

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE MICROORGANISMOS PROCEDENTES DE
MACROORGANISMOS MARINOS COLOMBIANOS, COMO AGENTES BIOCONTROLADORES DE
Colletotrichum spp., CAUSANTE DE ANTRACNOSIS EN FRESA (*Fragaria sp*)**



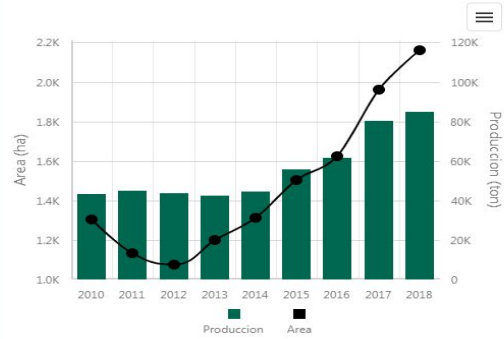
**Presentado por:
NATALIA RIVEROS FRAILE
RUBI ALEJANDRA ROSERO CALDERON**

**ADRIANA ROCÍO ROMERO OTERO
Asesora externa
LIGIA CONSUELO SANCHEZ MS.c
Asesora interna**

**UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO
BOGOTÁ D.C.
2019**

INTRODUCCIÓN

Área Cosechada y Producción



<https://www.agronet.gov.co/estadistica/Paginas/home.aspx?cod=1>



ANTRACNOSIS

Agente causal:

Colletotrichum spp



INFECTED WHITE FRUIT INFECTED SEMI-MATURE FRUIT INFECTED MATURE FRUIT
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pmp.2015.10.003>



https://www.google.com/url?sa=i&imgcat=images&source=images&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=8url=https%3A%2F%2Fwww.hydroenv.com.mx%2Fcatalogo%2Findex.php%3Fm&ai_page%3Dpage%26id%3D121&psig=ADvw16fmydK8b.wZmCvCk.BV&ust=1573258617006440

CONTROL CULTURAL



<http://www.google.com/url?sa=i&imgcat=images&source=images&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=8url=https%3A%2F%2Fwww.garden.com/blog/2008/02/20/2008-02-20-control-cultivo-de-plantas-en-el-campo>

- *Toxicidad.
- *Poca selectividad.
- *Falta de aceptación en el consumidor.
- *Resistencia antifúngica.



<https://www.google.com/url?sa=i&imgcat=images&source=images&cd=1&ved=8url=https%3A%2F%2Fwww.efesalud.com/2012/05/25/fondos-marinos-abren-la-puerta-a-la-creacion-de-nuevos-farmacos-contr-el-cancer%2F&psig=ADvw16fmydK8b.wZmCvCk.BV&ust=1573258617006440>



<http://enjobs.es/lanzar-nuevo-producto/>



<http://www.google.com/url?sa=i&imgcat=images&source=images&cd=1&ved=8url=https%3A%2F%2Fwww.miamasa.com%2Fnoticias%2Fattachmen%2Famigable-con-el-ambiente%2F&psig=ADvw16fmydK8b.wZmCvCk.BV&ust=1573258617006440>

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el potencial biocontrolador de aislamientos microbianos obtenidos de macroorganismos marinos en el caribe colombiano para el manejo del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp. en cultivos de *Fragaria* sp.



OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Conformar una colección de microorganismos cultivables a partir de muestras de macroorganismos marinos recolectados en el caribe colombiano.
- Evaluar la actividad biocontroladora de la colección obtenida de microorganismos marinos frente a un aislamiento colombiano de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en cultivos de *Fragaria* sp.
- Caracterizar los microorganismos aislados que presentan actividad biocontroladora frente a *Colletotrichum* spp. mediante técnicas bioquímicas y moleculares.

ANTECEDENTES

Primer aislamiento de un Producto Natural Marino: **spongotimina** aislada de una esponja.

1950

Métodos de aislamiento de hongos asociados a organismos marinos

2009

Glicolípidos extraídos de **Bacillus licheniformis** presentan actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum acutatum*.

2015

Los hongos marinos **Trichoderma asperellum** y *T. harzianum* inhiben en un 100% el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*.

2019

Diversidad de actinobacterias provenientes de sedimentos marinos

2005

Pseudoalteromonas tunicata y *Stenotrophomonas* aisladas de **esponja, erizo** de mar y *Ophiura* presentan actividad antifúngica

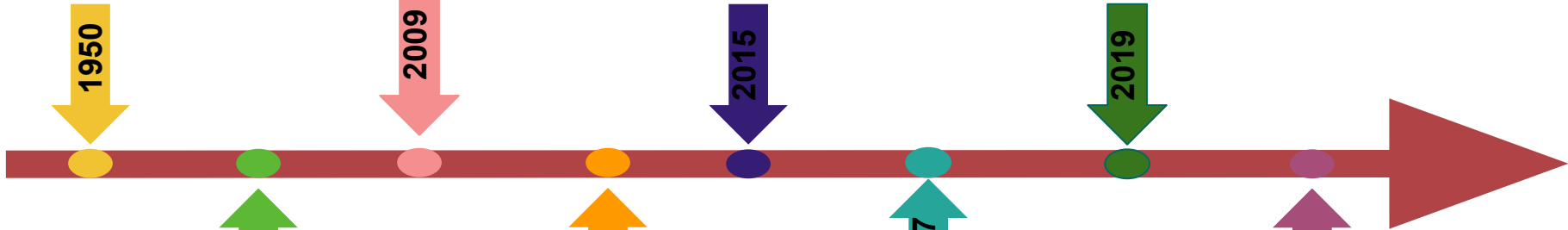
2010

Aislamiento de actinobacterias procedentes de muestras de **sedimentos, invertebrados y algas** provenientes de Providencia y Santa Catalina.

2017

Dos **metabolitos** aislados de *Streptomyces* proveniente de un alga verde presentan actividad frente a *Colletotrichum gloeosporioides*

2019



MARCO TEÓRICO

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL CULTIVO DE FRESA

REINO	Plantae
ORDEN	Rosales
FAMILIA	Rosaceae
GÉNERO	<i>Fragaria</i>

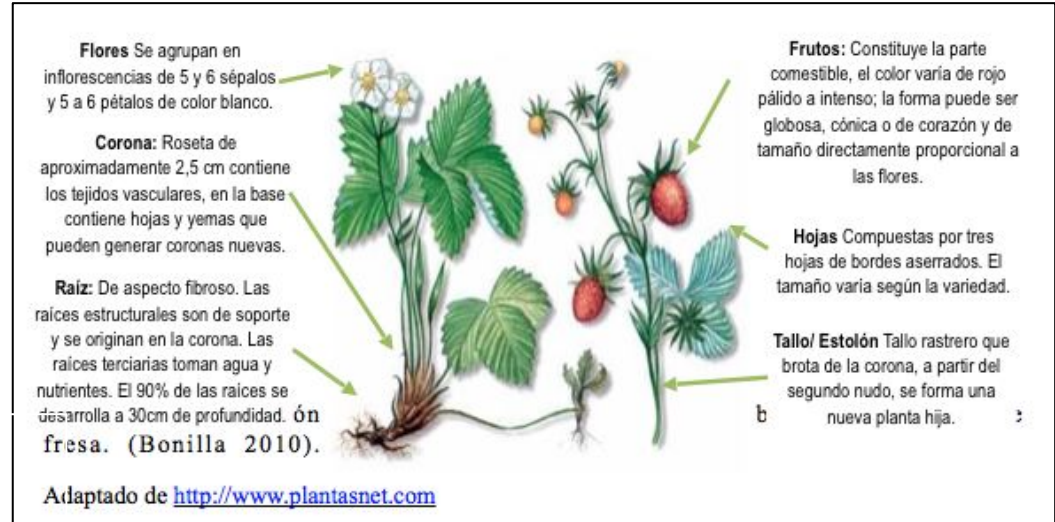
CONDICIONES DE CULTIVO

Temperatura: 15 - 20 °C

Humedad: 60-70%

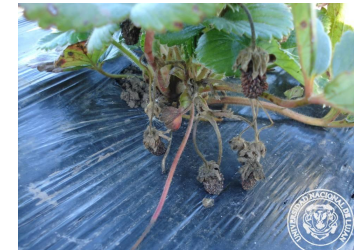
CICLO FENOLÓGICO

150 días



Nombre común	Agente causal
Putridión del fruto	<i>Botrytis cinérea</i>
Viruela	<i>Mycosphaerella fragariae</i>
Antracnosis	<i>Colletotrichum sp</i>
Mancha Angular	<i>Xanthomonas sp</i>

<http://hdl.handle.net/11520/14312>

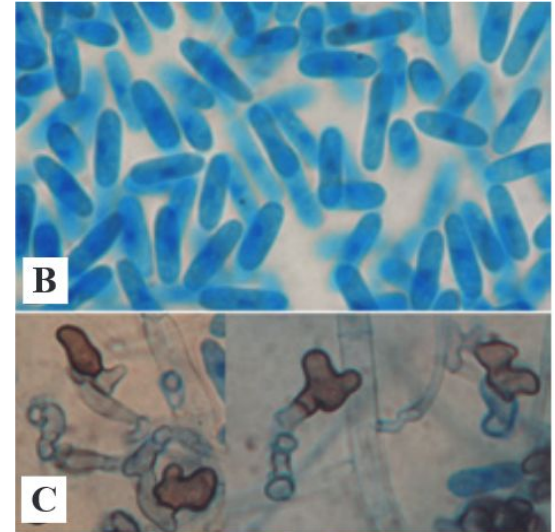
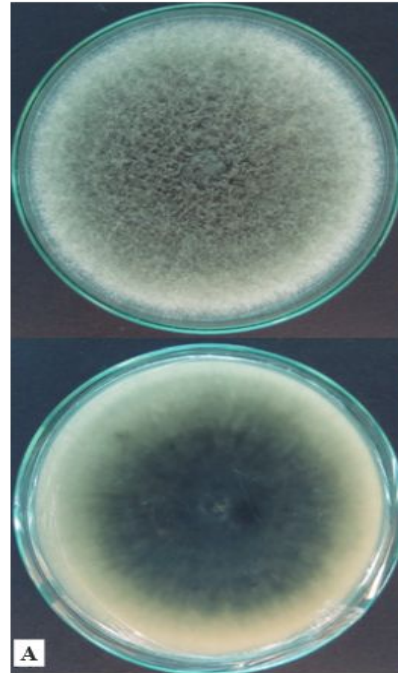


<https://www.google.com/url?sa=i&url=http%3A%2F%2Fwww.patologiavetegat.unlu.edu.ar%2F%3Fq%3Dnode%2F69&psig=AOvVaw1ch-OLVUfWgE7210VgerE&ust=1574626248189000&source=images>

MARCO TEÓRICO

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO *Colletotrichum* spp

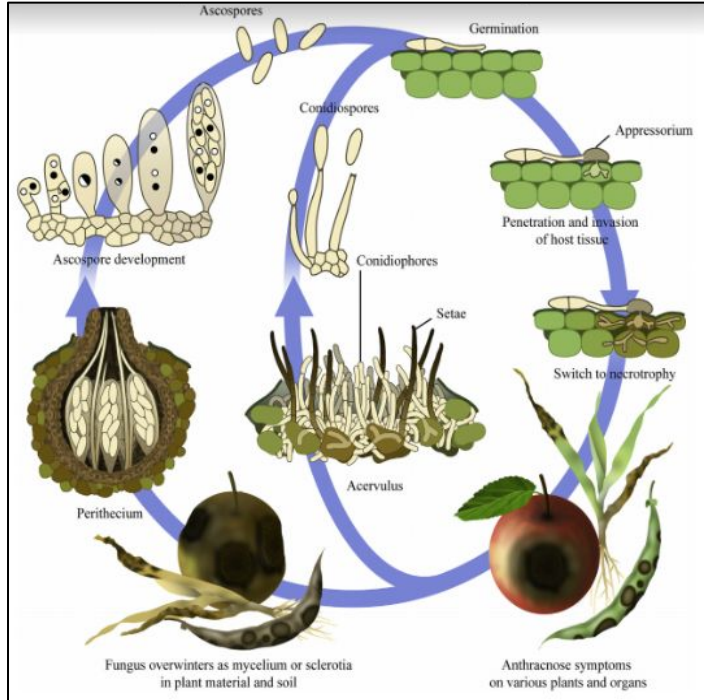
REINO	Fungi
DIVISIÓN	Ascomycota
CLASE	Sordariomycetes
FAMILIA	Glomerellaceae
GÉNERO	<i>Colletotrichum</i> (asexual) <i>Glomerella</i> (sexual)



<https://doi.org/10.18257/raccefy.192>

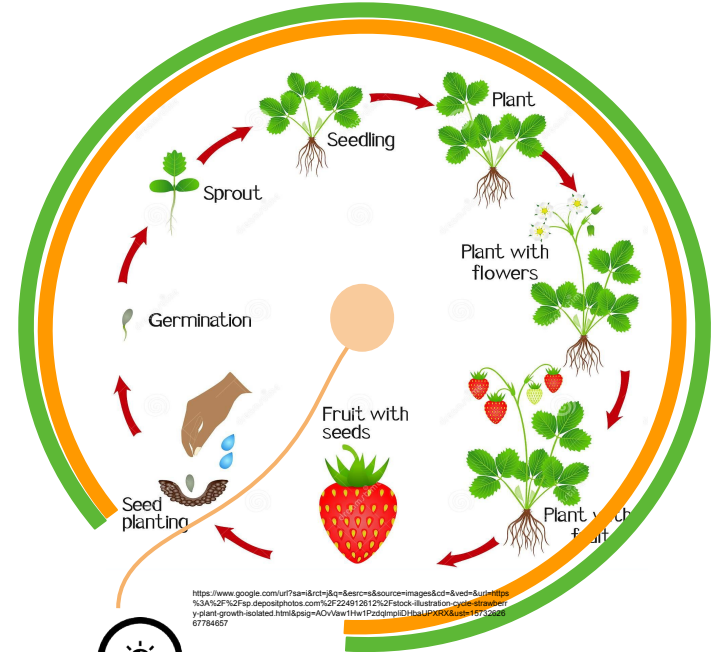
MARCO TEÓRICO

CICLO DE INFECCIÓN



<https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>

-  **Ciclo de la fresa**
-  **Propagación del hongo**
-  **Detección de enfermedades**



Temperatura



Humedad



Luminosidad

MARCO TEÓRICO

CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS AMBIENTES MARINOS



https://www.google.com/url?sa=i&chj&e&source=images&cd&ved&url=https://www.shutterstock.com/2fe%2fsearch%2fimagenes%2fprofundad%3fimage_type%3Dillustration&pg=AOVlwa0XV0o9icGEYBMjMD-U-KW&ust=1573262851248102

- ↑ Presión atmosférica
- ↓ Temperatura 2°C
- ↓ Concentración de oxígeno
- ↓ Intensidad luminosa



https://www.google.com/url?sa=i&chj&e&source=images&cd&ved&url=https://www.shutterstock.com/2fe%2fsearch%2fimagenes%2fprofundad%3fimage_type%3Dillustration&pg=AOVlwa0XV0o9icGEYBMjMD-U-KW&ust=1573262851248102



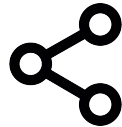
http://www.google.com/url?sa=i&chj&e&source=images&cd&ved&url=https://www.shutterstock.com/2fe%2fsearch%2fimagenes%2fprofundad%3fimage_type%3Dillustration&pg=AOVlwa0XV0o9icGEYBMjMD-U-KW&ust=1573262851248102

BIOTECNOLOGÍA

ADAPTACIÓN



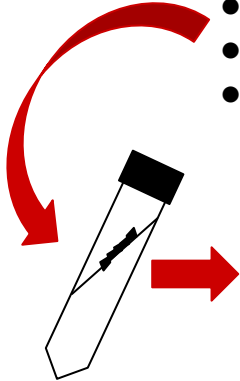
MECANISMOS DE DEFENSA



METODOLOGÍA

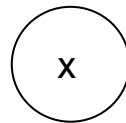
84
MUESTRAS

- Islas del Rosario
- Cartagena
- Isla arena



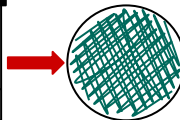
1. Microorganismos epifitos:

- Hongos
- Bacterias



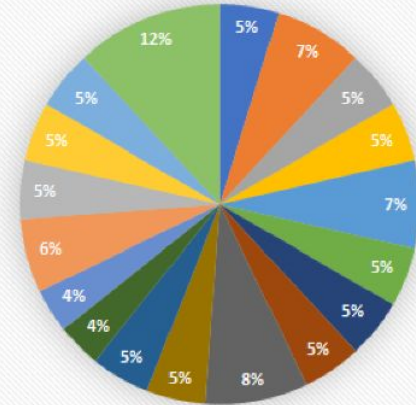
2. Microorganismos endófitos:

- Bacterias



<http://www.medicambienterent.com/productos/p-rocesamiento-de-muestras/caja-para-crioalies/>

AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

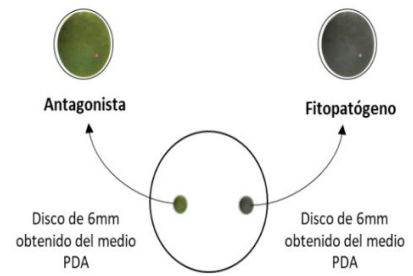


■ Amphiroa ■ Alga roja no específica ■ Laurencia Aeropuerto ■ Hypnea musciformis
■ Chaetomorpha ■ Caulerpa sertularioides ■ Caulerpa racemosa ■ Ulva lactuca
■ Pterogorgia anceps ■ Eunicea ■ Padina ■ Sargassum
■ Spirastella coccinea ■ Niphates erecta ■ Xeotospongia muta ■ Monanchora arbuscula
■ Calyspongia vaginalis ■ No especificado

METODOLOGÍA

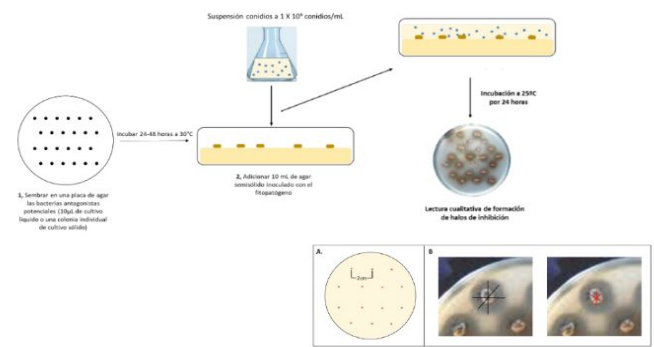
EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

Figura 9. Protocolo enfrentamiento *in vitro* (Hongo-hongo)^{70*}.



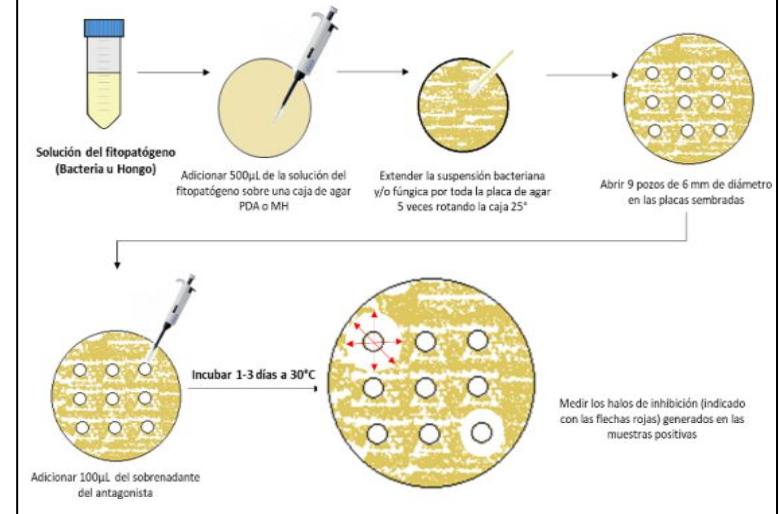
*Figura tomada: Protocolos curso de Microbiología.2017

Figura 10. Ensayo de bioautografía por overlay sobre medio sólido*.



*Figura tomada de: Protocolos del curso de Microbiología. 2017⁷⁰.

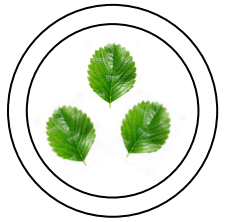
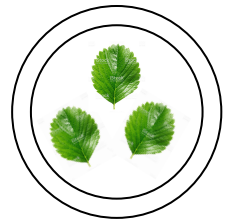
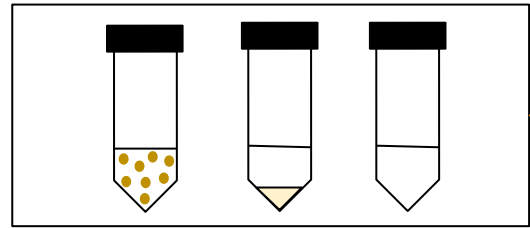
Figura 11. Ensayo de difusión en placa*.



Screening secundario

METODOLOGÍA

ENSAYO EN HOJA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS



CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR

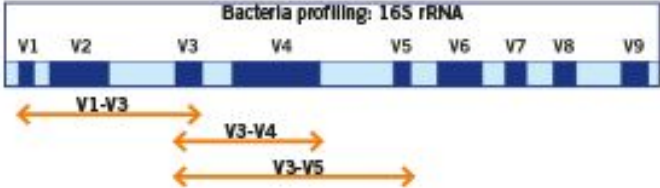
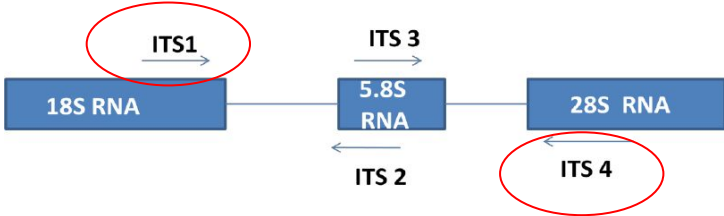


Corporación colombiana de investigación agropecuaria

**IDENTIFICACIÓN
BIOQUÍMICA**
Equipo Microscan WalkAway
plus de Beckman Coulter

HONGOS
ITS- 4. TCCTCCGCTTATTGATAT
ITS -1. TCCGTAGGTGAACCTGCG

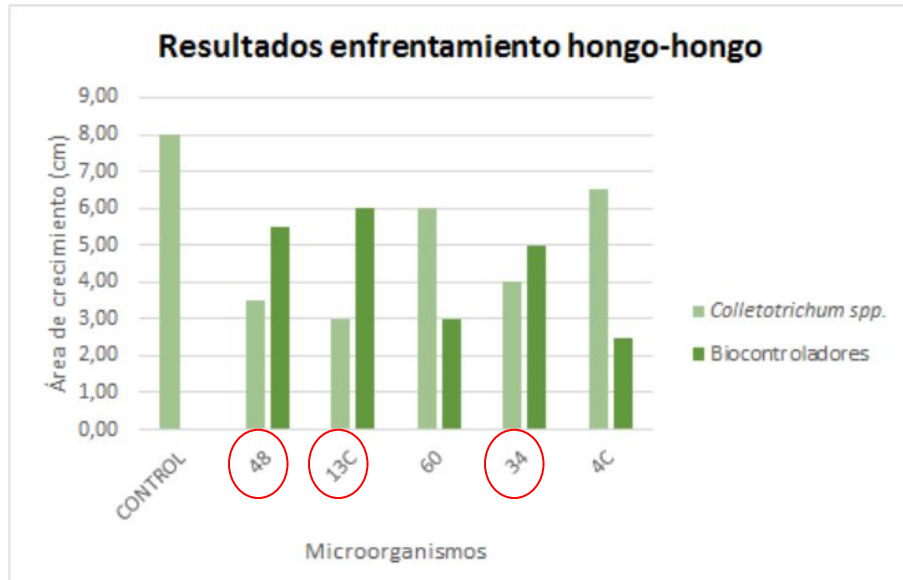
BACTERIAS
27F (5'- AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'),
1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

Figura 13. Resultados de medición de las áreas de inhibición de los hongos antagonísticos frente a *Colletotrichum* spp



1. **Ensayo Cuantitativo:** $X = ((G2/G1) \times 100) - 100$

Dónde: X= porcentaje de inhibición, G1= al crecimiento del fitopatógeno en las placas de agar control y G2= al crecimiento del fitopatógeno en las placas tratadas con el antagonista.

2. **Ensayo Cualitativo:**

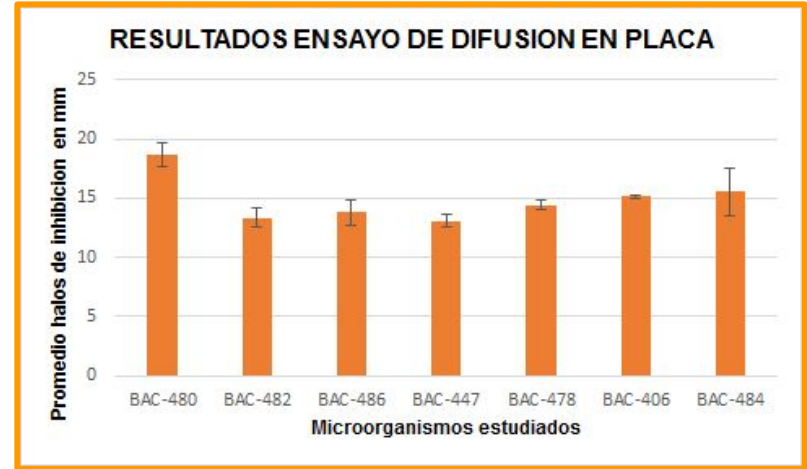
NIVEL DE ANTAGONISMO	CARACTERÍSTICA A EVALUAR
1	El antagonista crece totalmente sobre el fitopatógeno
2	El antagonista crece sobre las 2/3 partes de la caja de cultivo, inhibiendo el crecimiento y desarrollo del fitopatógeno
3	El antagonista y el fitopatógeno ocupan espacios iguales en la caja de cultivo, observándose que no hay competencia entre ellos
4	El fitopatógeno crece sobre las 2/3 partes de la caja de cultivo, inhibiendo el crecimiento y desarrollo del antagonista
5	El fitopatógeno crece totalmente sobre el antagonista

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS












SCREENING PRIMARIO












SCREENING SECUNDARIO

RESULTADOS Y DISCUSIÓN





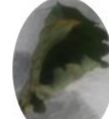

ENSAYO EN HOJA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

CONTROL SANO		
		
Daño: 23.59%	0%	0%
		
1.64%	0%	0%
		
1.3%	1.9%	3.7%

1,07%

CONTROL PATÓGENO		
		
100%	93.25%	96.79%
		
91.4%	8.72%	8.3%
		
11.7%	97%	70.8%

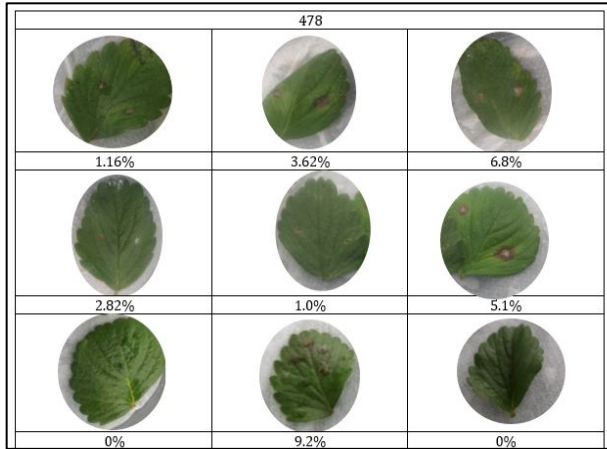
71,00%

Benomyl		
		
10.33%	94.52%	4.4%
		
0%	2.0%	0%

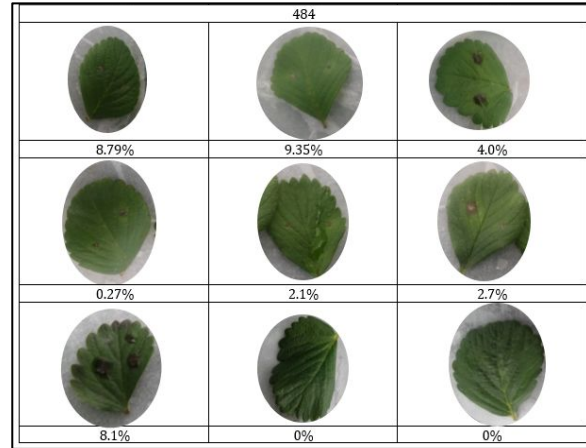
4,57%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

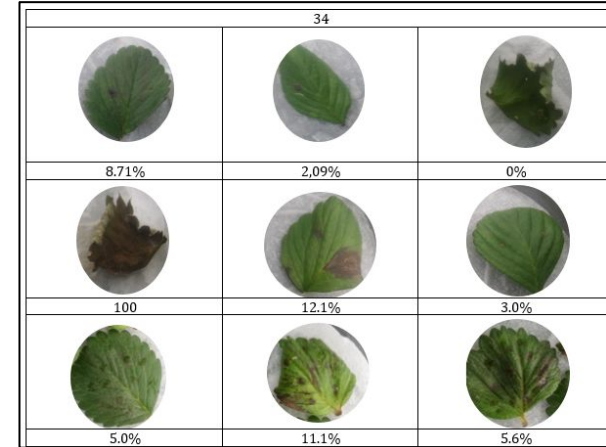
ENSAYO EN HOJA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS



2,18%



3,23%



5,94%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ENSAYO EN HOJA DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

Resultados obtenidos sin dato atípico

LECTURA	Porcentajes de daño								Promedio	Desviación estándar
	1	2	3	4	5	6	7	8		
Control sano	0	0	1,64	0	0	3,7	1,3	1,9	1,07	1,19
Benomyl	10,33	4,4	0	0	8,1				4,57	3,82
Control patógeno	93,25	96,79	91,4	8,72	11,7	96,1	99,3	70,8	71,00	34,01
406	82,88	6,92	94,1	18,42	6,5	53,4	65,3	23,7	43,89	30,57
34	8,71	2,09	0	12,1	3,0	5,0	11,1	5,6	5,94	3,83
48	9,59	64,9	25,32	9,5	18,6	37,1	40,7	33,7	29,93	16,28
13C	4,87	0	2,69	8,1	4,7	19,2	27,4	22,0	11,13	9,03
447	57,07	4,4	61,53	4,5	2,6	39,4	27,2	52,0	31,10	21,99
482	4,33	7,89	42,5	49,59	4,1	11,1	23,6	18,5	20,21	15,35
484	8,79	4,0	0,27	2,1	2,7	8,1	0	0	3,23	3,10
478	1,16	3,62	6,8	2,82	1,0	5,1	0	0	2,57	2,18
486	5,04	3,36	39,9	2,64	4,8	8,5	0	29,2	11,69	12,88
489	39,31	17,73	13,6	10,71	3,0	26,4	12,8	42,8	20,80	12,49

Aislamiento fúngico



Aislamientos bacterianos



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 17. Resultados tinción de Gram. Bacilos Gram negativos

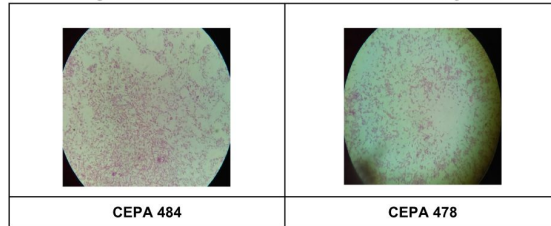
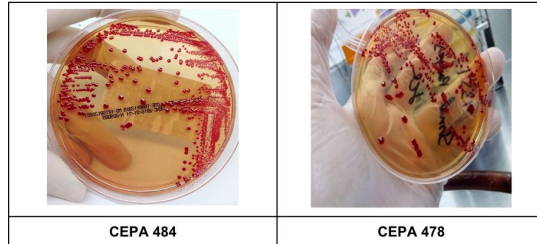


Figura 18. Crecimiento en agar Mac Conkey. Colonias rojas fermentadoras lentas de lactosa.



CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR

AI SLAMI ENTO	SECUENCIA	BLAST	% SIMILARIDAD	EZ TAXON	% SIMILARIDAD	RDP	% SIMILARIDAD
478	FORWARD	<i>Serratia</i> sp. NIAU-VI9bac	99,5%	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	99%	<i>Serratia marcescens</i> CF-S28	98,6%
		<i>Serratia marcescens</i> SGB02	99,5%	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	98%	<i>Serratia marcescens</i> IRIG0500	98%
		<i>Serratia marcescens</i> HDO1	99,5%	<i>Serratia marcescens</i> KRED	98%	<i>Serratia marcescens</i> IRIG0501	98%
	REVERSE	<i>Serratia marcescens</i> WW4	99,8%	<i>Serratia marcescens</i> KRED	99,8%	<i>Serratia</i> sp. BZ-L	99%
		<i>Serratia marcescens</i> CF-S28	99,6%	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	99,8%	<i>Serratia</i> sp. XT-32	99%
		<i>Serratia marcescens</i> subsp. sakuensis B7	99,6%	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	99,4%	<i>Serratia</i> sp. XT-1	99%
484	FORWARD	<i>Serratia marcescens</i> ZK2	99,2%	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	100%	<i>Serratia marcescens</i> 21-2	100%
		<i>Serratia marcescens</i> ZCL-01	99,1%	<i>Serratia marcescens</i> KRED	100%	<i>Serratia marcescens</i>	99,6%
		<i>Serratia</i> sp. Jx-14	99,1%	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	100%	<i>Serratia marcescens</i> AS-1	99,6%
	REVERSE	<i>Serratia marcescens</i> 21-2	100%	<i>Serratia marcescens</i> KRED	100%	<i>Serratia</i> sp. PRGB11	97,1%
		<i>Serratia</i> sp. EM017	99,8%	<i>Serratia nematodiphila</i> DSM 21420	100%	<i>Serratia</i> sp. PSG07	97,1%
		<i>Serratia marcescens</i> subsp. sakuensis B7	99,8%	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13880	99,6%	<i>Serratia marcescens</i> M9	97,1%

Identificación de microorganismos

Microorganismo	% de probabilidad	Características especiales
<i>S. marcescens</i>	99.99	Pigm rojo var

Resultados bioquímicos

GLU +	RAF -	INO +	URE +	LYS +	TDA -	CIT +	CL4 +	TAR -	OF/G +	NIT +
SUC -	RHA -	ADO -	H2S -	ARG -	ESC +	MAL -	CF8 +	ACE -	P4 +	FD64 +
SOR-	ARA -	MEL -	IND -	ORN +	VP-	ONPG +	TO4 +	CET-	K4 -	OXI -

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Serratia sp

Rizobacteria, promotora de crecimiento y agente biocontrol.



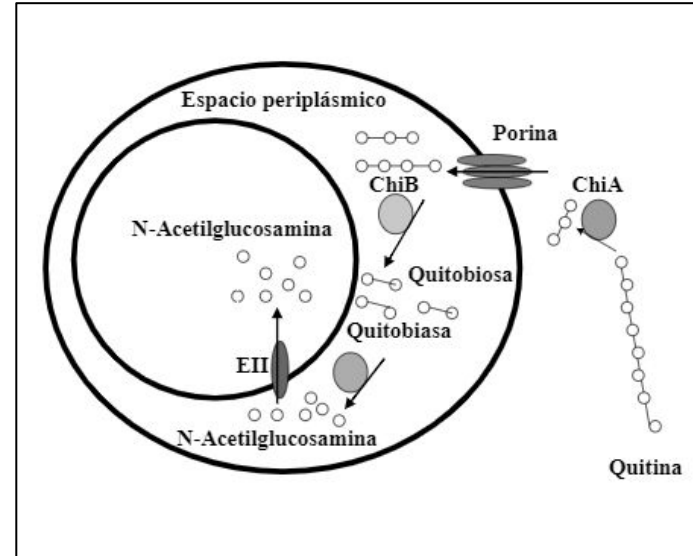
Prodigiosina

Sistema quitinolítico

Enzimas

Proteínas

Colletotrichum gloeosporioides reducción del 40% en crecimiento micelial y de 81,89% de germinación de conidias desde las primeras 6 horas de contacto. Gutiérrez et al.

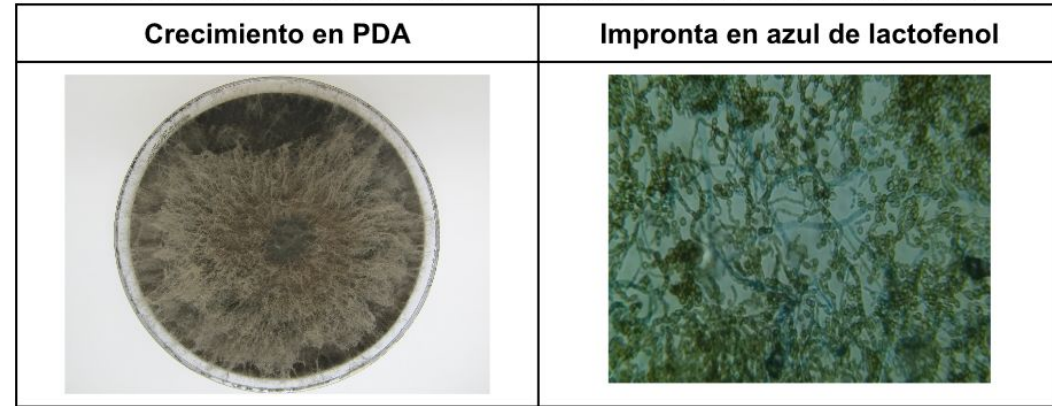


A, Ruiz-Sánchez & R, Cruz-Camarillo & Salcedo-Hernández, Ruben & Corona, José E.. (2003). *Serratia marcescens*: de patógeno oportunista al control de insectos que afectan cultivos agrícolas.. BioTecnología. 8. 31-37.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y MOLECULAR

Figura 20. Observación macroscópica y microscópica del hongo aislado



AISLAMIENTO	BLAST	% SIMILARIDAD
34	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> JX524168.1	98.11%
	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> BWH-TS1	98.11%
	<i>Neoscytalidium dimidiatum</i> HLN2	97.75%

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Neoscytalidium dimidiatum

Patógeno oportunista para el hombre y las plantas

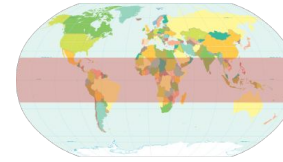
1. Arthroconidios sinamorfos picnidiales
2. Colonias hialinas y/o feoides

CHINA
MALASIA



LATINOAMÉRICA

- Venezuela
- Costa rica



- *África
- *Suramérica
- *Caribe
- *India
- *Asia

- Dermatomicosis
- Onicomicosis

Scytalidium dimidiatum



INMUNOSUPRESIÓN

MICOPARASITISMO

MELANINA

RESISTENCIA ANTIFÚNGICA

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



3 AISLAMIENTOS

- Dos bacterias del género *Serratia sp* (99.1%)
- Un hongo del género *N. dimidiatum* (97.9%)



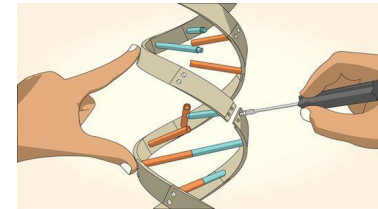
<https://www.mundohuerto.com/cultivos/cultivo-fresa/cuantas-da-una-planta>



<https://www.mundohuerto.com/cultivos/cultivo-fresa/cuantas-da-una-planta>

EXTRACCIÓN DE METABOLITOS

***EDICIÓN GENÉTICA**
***SILENCIAMIENTO DE GENES**



<https://www.mundohuerto.com/cultivos/cultivo-fresa/cuantas-da-una-planta>

CONCLUSIONES

- En las pruebas de tamizaje *in vitro* realizadas, **3 hongos** y **7 bacterias** demostraron una capacidad antagónica superior al 30%, lo que demuestra su potencial para inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno *Colletotrichum* spp. bajo condiciones de laboratorio. De los cuales, 2 hongos y 2 bacterias, presentaron los valores más significativos en los **ensayos en hojas**.
- Los microorganismos seleccionados para caracterizar molecularmente, fueron identificados como ***Serratia* sp** y ***Neoscytalidium dimidiatum***. Ambos, patógenos para el ser humano y para algunos cultivos, por lo que se concluye que su uso directamente **no representa** un mecanismo de biocontrol adecuado.
- Los resultados obtenidos permiten inferir que, la actividad antifúngica de los microorganismos evaluados puede ser una **alternativa biológica** para controlar la infección por *Colletotrichum* spp. en plantas de fresa. Para ello, es necesario complementar el estudio con la evaluación de las sustancias secretadas producidas y responsables de la actividad biológica para garantizar que no produzcan efectos tóxicos para el agricultor o los consumidores o la aplicación de otras tecnologías que vuelvan viables los resultados obtenidos de este proyecto.

RECOMENDACIONES

Realizar en el ensayo en plantas completas, de la misma edad y libres de agroquímicos.

Procesar las muestras de organismos marinos de forma rápida, para garantizar la recuperación de los microorganismos.

Implementar otros primers para poder tener mayor aproximación a las especies.



AGRADECIMIENTOS

- ❖ A nuestras familias y amigos por el apoyo incondicional durante nuestras carreras, por creer en nosotras y nuestras capacidades e impulsarnos a ser mejores cada día.
- ❖ Al grupo de investigación “Estudio y aprovechamiento de productos naturales marinos de Colombia” y al grupo de trabajo del “Instituto de Biotecnología” de la Universidad Nacional de Colombia.
- ❖ A Diana Marcela Vinchira Villarraga, al profesor Freddy Alejandro Ramos Rodríguez y Leonardo Castellanos Hernández.
- ❖ A nuestra asesora externa Adriana Rocío Romero Otero
- ❖ A la profesora Ligia Consuelo Sánchez Leal
- ❖ A la microbióloga María Eugenia Downs Burgos.
- ❖ A la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca docentes, estudiantes y administrativos por cada una de sus enseñanzas.

Referencias

Maldonado M, Stach J, Pathom W, Ward A, Goodfellow M. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*. [Internet]. 2005; (87) 11-18. [Cited 2018 oct 31]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10482-004-6525-0>

Tareq F, Lee H, Lee Y, Lee J, Shin H. Ieodoglucomide C and ieodoglycolipid, new glycolipids from a marine-derived bacterium *Bacillus licheniformis* 09IDYM23. *J Lipids*. [Internet]. 2015; 50 (1): 513-519. [Cited 2019 Abr 30]. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11745-015-4014-z>

Bhatnagar I, Kim S. Immense Essence of Excellence: Marine Microbial Bioactive Compounds. *Mar Drugs*. [Internet]. 2010; 8 (10): 2673-2701. [Cited 2019 Mar 16]. Available at: <https://www.mdpi.com/1660-3397/8/10/2673/htm>

Betancur L, Forero A, Romero A, Sepúlveda L, Castellanos L, Ramos F. Cyclic tetrapeptides from the marine strain *Streptomyces* sp. PNM-161a with activity against rice and yam phytopathogens. *J ANTIBIOT*. [Internet]. 2019. [Cited 2019 Abr 30]. Available at: doi: 10.1038/s41429-019-0201-0 <http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.13.1.22>

Chalearn Srimuang T, Izera S, Mazlan N, Suasaard, Dethoup T. Marine-Derived Fungi: A Promising Source of Halo Tolerant Biological Control Agents against Plant Pathogenic Fungi. *J Pure Appl Microbiol*. [Internet]. 2019; 13: 01. [Cited 2019 Mar 16]. Available at: <http://dx.doi.org/10.22207/JPAM.13.1.22>

Kjer J, Debbab A, Aly A, Procksh P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. *Nat Protoc*. [Internet]. 2010; 13: 01. [Cited 2019 Mar 04]. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.233>

Croll A, Copp B, Davis R, Keyzers R, Prinsep M. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep*. [Internet]. 2019; 36: 122-173. [Cited 2019 jun 20]. Available at: <https://doi.org/10.1039/C8NP00092A>

Gutiérrez M, Holguin F, Bello R, Guillén K, Dunn M, Huerta G. Production of prodigiosin and chitinases by tropical *Serratia marcescens* strains with potential to control plant pathogens. *World J Microbiol Biotechnol*. [Internet]. (2012) 28: 145-153; Available at: DOI 10.1007/s11274-011-0803-6