Aricapa, M. G., . . . Mosquera, G. M. (2014). Comparative Analysis of Two Emerging Rice Seed Bacterial Pathogens. *Phytopathology*, 104(5), 436-444. doi:10.1094/PHYTO-07-13-0186-R

- Gao, H., Lu, C., Wang, H., Wang, L., Yang, Y., Jiang, T., . . . Wu, L. (2020). Production exopolysaccharide from *Kosakonia cowanii* LT-1 through solid-state fermentation and its application as a plant growth promoter. *International Journal of Biological Macromolecules*, 150, 955-964. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.10.209
- Ghosh, S., Ghosh, P., & Maiti, T. K. (2011). Production and metabolism of indole acetic acid (IAA) by root nodule bacteria (Rhizobium): a review. *J Pure Appl Microbiol*, 5.
- Ghyselinck, J., Velivelli, S. L. S., Heylen, K., O'Herlihy, E., Franco, J., Rojas, M., . . . Prestwich, B. D. (2013). Bioprospecting in potato fields in the Central Andean Highlands: Screening of rhizobacteria for plant growth-promoting properties. *Systematic and Applied Microbiology*, 36(2), 116-127. doi:10.1016/j.syapm.2012.11.007
- Glick, B. R. (2012). Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012. doi:10.6064/2012/963401
- Glick, B. R. (2015). Introduction to Plant Growth-promoting Bacteria. In B. Glick (Ed.), *Beneficial Plant-Bacterial Interactions* (pp. 1-28). New Delhi, India: Springer International Publishing.
- Gond, S. K., Bergen, M. S., Torres, M. S., & White Jr, J. F. (2015). Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological Research*, 172, 79-87. doi:10.1016/j.micres.2014.11.004
- Grady, E. N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., & Yuan, Z.-C. (2016). Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 203. doi:10.1186/s12934-016-0603-7
- Grahovac, J., Grahovac, M., Dodić, J., Bajić, B., & Balaž, J. (2014). Optimization of cultivation medium for enhanced production of antifungal metabolites by *Streptomyces hygroscopicus*. *Crop Protection*, 65, 143-152. doi:10.1016/j.cropro.2014.07.020
- Granada, S. D., Pasaje, G. F., Zuluaga, E. M., Gómez, F. A., Peláez, C., & Rueda, E. A. (2011). Evaluación del potencial antagónico de bacterias aisladas de la rizósfera de papa criolla (*Solanum phureja*) sobre *Phytophthora infestans* (mont.) de Bary. *Fitopatología Colombiana*, 35(1), 11-14.
- Granada, S. D., Ramírez-Restrepo, S., López-Luján, L., Peláez-Jaramillo, C. A., & Bedoya-Pérez, J. C. (2018). Screening of a biological control bacterium to fight avocado diseases: From agroecosystem to bioreactor. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 14, 109-115. doi:10.1016/j.bcab.2018.02.005

- Gray, E. J., & Smith, D. L. (2005). Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant–bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(3), 395-412. doi:10.1016/j.soilbio.2004.08.030
- Guo, H., Yang, Y., Liu, K., Xu, W., Gao, J., Duan, H., . . . Wang, C. (2016). Comparative Genomic Analysis of *Delftia tsuruhatensis* MTQ3 and the Identification of Functional NRPS Genes for Siderophore Production. *BioMed Research International*, 2016, 3687619. doi:10.1155/2016/3687619
- Ham, J. H., Melanson, R. A., & Rush, M. C. (2011). Burkholderia glumae: next major pathogen of rice? *Molecular Plant Pathology*, 12(4), 329-339. doi:10.1111/j.1364-3703.2010.00676.x
- Hamley, I. W. (2015). Lipopeptides: from self-assembly to bioactivity. *Chemical Communications*, 51(41), 8574-8583. doi:10.1039/C5CC01535A
- Han, H. M., Kim, I. J., Yun, E. J., Lee, J. W., Cho, Y., Jin, Y.-S., & Kim, K. H. (2021). Overproduction of Exopolysaccharide Colanic Acid by Escherichia coli by Strain Engineering and Media Optimization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 193(1), 111-127. doi:10.1007/s12010-020-03409-4
- Hayat, R., Ali, S., Amara, U., Khalid, R., & Ahmed, I. (2010). Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*, 60(4), 579-598. doi:10.1007/s13213-010-0117-1
- Helfrich, E. J. N., & Piel, J. (2016). Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases. *Natural Product Reports*, 33(2), 231-316. doi:10.1039/C5NP00125K
- Hertweck, C. (2009). The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(26), 4688-4716. doi:10.1002/anie.200806121
- Hiltner, L. (1904). Über neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiete der bodenbakteriologie unter besonderer berücksichtigung der gründung und brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft*, 98, 59-78.
- Hofmann, M., Heine, T., Malik, L., Hofmann, S., Joffroy, K., Senges, C. H. R., . . . Tischler, D. (2021). Screening for Microbial Metal-Chelating Siderophores for the Removal of Metal Ions from Solutions. 9(1), 111.
- Resolución 3312, (2009).
- Ishida, K., Lincke, T., Behnken, S., & Hertweck, C. (2010). Induced Biosynthesis of Cryptic Polyketide Metabolites in a Burkholderia thailandensis Quorum Sensing

- Mutant. *Journal of the American Chemical Society*, 132(40), 13966-13968. doi:10.1021/ja105003g
- Jain, S., Varma, A., Tuteja, N., & Choudhary, D. K. (2017). Bacterial Volatiles in Promotion of Plant Under Biotic Stress. In D. K. Choudhary, A. K. Sharma, P. Agarwal, A. Varma, & N. Tuteja (Eds.), *Volatiles and Food Security: Role of Volatiles in Agroecosystems* (pp. 299-311). Singapore: Springer Singapore.
- Ji, C., Liu, Z., Hao, L., Song, X., Wang, C., Liu, Y., . . . Liu, X. (2020). Effects of *Enterobacter cloacae* HG-1 on the Nitrogen-Fixing Community Structure of Wheat Rhizosphere Soil and on Salt Tolerance. *Frontiers in plant science*, 11. doi:10.3389/fpls.2020.01094
- Kalai-Grami, L., Saidi, S., Bachkouel, S., Slimene, I. B., Mnari-Hattab, M., Hajlaoui, M. R., & Limam, F. (2014). Isolation and Characterization of Putative Endophytic Bacteria Antagonistic to *Phoma tracheiphila* and *Verticillium albo-atrum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 174(1), 365-375. doi:10.1007/s12010-014-1062-4
- Kampen, W. H. (2014). Chapter 4 - Nutritional Requirements in Fermentation Processes. In H. C. Vogel & C. M. Todaro (Eds.), *Fermentation and Biochemical Engineering Handbook (Third Edition)* (pp. 37-57). Boston: William Andrew Publishing.
- Kanchiswamy, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in plant science*, 6. doi:10.3389/fpls.2015.00151
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2015). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D457-D462. doi:10.1093/nar/gkv1070 %J Nucleic Acids Research
- Kautsar, S. A., Blin, K., Shaw, S., Navarro-Muñoz, J. C., Terlouw, B. R., van der Hooft, J. J., . . . Medema, M. H. (2019). MIBiG 2.0: a repository for biosynthetic gene clusters of known function. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D454-D458. doi:10.1093/nar/gkz882
- Kealey, C., Creaven, C. A., Murphy, C. D., & Brady, C. B. (2017). New approaches to antibiotic discovery. *Biotechnology Letters*, 39(6), 805-817. doi:10.1007/s10529-017-2311-8
- Kennedy, A. C. (1999). The rhizosphere and spermosphere. In D. M. Sylvia, J. J. Fuhrmann, P. G. Hartel, & D. A. Zuberer (Eds.), *Principles and applications of soil microbiology* (pp. 389-407). Upper Saddle River, N.J.: Prentice Hall.

- Kim, S.-D., Fuente, L. D. L., Weller, D. M., & Thomashow, L. S. (2012). Colonizing ability of *Pseudomonas fluorescens* 2112, among collections of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* spp. in pea rhizosphere. *J Microbiol Biotechnol*, 22, 763-770. doi:10.4014/jmb.1112.12039
- Kloepper, J., & Schroth, M. (1978). *Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes*. Paper presented at the Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria.
- Kramer, J., Özkaya, Ö., & Kümmerli, R. (2020). Bacterial siderophores in community and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 18(3), 152-163. doi:10.1038/s41579-019-0284-4
- Krzyżanowska, D. M., Ossowicki, A., Rajewska, M., Maciąg, T., Jabłońska, M., Obuchowski, M., . . . Jafra, S. (2016). When Genome-Based Approach Meets the “Old but Good”: Revealing Genes Involved in the Antibacterial Activity of *Pseudomonas* sp. P482 against Soft Rot Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 7(782). doi:10.3389/fmicb.2016.00782
- Kumar, A., Patel, J. S., Meena, V. S., & Ramteke, P. W. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria: strategies to improve abiotic stresses under sustainable agriculture. *Journal of Plant Nutrition*, 42(11-12), 1402-1415. doi:10.1080/01904167.2019.1616757
- Kumar, P., Lee, J.-H., & Lee, J. (2021). Diverse roles of microbial indole compounds in eukaryotic systems. *Biological Reviews*, 96(6), 2522-2545. doi:10.1111/brv.12765
- Laue, B. E., Jiang, Y., Chhabra, S. R., Jacob, S., Stewart, G. S. A. B., Hardman, A., . . . Williams, P. (2000). The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the Rhizobium small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. The GenBank accession number for the sequence determined in this work is AF286536. *Microbiology*, 146(10), 2469-2480. doi:10.1099/00221287-146-10-2469
- Law, V., Knox, C., Djoumbou, Y., Jewison, T., Guo, A. C., Liu, Y., . . . Wishart, D. S. (2013). DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D1091-D1097. doi:10.1093/nar/gkt1068 %J Nucleic Acids Research
- Lee, J.-H., & Lee, J. (2010). Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(4), 426-444. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x %J FEMS Microbiology Reviews

- Lee, J.-H., Wood, T. K., & Lee, J. (2015). Roles of Indole as an Interspecies and Interkingdom Signaling Molecule. *Trends in Microbiology*, 23(11), 707-718. doi:10.1016/j.tim.2015.08.001
- Lee, K. D., Gray, E. J., Mabood, F., Jung, W.-J., Charles, T., Clark, S. R. D., . . . Smith, D. L. (2009). The class Ild bacteriocin thuricin-17 increases plant growth. *Planta*, 229(4), 747-755. doi:10.1007/s00425-008-0870-6
- Lee, W. C., Choi, S., Jang, A., Yeon, J., Hwang, E., & Kim, Y. (2021). Structural basis of the complementary activity of two ketosynthases in aryl polyene biosynthesis. *Scientific Reports*, 11(1), 16340. doi:10.1038/s41598-021-95890-y
- Lemfack, M. C., Gohlke, B.-O., Toguem, Serge M T., Preissner, S., Piechulla, B., & Preissner, R. (2017). mVOC 2.0: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1261-D1265. doi:10.1093/nar/gkx1016 %J Nucleic Acids Research
- Letzel, A.-C., Pidot, S. J., & Hertweck, C. (2014). Genome mining for ribosomally synthesized and post-translationally modified peptides (RiPPs) in anaerobic bacteria. *BMC Genomics*, 15(1), 983. doi:10.1186/1471-2164-15-983
- Li, H., Lei, P., Pang, X., Li, S., Xu, H., Xu, Z., & Feng, X. (2017). Enhanced tolerance to salt stress in canola (*Brassica napus* L.) seedlings inoculated with the halotolerant *Enterobacter cloacae* HSNJ4. *Applied Soil Ecology*, 119, 26-34. doi:10.1016/j.apsoil.2017.05.033
- Li, Z., Song, C., Yi, Y., & Kuipers, O. P. (2020). Characterization of plant growth-promoting rhizobacteria from perennial ryegrass and genome mining of novel antimicrobial gene clusters. *BMC Genomics*, 21(1), 157. doi:10.1186/s12864-020-6563-7
- Lim, S.-K., Ju, J., Zazopoulos, E., Jiang, H., Seo, J.-W., Chen, Y., . . . Shen, B. (2009). Iso-Migrastatin, Migrastatin, and Dorrigocin Production in *Streptomyces platensis* NRRL 18993 Is Governed by a Single Biosynthetic Machinery Featuring an Acyltransferase-less Type I Polyketide Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43), 29746-29756. doi:10.1074/jbc.M109.046805
- Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y., . . . Shen, X. (2017). A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature Communications*, 8(1), 14888. doi:10.1038/ncomms14888
- Ling, L. L., Schneider, T., Peoples, A. J., Spoering, A. L., Engels, I., Conlon, B. P., . . . Lewis, K. (2015). A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. *Nature*, 517(7535), 455-459. doi:10.1038/nature14098

- Liu, K., Newman, M., McInroy, J. A., Hu, C.-H., & Kloepper, J. W. (2017). Selection and Assessment of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Biological Control of Multiple Plant Diseases. *Phytopathology*, *107*(8), 928-936. doi:10.1094/PHYTO-02-17-0051-R
- Liu, Z., Budiharjo, A., Wang, P., Shi, H., Fang, J., Borriss, R., . . . Huang, X. (2013). The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*(23), 10081-10090. doi:10.1007/s00253-013-5247-5
- Lopes, R., Cerdeira, L., Tavares, G. S., Ruiz, J. C., Blom, J., Horácio, E. C. A., . . . Queiroz, M. V. d. (2017). Genome analysis reveals insights of the endophytic *Bacillus toyonensis* BAC3151 as a potentially novel agent for biocontrol of plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *33*(10), 185. doi:10.1007/s11274-017-2347-x
- Lucas, J. A., Ramos Solano, B., Montes, F., Ojeda, J., Megias, M., & Gutierrez Mañero, F. J. (2009). Use of two PGPR strains in the integrated management of blast disease in rice (*Oryza sativa*) in Southern Spain. *Field Crops Research*, *114*(3), 404-410. doi:10.1016/j.fcr.2009.09.013
- Manikandan, M., Gowdaman, V., Duraimurugan, K., & Prabakaran, S. R. (2019). Taxonomic characterization and antimicrobial compound production from *Streptomyces chumphonensis* BDK01 isolated from marine sediment. *3 Biotech*, *9*(5), 167. doi:10.1007/s13205-019-1687-7
- Mao, C., Abraham, D., Wattam, A. R., Wilson, M. J. C., Shukla, M., Yoo, H. S., & Sobral, B. W. (2014). Curation, integration and visualization of bacterial virulence factors in PATRIC. *Bioinformatics*, *31*(2), 252-258. doi:10.1093/bioinformatics/btu631 %J Bioinformatics
- Matilla, M. A., & Krell, T. (2018). Plant Growth Promotion and Biocontrol Mediated by Plant-Associated Bacteria. In D. Egamberdieva & P. Ahmad (Eds.), *Plant Microbiome: Stress Response* (pp. 45-80). Singapore: Springer Singapore.
- Matilla, M. A., Nogellova, V., Morel, B., Krell, T., & Salmond, G. P. (2016). Biosynthesis of the acetyl-CoA carboxylase-inhibiting antibiotic, andrimid in *Serratia* is regulated by Hfq and the LysR-type transcriptional regulator, AdmX. *Environ Microbiol*, *18*(11), 3635-3650. doi:10.1111/1462-2920.13241
- Matilla, M. A., Stöckmann, H., Leeper, F. J., & Salmond, G. P. (2012). Bacterial biosynthetic gene clusters encoding the anti-cancer haterumalide class of molecules: biogenesis of the broad spectrum antifungal and anti-oomycete

- compound, oocydin A. *Journal of Biological Chemistry*, 287(46), 39125-39138. doi:10.1074/jbc.M112.401026
- Matilla, M. A., Udaondo, Z., Krell, T., & Salmond, G. P. C. (2017). Genome Sequence of *Serratia marcescens* MSU97, a Plant-Associated Bacterium That Makes Multiple Antibiotics. *Genome announcements*, 5(9), e01752-01716. doi:10.1128/genomeA.01752-16
- McArthur, A. G., Waglechner, N., Nizam, F., Yan, A., Azad, M. A., Baylay, A. J., . . . Wright, G. D. (2013). The Comprehensive Antibiotic Resistance Database. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3348-3357. doi:10.1128/AAC.00419-13
- McDonald, B. A., & Stukenbrock, E. H. (2016). Rapid emergence of pathogens in agroecosystems: global threats to agricultural sustainability and food security. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709). doi:10.1098/rstb.2016.0026
- McNear Jr, D. H. (2013). The rhizosphere - roots, soil and everything in between. *Nature Education Knowledge*, 4(3), 1.
- Melnick, R. L., Suárez, C., Bailey, B. A., & Backman, P. A. (2011). Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *Biological Control*, 57(3), 236-245. doi:10.1016/j.biocontrol.2011.03.005
- Miller, B. R., & Gulick, A. M. (2016). Structural Biology of Nonribosomal Peptide Synthetases. In B. S. Evans (Ed.), *Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthesis: Methods and Protocols* (pp. 3-29). New York, NY: Springer New York.
- Mohimani, H., Liu, W.-T., Kersten, R. D., Moore, B. S., Dorrestein, P. C., & Pevzner, P. A. (2014). NRPquest: Coupling Mass Spectrometry and Genome Mining for Nonribosomal Peptide Discovery. *Journal of Natural Products*, 77(8), 1902-1909. doi:10.1021/np500370c
- Montavon, T. J., & Bruner, S. D. (2010). 5.19 - Nonribosomal Peptide Synthetases. In *Comprehensive Natural Products II* (pp. 619-655). Oxford: Elsevier.
- Nairz, M., & Weiss, G. (2020). Iron in infection and immunity. *Molecular Aspects of Medicine*, 75, 100864. doi:10.1016/j.mam.2020.100864

- Nakkeeran, S., Fernando, W. G. D., & Siddiqui, Z. A. (2006). Plant Growth Promoting Rhizobacteria Formulations and its Scope in Commercialization for the Management of Pests and Diseases. In Z. A. Siddiqui (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (pp. 257-296). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Nandakumar, R., Shahjahan, A. K. M., Yuan, X. L., Dickstein, E. R., Groth, D. E., Clark, C. A., . . . Rush, M. C. (2009). Burkholderia glumae and B. gladioli Cause Bacterial Panicle Blight in Rice in the Southern United States. *Plant Disease*, 93(9), 896-905. doi:10.1094/PDIS-93-9-0896
- Ndlovu, T., Rautenbach, M., Khan, S., & Khan, W. (2017). Variants of lipopeptides and glycolipids produced by Bacillus amyloliquefaciens and Pseudomonas aeruginosa cultured in different carbon substrates. *AMB Express*, 7(1), 109. doi:10.1186/s13568-017-0367-4
- Ngalimat, M. S., Mohd Hata, E., Zulperi, D., Ismail, S. I., Ismail, M. R., Mohd Zainudin, N. A. I., . . . Yusof, M. T. (2021). Characterization of Streptomyces spp. from Rice Fields as a Potential Biocontrol Agent against Burkholderia glumae and Rice Plant Growth Promoter. *Agronomy*, 11(9), 1850. doi:10.3390/agronomy11091850
- Niehs, S. P., Dose, B., Scherlach, K., Roth, M., & Hertweck, C. (2018). Genomics-Driven Discovery of a Symbiont-Specific Cyclopeptide from Bacteria Residing in the Rice Seedling Blight Fungus. *ChemBioChem*, 19(20), 2167-2172. doi:10.1002/cbic.201800400
- Nor, N. M., Mohamad, R., Foo, H. L., & Rahim, R. A. (2010). Improvement of folate biosynthesis by lactic acid bacteria using response surface methodology. *Food Technology and Biotechnology*, 48(2), 243-250.
- Oliveros, D., & Rueda Lorza, A. (2017). *Obtención y caracterización de productos metabólicos con actividad antimicrobiana sobre fitopatógenos del cultivo de arroz, a partir de rizobacterias antagonistas nativas*. (Maestría), Universidad Nacional, Medellín.
- Ondov, B. D., Treangen, T. J., Melsted, P., Mallonee, A. B., Bergman, N. H., Koren, S., & Phillippy, A. M. (2016). Mash: fast genome and metagenome distance estimation using MinHash. *Genome Biology*, 17(1), 132. doi:10.1186/s13059-016-0997-x
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R. M., Choudhuri, J. V., Chuang, H.-Y., Cohoon, M., . . . Vonstein, V. (2005). The Subsystems Approach to Genome Annotation and its Use in the Project to Annotate 1000 Genomes. *Nucleic Acids Research*, 33(17), 5691-5702. doi:10.1093/nar/gki866 %J Nucleic Acids Research

- Palmieri, A., & Petrini, M. (2019). Tryptophol and derivatives: natural occurrence and applications to the synthesis of bioactive compounds. *Natural Product Reports*, 36(3), 490-530. doi:10.1039/C8NP00032H
- Partida-Martinez, L. P., & Hertweck, C. (2007). A Gene Cluster Encoding Rhizoxin Biosynthesis in “Burkholderia rhizoxina”, the Bacterial Endosymbiont of the Fungus *Rhizopus microsporus*. *ChemBioChem*, 8(1), 41-45. doi:10.1002/cbic.200600393
- Paterson, J., Jahanshah, G., Li, Y., Wang, Q., Mehnaz, S., & Gross, H. (2016). The contribution of genome mining strategies to the understanding of active principles of PGPR strains. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(3). doi:10.1093/femsec/fiw249
- Pedraza Herrera, L. A. (2016). *Evaluación de Bacterias Aerobias Formadoras de Endospora (BAFEs) de suelos rizosféricos, como agentes de control biológico de Burkholderia glumae*. (Maestría), Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Retrieved from <http://bdigital.unal.edu.co/52590/>
- Peñaloza Atuesta, G. C., Murillo Arango, W., Eras, J., Oliveros, D., & Méndez Arteaga, J. J. (2020). Rice-Associated Rhizobacteria as a Source of Secondary Metabolites against *Burkholderia glumae*. *Molecules*, 25(11), 2567.
- Perfetti, J. J., Hernández, A., Leibovich, J., & Balcázar, Á. (2013). *Políticas para el desarrollo de la agricultura en Colombia: SAC - FEDESARROLLO*.
- Philippot, L., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., & van der Putten, W. H. (2013). Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. *Nat Rev Micro*, 11(11), 789-799. doi:10.1038/nrmicro3109
- Pidot, S., Ishida, K., Cyrulies, M., & Hertweck, C. (2014). Discovery of Clostrubin, an Exceptional Polyphenolic Polyketide Antibiotic from a Strictly Anaerobic Bacterium. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(30), 7856-7859. doi:10.1002/anie.201402632
- Podleśny, M., Kubik-Komar, A., Kucharska, J., Wyrastek, J., Jarocki, P., & Targoński, Z. (2017). Media optimization for economic succinic acid production by *Enterobacter* sp. LU1. *AMB Express*, 7(1), 126. doi:10.1186/s13568-017-0423-0
- Polak-Berecka, M., Waśko, A., Kordowska-Wiater, M., Targoński, Z., & Kubik-Komar, A. (2011). Application of response surface methodology to enhancement of biomass production by *Lactobacillus rhamnosus* E/N. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 42(4), 1485-1494. doi:10.1590/S1517-838220110004000035

- Prasetyo, H. D., Santoso, I., & Maryanto, A. E. (2021). Production of antimicrobial compound from two potential actinomycetes SRM 2 and SD 17 using soluble and local starch. *Journal of Physics: Conference Series*, 1725(1), 012065. doi:10.1088/1742-6596/1725/1/012065
- Prashar, P., Kapoor, N., & Sachdeva, S. (2014). Rhizosphere: its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 13(1), 63-77. doi:10.1007/s11157-013-9317-z
- Qu, Y., Zhang, Z., Ma, Q., Shen, E., Shen, W., Wang, J., . . . Zhou, J. (2015). Biotransformation of Indole and Its Derivatives by a Newly Isolated Enterobacter sp. M9Z. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(7), 3468-3478. doi:10.1007/s12010-015-1518-1
- Raaijmakers, J. M., de Bruijn, I., & de Kock, M. J. D. (2006). Cyclic Lipopeptide Production by Plant-Associated Pseudomonas spp.: Diversity, Activity, Biosynthesis, and Regulation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 19(7), 699-710. doi:10.1094/MPMI-19-0699
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., & Ongena, M. (2010). Natural functions of lipopeptides from Bacillus and Pseudomonas: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6), 1037-1062. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00221.x
- Raaijmakers, J. M., & Mazzola, M. (2012). Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, 50, 403-424. doi:10.1146/annurev-phyto-081211-172908
- Rais, A., Shakeel, M., Hafeez, F. Y., & Hassan, M. N. (2016). Plant growth promoting rhizobacteria suppress blast disease caused by Pyricularia oryzae and increase grain yield of rice. *BioControl*, 61(6), 769-780. doi:10.1007/s10526-016-9763-y
- Rajeswari, P., Jose, P. A., Amiya, R., & Jebakumar, S. R. D. (2015). Characterization of saltern based Streptomyces sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity. *Frontiers in Microbiology*, 5(753). doi:10.3389/fmicb.2014.00753
- Rezzonico, F., Zala, M., Keel, C., Duffy, B., Moënne-Loccoz, Y., & Défago, G. (2007). Is the ability of biocontrol fluorescent pseudomonads to produce the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol really synonymous with higher plant protection? *New Phytologist*, 173(4), 861-872. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01955.x

- Riaz, R., Khan, A., Khan, W. J., Jabeen, Z., Yasmin, H., Naz, R., . . . Hassan, M. N. (2021). Vegetable associated *Bacillus* spp. suppress the pea (*Pisum sativum* L.) root rot caused by *Fusarium solani*. *Biological Control*, *158*, 104610. doi:10.1016/j.biocontrol.2021.104610
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual Reviews in Microbiology*, *56*(1), 117-137. doi:10.1146/annurev.micro.56.012302.161024
- Ross, C., Opel, V., Scherlach, K., & Hertweck, C. (2014). Biosynthesis of antifungal and antibacterial polyketides by *Burkholderia gladioli* in coculture with *Rhizopus microsporus*. *Mycoses*, *57*(s3), 48-55. doi:10.1111/myc.12246
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Sánchez, M., . . . Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, *36*(2), 146-167. doi:10.3109/10408410903489576
- Rustamova, N., Bobakulov, K., Begmatov, N., Turak, A., Yili, A., & Aisa, H. A. (2019). Secondary metabolites produced by endophytic *Pantoea ananatis* derived from roots of *Baccharoides anthelmintica* and their effect on melanin synthesis in murine B16 cells. *Natural Product Research*, *35*(5), 796-801. doi:10.1080/14786419.2019.1597354
- Ryu, C.-M., Farag, M. A., Hu, C.-H., Reddy, M. S., Wei, H.-X., Paré, P. W., & Kloepper, J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(8), 4927-4932. doi:10.1073/pnas.0730845100
- Saier, M. H., Jr, Reddy, V. S., Tsu, B. V., Ahmed, M. S., Li, C., & Moreno-Hagelsieb, G. (2015). The Transporter Classification Database (TCDB): recent advances. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D372-D379. doi:10.1093/nar/gkv1103 %J Nucleic Acids Research
- Sandiford, S. K. (2017). Genome database mining for the discovery of novel lantibiotics. *Expert Opinion on Drug Discovery*, *12*(5), 489-495. doi:10.1080/17460441.2017.1303475
- Santoro, M. V., Cappellari, L. R., Giordano, W., & Banchio, E. (2015). Plant growth-promoting effects of native *Pseudomonas* strains on *Mentha piperita* (peppermint): an in vitro study. *Plant Biology*, *17*(6), 1218-1226. doi:10.1111/plb.12351

- Schaefers, F., Gulder, T. A. M., Bressy, C., Smietana, M., Benedetti, E., Arseniyadis, S., . . . Cordes, M. (2016). Polyketides. In *From Biosynthesis to Total Synthesis* (pp. 19-129): John Wiley & Sons, Inc.
- Scherlach, K., & Hertweck, C. (2006). Discovery of aspoquinolones A-D, prenylated quinoline-2-one alkaloids from *Aspergillus nidulans*, motivated by genome mining. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4(18), 3517-3520. doi:10.1039/B607011F
- Scherlach, K., & Hertweck, C. (2009). Triggering cryptic natural product biosynthesis in microorganisms. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 7(9), 1753-1760. doi:10.1039/B821578B
- Scherlach, K., Partida-Martinez, L. P., Dahse, H.-M., & Hertweck, C. (2006). Antimitotic Rhizoxin Derivatives from a Cultured Bacterial Endosymbiont of the Rice Pathogenic Fungus *Rhizopus microsporus*. *Journal of the American Chemical Society*, 128(35), 11529-11536. doi:10.1021/ja062953o
- Schmidt, Y., van der Voort, M., Crüsemann, M., Piel, J., Josten, M., Sahl, H.-G., . . . Gross, H. (2014). Biosynthetic Origin of the Antibiotic Cyclocarbamate Brabantamide A (SB-253514) in Plant-Associated *Pseudomonas*. *ChemBioChem*, 15(2), 259-266. doi:10.1002/cbic.201300527
- Schomburg, I., Chang, A., Ebeling, C., Gremse, M., Heldt, C., Huhn, G., & Schomburg, D. (2004). BRENDA, the enzyme database: updates and major new developments. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl_1), D431-D433. doi:10.1093/nar/gkh081 %J Nucleic Acids Research
- Schöner, T. A., Gassel, S., Osawa, A., Tobias, N. J., Okuno, Y., Sakakibara, Y., . . . Bode, H. B. (2016). Aryl Polyenes, a Highly Abundant Class of Bacterial Natural Products, Are Functionally Related to Antioxidative Carotenoids. *ChemBioChem*, 17(3), 247-253. doi:10.1002/cbic.201500474
- Schulz-Bohm, K., Martín-Sánchez, L., & Garbeva, P. (2017). Microbial Volatiles: Small Molecules with an Important Role in Intra- and Inter-Kingdom Interactions. *Frontiers in Microbiology*, 8. doi:10.3389/fmicb.2017.02484
- Schwarzer, D., Finking, R., & Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Natural Product Reports*, 20(3), 275-287. doi:10.1039/B111145K
- Schwarzer, D., & Marahiel, M. A. (2001). Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften*, 88(3), 93-101. doi:10.1007/s001140100211

- Selegato, D. M., Freire, R. T., Pilon, A. C., Biasetto, C. R., de Oliveira, H. C., de Abreu, L. M., . . . Castro-Gamboa, I. (2019). Improvement of bioactive metabolite production in microbial cultures—A systems approach by OSMAC and deconvolution-based ¹HNMR quantification. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 57(8), 458-471. doi:10.1002/mrc.4874
- Sélem-Mojica, N., Aguilar, C., Gutiérrez-García, K., Martínez-Guerrero, C. E., & Barona-Gómez, F. (2019). EvoMining reveals the origin and fate of natural product biosynthetic enzymes. *Microbial genomics*, 5(12), e000260. doi:10.1099/mgen.0.000260
- Seyedsayamdost, M. R., Chandler, J. R., Blodgett, J. A. V., Lima, P. S., Duerkop, B. A., Oinuma, K.-I., . . . Clardy, J. (2010). Quorum-Sensing-Regulated Bactobolin Production by *Burkholderia thailandensis* E264. *Organic Letters*, 12(4), 716-719. doi:10.1021/ol902751x
- Shantharaj, D., Williams, M. A., Potnis, N. S., & Liles, M. R. (2021). *Burkholderia gladioli* C101 metabolites protect tomato plants against *Xanthomonas perforans* infection. *Journal of Plant Diseases and Protection*. doi:10.1007/s41348-020-00416-9
- Sharmila, G., Nidhi, B., & Muthukumaran, C. (2013). Sequential statistical optimization of red pigment production by *Monascus purpureus* (MTCC 369) using potato powder. *Industrial Crops and Products*, 44, 158-164. doi:10.1016/j.indcrop.2012.11.007
- Shi, H., Huang, X., Wang, Z., Guan, Y., & Zhang, X. (2019). Improvement of pyoluteorin production in *Pseudomonas protegens* H78 through engineering its biosynthetic and regulatory pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(8), 3465-3476. doi:10.1007/s00253-019-09732-z
- Shilev, S. (2013). Soil Rhizobacteria Regulating the Uptake of Nutrients and Undesirable Elements by Plants. In N. K. Arora (Ed.), *Plant Microbe Symbiosis: Fundamentals and Advances* (pp. 147-167). New Delhi: Springer India.
- Showkat, S., Murtaza, I., Laila, O., & Ali, A. (2012). Biological control of *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus* sp. by *Pseudomonas fluorescens* isolated from wheat rhizosphere soil of Kashmir. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 1(4), 24-32.
- Sierra, J. R., & Moreno-Sarmiento, N. (2008). Producción y formulación de prototipos de un biofertilizante a partir de bacterias nativas asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 50-62.
- Silva Gama, G. (2020). *Evaluación de la harina de chachafruto como ingrediente para la elaboración de un producto de panadería libre de gluten*. (Master), Universidad

Nacional de Colombia, Bogotá. Retrieved from <https://repositorio.unal.edu.co/bitstream/handle/unal/77707/Tesis%20Evaluaci%20c3%b3n%20de%20la%20harina%20de%20chachafruto%20como%20ingrediente%20en%20la%20elaboraci%20c3%b3n%20de%20un%20producto%20de%20panader%20c3%ada%20libre%20de%20guten..pdf?sequence=5&isAllowed=y>

- Singh, R. P., Jha, P., & Jha, P. N. (2017). Bio-inoculation of Plant Growth-promoting Rhizobacterium *Enterobacter cloacae* ZNP-3 Increased Resistance Against Salt and Temperature Stresses in Wheat Plant (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Plant Growth Regulation*, 1-16. doi:10.1007/s00344-017-9683-9
- Singh, V., Haque, S., Niwas, R., Srivastava, A., Pasupuleti, M., & Tripathi, C. K. M. (2017). Strategies for Fermentation Medium Optimization: An In-Depth Review. *Frontiers in Microbiology*, 7(2087). doi:10.3389/fmicb.2016.02087
- Skartland, L. K., Mjøs, S. A., & Grung, B. (2011). Experimental designs for modeling retention patterns and separation efficiency in analysis of fatty acid methyl esters by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(38), 6823-6831. doi:10.1016/j.chroma.2011.07.077
- Skininder, M. A., Johnston, C. W., Gunabalasingam, M., Merwin, N. J., Kieliszek, A. M., MacLellan, R. J., . . . Magarvey, N. A. (2020). Comprehensive prediction of secondary metabolite structure and biological activity from microbial genome sequences. *Nature Communications*, 11(1), 6058. doi:10.1038/s41467-020-19986-1
- Smith, D., Praslickova, D., & Ilangumaran, G. (2015). Inter-organismal signaling and management of the phytomicrobiome. *Frontiers in plant science*, 6(722). doi:10.3389/fpls.2015.00722
- Smith, L., Hong, H., Spencer, J. B., & Leadlay, P. F. (2008). Analysis of Specific Mutants in the Lasalocid Gene Cluster: Evidence for Enzymatic Catalysis of a Disfavoured Polyether Ring Closure. *ChemBioChem*, 9(18), 2967-2975. doi:10.1002/cbic.200800585
- Solanki, M. K., Singh, R. K., Srivastava, S., Kumar, S., Kashyap, P. L., Srivastava, A. K., & Arora, D. K. (2014). Isolation and characterization of siderophore producing antagonistic rhizobacteria against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Basic Microbiology*, 54(6), 585-597. doi:10.1002/jobm.201200564
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., & Remans, R. (2007). Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(4), 425-448. doi:10.1111/j.1574-6976.2007.00072.x %J FEMS Microbiology Reviews

- Spago, F. R., Ishii Mauro, C. S., Oliveira, A. G., Beranger, J. P. O., Cely, M. V. T., Stanganelli, M. M., . . . Andrade, G. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* produces secondary metabolites that have biological activity against plant pathogenic *Xanthomonas* species. *Crop Protection*, 62(0), 46-54. doi:10.1016/j.cropro.2014.04.011
- Spence, C., Alff, E., Johnson, C., Ramos, C., Donofrio, N., Sundaresan, V., & Bais, H. (2014). Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections. *BMC Plant Biology*, 14(1), 130. doi:10.1186/1471-2229-14-130
- Strieker, M., Tanović, A., & Marahiel, M. A. (2010). Nonribosomal peptide synthetases: structures and dynamics. *Current Opinion in Structural Biology*, 20(2), 234-240. doi:10.1016/j.sbi.2010.01.009
- Suárez-Moreno, Z. R., Vinchira-Villarraga, D. M., Vergara-Morales, D. I., Castellanos, L., Ramos, F. A., Guarnaccia, C., . . . Moreno-Sarmiento, N. (2019). Plant-Growth Promotion and Biocontrol Properties of Three *Streptomyces* spp. Isolates to Control Bacterial Rice Pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.00290
- Subramanian, S. (2013). *Mass spectrometry based proteome profiling to understand the effects of lipo-chito-oligosaccharide and thuricin 17 in Arabidopsis thaliana and Glycine max under salt stress*. McGill University, Montreal, Quebec.
- Subramanian, S., Souleimanov, A., & Smith, D. L. (2016). Proteomic Studies on the Effects of Lipo-Chitooligosaccharide and Thuricin 17 under Unstressed and Salt Stressed Conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in plant science*, 7, 1314-1314. doi:10.3389/fpls.2016.01314
- Süssmuth, R. D., & Mainz, A. (2017). Nonribosomal Peptide Synthesis—Principles and Prospects. *Angewandte Chemie International Edition*, 56(14), 3770-3821. doi:10.1002/anie.201609079
- Thistlethwaite, I. R. G., Bull, Freya M., Cui, C., Walker, P. D., Gao, S.-S., Wang, L., . . . Willis, C. L. (2017). Elucidation of the relative and absolute stereochemistry of the kalimantacin/batumin antibiotics. *Chemical Science*, 8(9), 6196-6201. doi:10.1039/C7SC01670K
- Thongkongkaew, T., Ding, W., Bratovanov, E., Oueis, E., García-Altare, M. a., Zaburannyi, N., . . . Hertweck, C. (2018). Two Types of Threonine-Tagged Lipopeptides Synergize in Host Colonization by Pathogenic *Burkholderia* Species. *ACS Chemical Biology*, 13(5), 1370-1379. doi:10.1021/acscchembio.8b00221

- Till, M., & Race, P. R. (2016). The Assembly Line Enzymology of Polyketide Biosynthesis. In B. S. Evans (Ed.), *Nonribosomal Peptide and Polyketide Biosynthesis: Methods and Protocols* (pp. 31-49). New York, NY: Springer New York.
- Trantas, E., Licciardello, G., Almeida, N., Witek, K., Strano, C., Duxbury, Z., . . . Sarris, P. (2015). Comparative genomic analysis of multiple strains of two unusual plant pathogens: *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas mediterranea*. *Frontiers in Microbiology*, 6(811). doi:10.3389/fmicb.2015.00811
- Trujillo, I., Díaz, A., Hernández, A., & Heydrich, M. (2007). Antagonist activity of *Pseudomonas fluorescens* and *Burkholderia cepacia* strains against rice and maize phytopathogenic fungi. *Revista de Protección Vegetal*, 22(1), 41-46.
- Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P. (2016). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends in Microbiology*, 25(4), 280-292. doi:10.1016/j.tim.2016.12.002
- Vaidya, R., Vyas, P., & Chhatpar, H. S. (2003). Statistical optimization of medium components for the production of chitinase by *Alcaligenes xylosoxydans*. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(1), 92-96. doi:10.1016/S0141-0229(03)00100-5
- Valiante, V., Mattern, D. J., Schöffler, A., Horn, F., Walther, G., Scherlach, K., . . . Brakhage, A. A. (2017). Discovery of an Extended Austinoid Biosynthetic Pathway in *Aspergillus calidoustus*. *ACS Chemical Biology*, 12(5), 1227-1234. doi:10.1021/acscchembio.7b00003
- van Heel, A. J., de Jong, A., Song, C., Viel, J. H., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2018). BAGEL4: a user-friendly web server to thoroughly mine RiPPs and bacteriocins. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W278-W281. doi:10.1093/nar/gky383
- Vasiee, A., Behbahani, B. A., Yazdi, F. T., & Moradi, S. (2016). Optimization of the production conditions of the lipase produced by *Bacillus cereus* from rice flour through Plackett-Burman Design (PBD) and response surface methodology (RSM). *Microbial Pathogenesis*, 101, 36-43. doi:10.1016/j.micpath.2016.10.020
- Velusamy, P., Immanuel, J. E., Gnanamanickam, S. S., & Thomashow, L. (2006). Biological control of rice bacterial blight by plant-associated bacteria producing 2,4-diacetylphloroglucinol. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(1), 56-65. doi:10.1139/w05-106
- Wang, H., Fewer, D. P., Holm, L., Rouhiainen, L., & Sivonen, K. (2014). Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(25), 9259-9264. doi:10.1073/pnas.1401734111

- Wang, M., Carver, J. J., Phelan, V. V., Sanchez, L. M., Garg, N., Peng, Y., . . . Bandeira, N. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, *34*(8), 828-837. doi:10.1038/nbt.3597
- Wang, X., Huang, Y., Sheng, Y., Su, P., Qiu, Y., Ke, C., & Feng, D. (2017). Antifouling Activity towards Mussel by Small-Molecule Compounds from a Strain of *Vibrio alginolyticus* Bacterium Associated with Sea Anemone *Haliplanella* sp. *Journal of microbiology and biotechnology*, *27*(3), 460-470. doi:10.4014/jmb.1607.07068
- Weber, T., Rausch, C., Lopez, P., Hoof, I., Gaykova, V., Huson, D. H., & Wohlleben, W. (2009). CLUSEAN: A computer-based framework for the automated analysis of bacterial secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Journal of Biotechnology*, *140*(1), 13-17. doi:10.1016/j.jbiotec.2009.01.007
- Wu, Q., Zhang, G., Wang, B., Li, X., Yue, S., Chen, J., . . . Wang, H. (2018). Production and Identification of Inthomycin B Produced by a Deep-Sea Sediment-Derived *Streptomyces* sp. YB104 Based on Cultivation-Dependent Approach. *Current Microbiology*, *75*(7), 942-951. doi:10.1007/s00284-018-1469-1
- Xiao, D., Li, W., Wei, T., Wu, Z., & Xie, L. (2010). Advances in the studies of Rice stripe virus. *Frontiers of Agriculture in China*, *4*(3), 287-292. doi:10.1007/s11703-010-1039-1
- Yaikhan, T., Chuerboon, M., Tippayatham, N., Atimuttikul, N., Nuidate, T., Yingkajorn, M., . . . Tansila, N. (2019). Indole and Derivatives Modulate Biofilm Formation and Antibiotic Tolerance of *Klebsiella pneumoniae*. *Indian Journal of Microbiology*, *59*(4), 460-467. doi:10.1007/s12088-019-00830-0
- Yang, J., Zhu, X., Cao, M., Wang, C., Zhang, C., Lu, Z., & Lu, F. (2016). Genomics-Inspired Discovery of Three Antibacterial Active Metabolites, Aurantinins B, C, and D from Compost-Associated *Bacillus subtilis* fmb60. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *64*(46), 8811-8820. doi:10.1021/acs.jafc.6b04455
- Yarzabal, L. A., & Chica, E. J. (2019). Chapter 3 - Role of Rhizobacterial Secondary Metabolites in Crop Protection Against Agricultural Pests and Diseases. In V. K. Gupta & A. Pandey (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering* (pp. 31-53). Amsterdam: Elsevier.
- Ye, S., Molloy, B., Braña, A. F., Zabala, D., Olano, C., Cortés, J., . . . Méndez, C. (2017). Identification by Genome Mining of a Type I Polyketide Gene Cluster from *Streptomyces argillaceus* Involved in the Biosynthesis of Pyridine and Piperidine Alkaloids Argimycins P. *Frontiers in Microbiology*, *8*(194). doi:10.3389/fmicb.2017.00194

- Zarandi, M. E., Bonjar, G., Dehkaei, F. P., Moosavi, S., Farokhi, P. R., & Aghighi, S. (2009). Biological Control of Rice Blast (*Magnaporthe oryzae*) by use of *Streptomyces sindeneusis* isolate 263 in Greenhouse. *American Journal of Applied Sciences*, 6(1).
- Zeng, Y.-x., Ji, Z.-j., Ma, L.-y., Li, X.-m., & Yang, C.-d. (2011). Advances in Mapping Loci Conferring Resistance to Rice Sheath Blight and Mining *Rhizoctonia solani* Resistant Resources. *Rice Science*, 18(1), 56-66. doi:10.1016/S1672-6308(11)60008-5
- Zhang, J., Li, B., Qin, Y., Karthik, L., Zhu, G., Hou, C., . . . Liu, X. (2020). A new abyssomicin polyketide with anti-influenza A virus activity from a marine-derived *Verrucospora* sp. MS100137. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(4), 1533-1543. doi:10.1007/s00253-019-10217-2
- Zhang, M. M., Qiao, Y., Ang, E. L., & Zhao, H. (2017). Using natural products for drug discovery: the impact of the genomics era. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 12(5), 475-487. doi:10.1080/17460441.2017.1303478
- Zhang, X., Baars, O., & Morel, F. M. M. (2018). Genetic, structural, and functional diversity of low and high-affinity siderophores in strains of nitrogen fixing *Azotobacter chroococcum*†. *Metallomics*, 11(1), 201-212. doi:10.1039/c8mt00236c %J Metallomics
- Zhao, X., & Kuipers, O. P. (2016). Identification and classification of known and putative antimicrobial compounds produced by a wide variety of Bacillales species. *BMC Genomics*, 17(1), 882. doi:10.1186/s12864-016-3224-y
- Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q., & Li, Y. (2013). Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biological Control*, 65(2), 200-206. doi:10.1016/j.biocontrol.2013.02.004
- Zhou-qi, C., Bo, Z., Guan-lin, X., Bin, L., & Shi-wen, H. (2016). Research Status and Prospect of *Burkholderia glumae*, the Pathogen Causing Bacterial Panicle Blight. *Rice Science*, 23(3), 111-118. doi:10.1016/j.rsci.2016.01.007
- Zhou, T., Chen, D., Li, C., Sun, Q., Li, L., Liu, F., . . . Shen, B. (2012). Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* and identification of its antimicrobial components. *Microbiological Research*, 167(7), 388-394. doi:10.1016/j.micres.2012.01.003

Zhu, F., Han, B., Kumar, P., Liu, X., Ma, X., Wei, X., . . . Chen, Y. (2009). Update of TTD: Therapeutic Target Database. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_1), D787-D791. doi:10.1093/nar/gkp1014 %J Nucleic Acids Research

Ziemert, N., Alanjary, M., & Weber, T. (2016). The evolution of genome mining in microbes – a review. *Natural Product Reports*, 33(8), 988-1005. doi:10.1039/C6NP00025H