

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Caracterización de Bacterias Antagonistas en el Control de Hongos  
Fitopatogenos *in vitro*

Por:

**ALEJANDRO DE LA CRUZ ARMAS**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México.

Junio, 2014.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
DIVISIÓN DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Caracterización de Bacterias Antagonistas en el Control de Hongos  
Fitopatógenos *in vitro*

Por:

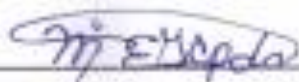
**ALEJANDRO DE LA CRUZ ARMAS**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada:



Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda  
Asesor Principal



M.C. Abel Sánchez Arizpe  
Coasesor



M.C. Catalina Chávez Betancourt  
Coasesor



Dr. Leobardo Bafuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México  
Junio, 2014.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A Dios**

Por darme la fuerza necesaria para no decaer en el esfuerzo por cumplir mis objetivos.

### **A MI ALMA MATER**

Por brindarme las herramientas necesarias para culminar mi carrera, que no hubiera sido posible realizar en cualquier otra escuela.

### **A la Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda**

Por todos los consejos y apoyo recibido de su parte, muy importantes en momentos oportunos. Una gran persona que presto parte de su valioso tiempo para escucharme y compartir su conocimiento.

### **Al M.C Abiel Sánchez Arizpe**

Por aceptar ser asesor en esta investigación, sugerencias y consejos como profesor, además también como persona.

### **A la M.C Catalina Chavez Betancourt**

Por todo el apoyo para hacer posible este proyecto. Por recibirme en la empresa como parte del equipo CEMAP, su ayuda y comprensión en el inicio de mi experiencia profesional.

### **A la empresa GREEN CORP. BIORGANIKS DE MEXICO**

Por brindar todo el material necesario e instalaciones para hacer posible esta investigación.

### **A mis compañeros de generación**

Por ser parte de alegrías, presiones y juegos: Yolanda, Israel, Malena, Norma, Ricardo, Jorge, Esaú, Cuper, Toño, Wily, Crisóstomo, Saúl, Félix, Huri, entre otros.

### **A mis compañeros y amigos de Green Corp.**

Por el apoyo brindado desde que llegue a esta empresa: Erika (Erish), Stefany (Fany), Elena (Hellen), además de los que tuvieron aportación directa en la investigación Diego (Chino) y Cristal (La Cris).

### **A mis amigos**

Por compartir su amistad y compañerismo en diferentes etapas de mi vida : Ricardo (gordo), Abraham (Pato), Iván Pérez, Diego (chino), Armando (Botello), Juan Carlos (Juancho), Obed, Fausto, Marciabath (Marci), Ismael, Osiel (güero), Bardomiano (bardo), Dante (Ganzo), Eutiquio (tikio), Alejandro (coruco), y a las doncellitas (Alejandra, Ana, Sol, Elizabeth, Jehieli).

# DEDICATORIA

## **A mis padres**

**Sr. Heliodoro De La Cruz Hernández**

**Sra. Bernarda Armas García**

Por su apoyo incondicional en mi formación personal y educativa, sus palabras de aliento siempre que las necesite. Inculcarme buenos valores que me llevaron a concluir mis estudios. Además del Sr. José María Huerta Rodríguez que ha sido como un padre mas para mí y quien siempre tuvo las palabras exactas para orientarme en decisiones importantes.

## **A mis hermanos**

Elmer, María y Ponciano que desde niños hemos compartidos momentos de mucha alegría. Gracias por ser parte y cómplices de tantas travesuras y brindarme su apoyo.

## **A mi abuelita Ambrocía**

Por ser como una madre para mí y cuidarme durante tanto tiempo. Gracias por ser un pilar muy importante en mi formación profesional, que si no hubiera sido por toda esa ayuda no lo hubiese logrado.

## **A mi esposa Yolanda Isabel**

Quien me ayudado para que este logro se hiciera posible como compañera, amiga y esposa. Una de las personas más maravillosas que he conocido y que me brindo la dicha de ser padre.

## **A mi hija**

Por ser un impulso y fuente de inspiración para seguirme superando. Regalarme una hermosa sonrisa cuando más lo necesito, y que desde la tuve en mis brazos por primera vez jure cuidar y proteger.

## **A mis maestros y a todo el personal del Departamento de Parasitología**

Por compartir su conocimiento y herramientas necesarias para concluir mi carrera de la mejor manera posible, un sincero agradecimiento.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
OBJETIVOS.....	3
HIPÓTESIS.....	3
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
CONTROL BIOLÓGICO.....	4
<i>Importancia</i> .....	4
<i>Agentes de control biológico</i> .....	5
<i>Aplicaciones</i> .....	6
<i>Mecanismos de acción</i> .....	6
Interacción directa con el patógeno.....	7
Antibiosis.....	7
Competencia .....	8
Inhibición.....	8
GENERALIDADES DE BACILLUS.....	8
<i>Antecedentes</i> .....	9
<i>Ubicación taxonómica</i> .....	9
<i>Importancia de Bacillus</i> .....	10
<i>Características</i> .....	11
<i>Ciclo de vida</i> .....	12
<i>Aislamientos del género de hábitats naturales</i> .....	12
<i>Compuestos metabolitos</i> .....	12
<i>Características del grupo subtilis</i> .....	14
<i>Biosíntesis de los antibióticos</i> .....	15
<i>Forma de Acción</i> .....	15
<i>Aplicaciones</i> .....	15
CARACTERIZACIÓN BACTERIANA.....	16
<i>Técnicas de efectividad antagónica</i> .....	17
IMPORTANCIA DE ENFERMEDADES FITOPATOGENAS.....	18
<i>Hongos fitopatogenos</i> .....	18
<i>Fusarium oxysporum</i> .....	20
<i>Rhizoctonia solani</i> .....	20
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	21
<i>Alternaria solani</i> .....	22
<i>Botryodiplodia theobromae</i> .....	22
<i>Cercospora musae</i> .....	23
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
DESCRIPCIÓN DE LAS ÁREAS DE TRABAJO.....	24
<i>Ubicación de experimento en laboratorio</i> .....	24
<i>Aislamiento</i> .....	24

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS.....	26
<i>Descripción macroscópica</i> .....	26
<i>Descripción microscópica</i> .....	26
<i>Pruebas bioquímicas</i> .....	26
PRUEBAS CUALITATIVAS DE ANTAGONISMO.....	27
<i>Material biológico</i> .....	27
<i>Reactivación de hongos</i> .....	27
<i>Prueba de antagonismo</i> .....	28
PRUEBAS CUANTITATIVAS .....	29
<i>Análisis estadístico</i> .....	30
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>31</b>
CARACTERIZACIÓN DE CEPAS .....	31
PRUEBAS CUALITATIVAS .....	35
PRUEBAS CUANTITATIVAS .....	37
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>43</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>44</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>51</b>

## RESUMEN

El uso del control biológico es una de las herramientas utilizadas en la agricultura orgánica para contrarrestar el daño por microorganismos causantes de enfermedades en plantas, por tal motivo se ha diversificado su medio de aplicación (Parasitoides, Hongos, Bacterias, Nematodos, etc.). Las bacterias antagonistas es una manera de disminuir el daño de fitopatógenos. Las del género *Bacillus* presentan diferentes cualidades de aportación a la agricultura moderna como promoción de crecimiento radicular y la inhibición de organismos causantes de desórdenes bióticos. En esta investigación se caracterizaron bacterias benéficas, aisladas de muestras de suelo de diferentes cultivos y partes del país, determinando su capacidad biocontroladora de hongos fitopatógenos. Como primera etapa se realizó la selección de las mejores cepas con una prueba cualitativa por la técnica de discos impregnados de 20 bacterias aisladas de inicio, sobre hongos de suelo y foliares como: *Alternaria solani*, *Botryodiplodia theobromae*, *Cercospora musae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium oxysporum*, de esta forma se seleccionaron a 11 bacterias con cualidades antagonistas. Como segunda etapa se caracterizaron mediante tinciones, aprovechamiento de nutrientes y vías de crecimiento específico. Con la prueba cuantitativa, se realizó el ensayo final ajustando soluciones de 5 bacterias seleccionadas (A.T2, A.PF, CS1, B1 S.L.P. y B2 S.L.P.) y una mezcla de estas (MIX) en  $1 \times 10^6$  UFC/ML y  $1 \times 10^8$  UFC/ML, posteriormente basándose en la técnica de medio envenenado se vertieron en medio nutritivo PDA en 3 dosis a razón de 1:100, 1:200 y 1:400, donde se inocularía con el explante del hongo de 7 días de crecimiento con 3 repeticiones respectivamente y la presencia del testigo absoluto. La toma de datos consistió en base al porcentaje de inhibición mostrado por las bacterias sobre los hongos. Los resultados obtenidos ubican a la mezcla (MIX) como la mejor con porcentajes de inhibición del 88% en la concentración  $1 \times 10^6$  UFC/ML, ya que en la concentración  $1 \times 10^8$  todas tuvieron similar actividad. La bacteria con menos capacidades antagonistas fue A.PF con una media en el porcentaje del 54 %. De esta forma se concluye que la mezcla de las bacterias benéficas es una buena opción cuando se decide realizar una formulación biológica, por las diferentes características ambientales de donde fueron aisladas lo que brindaría una mejor acción por su buena adaptación.

Palabras clave: control biológico, antagonistas, fitopatógenos, biocontrol.



# INTRODUCCIÓN

Los microorganismos antagonistas se han utilizado como agentes de biocontrol para diversas enfermedades fitopatógenas. Conociendo los efectos adversos que causan los agroquímicos, actualmente la tendencia en el área agroindustrial, se inclina cada vez más a la disminución tanto de costos en la producción como de la presencia de residuos de pesticidas en los productos agrícolas y en el medio ambiente, situando así al control biológico como una alternativa dentro del manejo de plagas.

Los métodos de control biológico son utilizados para proteger directamente a las plantas de los patógenos, a través de la acción de microorganismos antagonistas en el sitio de infección (Toledo, 2004). Con su aplicación se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico, mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos, para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales (Badii y Abreu, 2006).

Existen muchos microorganismos que ya han demostrado su potencial antagonista entre los cuales destacan las conocidas rizobacterias. Estas tienen la capacidad de sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana principalmente, además de la formación de endosporas las cuales se presentan como estructuras especializadas resistentes a los efectos letales del calor, sequedad, congelación, radiación y químicos tóxicos. Es por esto, que le brindan una mejor adaptación en condiciones adversas del medio ambiente (Foster, 2001).

A través de la producción de bacteriocinas o antibióticos, ciertos microorganismos afectan negativamente el desarrollo de fitopatógenos, limitando así la iniciación y propagación de la enfermedad. Uno de estos géneros antagonistas es *Bacillus*, dadas sus potencialidades en inhibición de

fitopatógenos de suelos y promoción de crecimiento de las plantas (Podile y Laxmi, 2001).

En base a las capacidades ya mencionadas de *Bacillus spp.* y el poco estudio que se tiene actualmente sobre la eficacia de estas bacterias en el biocontrol de enfermedades, se busco encontrar nuevas cepas que destacaran por presentar mejor capacidad de lo descrito en literatura para controlar hongos de importancia fitopatológica y formular una mezcla mejorada.

## **Objetivos**

Aislar, seleccionar y caracterizar bacterias con cualidades antagónicas presentes en muestras de suelo de diferentes cultivos agrícolas.

Determinar el efecto biocontrolador *in vitro* de forma individual y en conjunto de las mejores bacterias sobre hongos fitopatógenos.

## **Hipótesis**

Se caracterizaran al menos 5 cepas de bacterias benéficas con capacidad para inhibir de forma individual y en conjunto, el crecimiento y desarrollo de hongos fitopatógenos.

# REVISIÓN DE LITERATURA

## Control Biológico

### Importancia

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) ha considerado la importancia del empleo de agentes de biocontrol a través de un documento emitido en 2007: “la agricultura dependerá mucho del control biológico como componente mayor del manejo integrado de plagas. Los avances en técnicas moleculares y en el conocimiento científico en general serán la base del desarrollo de esta tecnología alternativa. Las investigaciones realizadas muestran que diferentes patógenos han servido como modelo para la aplicación de técnicas de biocontrol. La gama de cultivos a proteger es muy amplia: tales como leguminosas forrajeras de clima templado y gramíneas como trigo y cebada, cultivos hortícolas, frutales y forestales. Se ha propuesto una gran diversidad de agentes de biocontrol los cuales constituyen un recurso genético invaluable: bacterias rizosféricas, hongos entomopatógenos y levaduras, aislados de nuestros ecosistemas, que estarían asegurando un control efectivo y no agresivo para el ambiente”. Y, finalmente, agrega: “Para su aplicación comercial se requiere desarrollar estrategias de producción masiva de los microorganismos, normas de calidad para los bioplaguicidas, y marcos legales para registrar y regular el uso de organismos nativos” (FAO, 2007).

El control biológico es el uso de elementos de la naturaleza en la regulación de poblaciones de especies dañinas al hombre, como son las plagas y enfermedades de la agricultura, las malezas y los desperdicios. Los fundamentos de este tipo de control son aquellos que regulan los ciclos naturales de las poblaciones, las relaciones biológicas y abióticas entre especies, y las relaciones ecológicas, donde se trata de promover el restablecimiento del equilibrio natural de un ecosistema, roto por la intervención humana.

De tal forma que se define como el uso de organismos (o de sus metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos (Gerhardson, 2002).

El control biológico o el uso de microorganismos antagonistas como las bacterias, hongos y levaduras ha surgido como una alternativa viable para el control de enfermedades en diferentes etapas de cultivos establecidos (Sharma *et al.*, 2009).

En México son muy pocas las investigaciones que se han realizado sobre control biológico de fitopatógenos mediante microorganismos antagonistas. La mayoría de estas investigaciones han sido efectuadas en laboratorio o invernadero y muy pocos en campo. En la mayoría de los casos el modo de acción de los microorganismos con actividad de biocontrol ha sido la producción de metabolitos con actividad antibiótica, entre ellos, el género *Bacillus* es un promisorio candidato, ya que se caracteriza por sintetizar péptidos con actividad antibacteriana y antifúngica. Una de las alternativas es el uso de bacterias como agentes de control biológico dada la diversidad genética de *Bacillus*, tanto en el suelo como en la rizósfera, se les considera como colonizadores eficaces (Kim *et al.*, 1997). Uno de los usos de *B. subtilis* como agente de control biológico es mediante el tratamiento de semillas. Su efecto benéfico cuando se aplica junto a las semillas o en forma individual no se debe exclusivamente al antagonismo con los patógenos sino que influye positivamente en la germinación, desarrollo y rendimiento del cultivo debido a la producción de sustancias promotoras del crecimiento y al mejoramiento de la nutrición de las plantas.

### **Agentes de control biológico**

El control biológico de fitopatógenos se ha enfocado mediante antagonistas residentes o nativos y mediante la introducción de antagonistas (Andrew, 1992). Algunos ejemplos son: *Agrobacterium radiobacter*, *Phlebia gigantea*,

*Trichoderma sp.*, *Chondrostereum purpureum*, *Endothia parasitica*, *Pseudomonas fluorescens*, *Verticillium malthoseiu*, *Pythium oligandrum* (Zavaleta *et al.*, 1992).

Según Moffat en 2001 los agentes factibles para usarse en control biológico de patógenos en la rizósfera lo constituyen principalmente las rizobacterias y las micorrizas. Entre las rizobacterias que se han probado por sus efectos son: *Actinoplanes*, *Agrobacterium alcaligenes*, *Amorphosporangium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Xanthomonas*, etc. Algunos ejemplos exitosos del uso de microorganismos en la agricultura en los se han obtenido incrementos rentables son el trigo en Inglaterra, tanto en invernadero como en campo (Webster *et al.*, 1999; Van Lenteren, 2000).

## **Aplicaciones**

El control biológico de enfermedades microbianas de plantas normalmente implica el uso de microorganismos específicos, antagonistas del patógeno, limitando así la iniciación y propagación de la enfermedad (Brada *et al.*, 1995).

## **Mecanismos de acción**

Serrano *et al.* en 2003 identificaron varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrimentos, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia. No es fácil determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta. En general los antagonistas no tienen un solo modo de acción y la multiplicidad de estos es una característica importante para su selección como agentes de control biológico.

Si el antagonista posee varios modos de acción reduce los riesgos de desarrollo de resistencia en el patógeno. Este riesgo de resistencia también se

reduce mediante el uso de combinaciones de antagonistas con diferente modo de acción.

Según Sid *et al.* (2003), los mecanismos básicos de antagonismo asociados a bacterias pueden ser de los siguientes tipos:

- a) Parasitismo directo o predación
- b) Antibiosis
- c) Competencia
- d) Estimulo del hospedero
- e) Inhibición

### **Interacción directa con el patógeno**

Un tipo de interacción directa entre los antagonistas y los patógenos es el parasitismo (Lecuona, 1996). El parasitismo es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Este consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa, B1,3 – glucanasa y proteasa, que rompen las estructuras de los hongos parasitados.

### **Antibiosis**

Se considera como antagonismo medido por metabolitos específicos y no específicos de origen microbiano, por agentes líticos, enzimas, compuestos volátiles u otras sustancias toxicas; puede considerarse como la relación de una especie A que produce una sustancia enemiga a la especie B, sin que la especie A derive cualquier beneficio directo. La antibiosis es la inhibición o destrucción de un organismo por el producto metabólico de otro. La palabra antagonismo fue introducida a la microbiología por primera vez en 1874 por Roberts al demostrar una acción antagónica entre *Penicillium graucum* y una bacteria (De la Garza, 1996).

## **Competencia**

Esta constituye un mecanismo de acción antagónica muy importante. Puede definirse como el comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Un factor esencial para que exista competencia es la escasez o limitación de un elemento porque si hay exceso no hay competencia (Moffat, 2001).

## **Inhibición**

Es la reducción del crecimiento microbiano o causa de una disminución del número de organismos presentes, o de alteraciones en el entorno microbiano (Madigan *et al.*, 1998).

## **Generalidades de *Bacillus***

Las bacterias Gram positivas formadoras de endosporas se agrupan principalmente en el género *Bacillus* y otros géneros relacionados, recientemente separados taxonómicamente. Estos microorganismos se han estudiado desde hace muchos años con fines industriales y agrícolas (Nelson, 2004). Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en los más diversos hábitats que incluyen ecosistemas de agua dulce, marinos y en suelo, y sus especies están muchas veces asociadas a plantas. En este último caso, se han demostrado las potencialidades de las especies del género *Bacillus* para la producción de antibióticos, enzimas, la solubilización de fosfatos y la fijación biológica del nitrógeno (Chen *et al.*, 2006).

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por Cohn y comprende un grupo de especies filogenética y fenotípicamente heterogéneas. Incluye más de 100 especies y sus miembros se consideran ubicuos. En una etapa temprana de la clasificación de las especies de este género se tienen en cuenta dos características fundamentales: el crecimiento aerobio, la respuesta positiva a la

tinción de Gram, la forma bacilar y la formación de endospora. Esto hace que exista una gran cantidad de especies de este género ocupando una gran variedad de hábitats. Debido a esto, la heterogeneidad en la fisiología, ecología y la genética dificulta la clasificación del género o la generalización sobre este (Euzéby, 2006).

La actividad antagónica contra una amplia variedad de microorganismos fitopatógenos es una ventaja de las cepas de este género que debe aprovecharse en función de la obtención de bioproductos, así como la diversidad de mecanismos de acción de estas bacterias, en los cuales se debe profundizar aún más. La determinación de los mecanismos involucrados en la actividad antagónica y la realización de experimentos PGPB - Plantapatógeno contribuirían al uso de estos microorganismos en el control biológico de una amplia variedad de hongos fitopatógenos de cultivos de interés económico (Tejera *et al.*, 2011).

## Antecedentes

Las bacterias del género *Bacillus* fueron una de las primeras en ser descritas, y han jugado un rol principal en el desarrollo de la Microbiología. Este género fue descubierto en 1872 por Cohn, quien renombró la inadecuada descripción de Ehrenberg; de *Vibrio subtilis* a *Bacillus subtilis*.

## Ubicación taxonómica

Según Woese en 1978

Dominio	Bacteria
Phylum:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	<i>Bacillales</i>
Familia:	<i>Bacillaceae</i>
Género:	<i>Bacillus spp.</i>



## Importancia de *Bacillus*

La formación de endosporas les otorga una alta viabilidad comparada con células vegetativas, ya que son resistentes a la desecación y al calor, pudiéndose formular fácilmente en productos estables (Wulff *et al.*, 2002).

Las especies del género *Bacillus* pueden producir antibióticos, como la especie *Bacillus subtilis* que secreta el antibiótico llamado Bacitracina-A que ayuda a la quimioterapia contra la meningitis bacteriana. Otro como *Bacillus polymyxa* produce el antibiótico Polimixina-B, usado en la quimioterapia contra las infecciones producidas por bacterias del género *Pseudomonas*, al igual que *Bacillus brevis* que producen los antibióticos Tirocidina-A y Gramicidina-S que tiene efectos similares a las Polimixinas (Iañez, 2003).

Por lo tanto, la formación de la endospora está dada por las condiciones del medio en que se encuentran estas bacterias según Schlegel en 1997. Estas endosporas pueden sobrevivir independientemente de la célula madre y pueden ser aisladas desde una gran variedad de sustratos, dada su resistencia al aire seco, al largo periodo de sobrevivencia bajo condiciones adversas, y a sus características termorresistentes, ya que pueden llegar a soportar desde 80°C a 100°C de temperatura (Iañez, 2003).

La endospora de los *Bacillus* generalmente está formada por proteínas deshidratadas utilizando el ácido poli-β-hidroxibutírico en aerobios y polisacáridos en los anaerobios. Estas endosporas tienen un largo tiempo de duración, observándose que algunas han llegado a soportar de 200 a 400 años, hasta 1000 años, pero el grado de resistencia de la endospora depende ampliamente de las condiciones del entorno bajo las cuales fueron formadas (Rasche *et al.*, 2007).

## Características

Entre las características más importantes de las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* están: forma bacilar, movilidad flagelar por flagelos insertados en forma períttrica, pueden llegar a medir de 0,5-2,5 a 1,2-10  $\mu\text{m}$ , además son aerobias estrictas o facultativas, saprófitas, Gram positivas, catalasa positiva, quimiorganótrofas de metabolismo fermentativo o realizan una respiración aerobia (Holt *et. al.*, 2000). También cumplen importantes roles en los ciclos biogeoquímicos del carbono y nitrógeno. Una cualidad adicional por la cual son muy estudiadas estas bacterias, es que presentan una potencial capacidad para producir antibióticos, pudiendo servir como antifúngico, para proteger a plantas de enfermedades producidas por hongos (Castillo *et. al.*, 2004).

Las bacterias del género *Bacillus* se describen como termófilas (Foster, 2001), el término no sería aplicable para la separación de especies, en la octava edición del Manual de Bergey's, indica 6 especies de *Bacillus* que crecen hasta 55°C, por lo que considera que la gran mayoría de estas bacterias son termófilas. Por el contrario, otras especies crecen a temperatura ambiente, pero no a más de 65°C y ellas son descritas como termófilas facultativas. Posteriormente Rasche *et al.*, (2007) indicaron que las bacterias del género *Bacillus* son psicrófilas a termófilas, o sea, pueden crecer en un amplio rango de temperatura. Por otra parte, poseen además una alta habilidad fisiológica; soportando altas salinidades y distintos pH.

La propagación activa del microorganismo se produce en medios que presentan superficie húmeda. Las células en crecimiento no se propagan fácilmente en medios líquidos. Estos microorganismos por lo general crecen bien en agar sangre, produciendo colonias blanquecinas, grandes, extendidas e irregulares. Dentro de las especies más representativas de este género con propiedades de antagonismo celular contra fitopatógenos encontramos a *Bacillus brevis* y *Bacillus subtilis* (Raghavendra y Brian, 2005).

## **Ciclo de vida**

Su ciclo de vida se divide en dos fases: crecimiento vegetativo y esporulación. Durante el primer estado, la bacteria crece de forma exponencial cuando se encuentra en un medio donde las condiciones son favorables. Cuando los nutrientes comienzan a escasear, la bacteria esporula, formando una endospora, la cual puede permanecer viable en el ambiente por largos períodos para volver a su forma vegetativa. También se ha visto que existe una gran distribución de estas endosporas, estructura que les permite sobrevivir en condiciones extremas de temperatura desecación, pH entre otros (Backman, 1997).

## **Aislamientos del género de hábitats naturales**

La presencia de endosporas bacterianas constituye una estructura de resistencia que puede permanecer viable durante una gran cantidad de tiempo hasta que las condiciones se tornen favorables para el desarrollo de la forma vegetativa. Esto justifica la gran cantidad de especies de este género que se encuentran en una gran variedad de hábitats (Bergey`s, 1994). Estas bacterias se han aislado a partir de una amplia variedad de ambientes acuáticos y terrestres, como ecosistemas dulceacuícolas, aguas y sedimentos marinos, incluso en ambientes con condiciones extremas tales como polvo, sedimentos marinos y hasta lagos con elevadas concentraciones de cloruro de sodio, entre otros. También existen cepas muy virulentas en las especies *B. anthracis* y *B. cereus* que se han encontrado asociadas al ser humano y algunos animales (Hoton *et al.*, 2005).

## **Compuestos metabolitos**

La producción de compuestos antimicrobianos es muy común entre las bacterias y los hongos. Estos compuestos son sintetizados y excretados con el objetivo de eliminar la competencia que pueda existir en su hábitat natural. En muchos sistemas de control biológico, uno o más antibióticos desempeñan un papel importante en la supresión de enfermedades. Además, se han realizado

estudios moleculares que han sido efectivos para determinar esta capacidad presente en algunas bacterias, debido a la fácil obtención de mutantes defectivos en la producción de estos compuestos (Hu *et al.*, 2007).

El género *Bacillus* ha sido estudiado ampliamente respecto a la producción de antibióticos. En este sentido, se ha informado que especies como *Bacillus subtilis* producen antibióticos, dentro de los que se encuentra la fengicina, con elevado potencial de aplicación en la industria-biofarmacéutica y *Bacillus cereus* que tiene la capacidad de producir un antibiótico que no solo suprime el crecimiento de hongos fitopatógenos que afectan a cultivos de interés agrícola, sino que también potencializa la acción insecticida de las toxinas proteicas producidas por *B. thuringiensis* (Emert, 2004).

Muchas especies de *Bacillus* producen enzimas hidrolíticas policelulares que se encargan de degradar los compuestos que están disponibles en el suelo como son polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, lo que permite a estas bacterias usar dichos productos como fuente de carbono y donadores de electrones. Una de las enzimas más conocidas que secretan las especies de *Bacillus* es la amilasa, enzima encargada principalmente de degradar el almidón y convertirlo en dextrina. La principal bacteria que secreta esta enzima es *B. subtilis*, utilizado en gran cantidad para producir esta enzima y obtenerla más fácilmente (Schlegel, 1997).

De los péptidos antifúngicos producidos por *Bacillus* podemos citar a micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, surfactinas, micosubtilinas, fungistatinas y subporinas. Generalmente *Bacillus subtilis* es una especie que produce diferentes metabolitos secundarios en la forma de lipopéptidos con buena actividad antifúngica, antibacteriana y frente a algunas levaduras, como consecuencia son de alto valor biotecnológico y farmacéutico (Volpon *et al.*, 2000).

En base a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas, los lipopéptidos se han clasificado en tres grupos: surfactinas, liquenisinas e Iturinas. Las primeras se

caracterizan por ser poderosos biosurfactantes bacterianos (Yakimov *et al.*, 1995) mientras que, las iturinas se destacan por la eficacia contra una amplia variedad de patógenos clínicamente importantes, como levaduras y hongos (Bonmatin *et al.*, 2003).

Investigaciones posteriores han revelado actividades biológicas adicionales de estas moléculas, que las califican para su potencial uso en la agricultura e industria farmacéutica; se ha demostrado que las iturinas pueden ser compuestos muy activos contra la mayoría de los hongos fitopatógenos (Phae *et al.*, 1990) mientras que las surfactinas poseen una eficiente actividad antimicroplasma y antiviral y puede actuar como agente antitumoral e inhibir enzimas (Vollenbroich *et al.*, 1997). En la actualidad, los lipopéptidos son utilizados como biopesticidas para la protección de plantas, minimizando el uso de los fungicidas (Vater *et al.*, 2002; Touré *et al.*, 2004).

La aparición de resistencia contra péptidos antimicrobianos es menos probable que la resistencia a antibióticos convencionales (Oard *et al.*, 2004).

Se ha estudiado la liberación de compuestos con propiedades antifungicas como la subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas. Estas últimas son polipeptidos que actúan sobre la pared celular de los hongos (Harman, 1990).

### **Características del grupo *subtilis***

*Bacillus subtilis*, es la especie tipo del género, se la encuentra comúnmente en el suelo y se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva, catalasa positiva, producir una gran variedad de proteasas y otras enzimas que le permiten degradar una variedad de sustratos naturales contribuyendo al ciclo nutritivo. Respecto a las características de las colonias, estas se pueden observar redondeadas o irregulares, de superficie opaca, color crema o café. El cultivo activo es a pH 5,5-8,5. (Sneath, 2005).

*B. subtilis*, es un microorganismo ubicuo, no es considerado patógeno o toxigénico de los humano, animales, o plantas, por lo que el potencial riesgo asociado al uso de este, en instalaciones industriales es bajo. Es usado en la producción comercial ya que posee una reconocida actividad antimicrobiana, lo cual ha permitido emplearlo como un agente de control biológico. *B. subtilis* produce más de dos docenas de antibióticos, donde la clase predominante son los de naturaleza peptídica (Stein, 2005).

### **Biosíntesis de los antibióticos**

Respecto a la biosíntesis de antibióticos *B. subtilis* tiene genes especializados en esta función que corresponden al 4 -5 % del genoma de este. Se distinguen dos vías de biosíntesis:

- i) Síntesis ribosomal de péptidos, precursores lineales que están sujetos a la modificación post-traducciona l y procesamiento proteolítico.
- ii) Síntesis no ribosomal de péptidos, que está a cargo de un gran complejo multienzimático NRPSs (no ribosomal péptido sintetasa) (Stein, 2005).

### **Forma de Acción**

*B. subtilis* produce su efecto inhibitorio sobre los fitopatógenos mediante dos procesos: a) Ocupación de nicho, esta se da por la presencia de dicha bacteria en la superficie de la raíz metabolizando los exudados que pueden ser utilizados por los patógenos, b) Extensión del primer proceso, como *Bacillus* crece en la superficie de las raíces, esto puede producir sustancias químicas que inhiben el desarrollo de los fitopatógenos (Bonmatin *et al.*, 2003).

### **Aplicaciones**

Korsten y Janisiewicz (2002) evaluaron estas bacterias para el control de enfermedades fúngicas en aguacate, determinándose que las aplicaciones de

*Bacillus subtilis* pre y poscosecha tuvieron un efecto similar al de los fungicidas comerciales. Los mejores resultados fueron logrados con un tratamiento integrado que incluía aplicaciones de benomil y oxiclóruo de cobre y control biológico, siendo este el primer informe de control biológico pre-cosecha en aguacate.

Lazarete *et al.* (1994) utilizaron *B. subtilis* para controlar la pudrición radicular del frijol, la cual se evaluó comparando diferentes sustratos y se determinó que en condiciones de laboratorio el tratamiento con turba fue el más eficaz y en condiciones de campo la formulación a base de pectina fue la que logra mejor control.

Castellanos *et al.* (1995) evaluaron *B. subtilis* para el control de *Alternaria porri* en plantas de cebolla, alternando aplicaciones del producto biológico con las de los fungicidas zineb y oxiclóruo de cobre, determinándose que los tratamientos que consistían en la combinación de fungicidas sintéticos y biológicos mostraron mejor control que el resto de los tratamientos.

Torres *et al.* (2001) realizaron pruebas *in vitro* con *Pseudomonas sp.* y *B. subtilis* aislados de plátano y arroz, respectivamente. Estos microorganismos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo, tales como *Fusarium oxysporium, f. s. lycopersici, Pythium ultimum, R. solani, S. rolfsii, Phytophthora nicotianae, Fusarium moniliforme* y *Fusarium solani*.

## **Caracterización Bacteriana**

Cada tipo de bacteria vive en condiciones ambientales diferentes adaptada al medio lo mejor posible. No todos los géneros utilizan los mismos sustratos como fuentes de energía, carbono o nitrógeno. Esta diversidad es útil para clasificar las bacterias. Por otro lado existe también gran diversidad de rutas metabólicas de obtención de dicha energía. Cada bacteria contiene enzimas

propias y específicas de su especie. La presencia o ausencia de estas enzimas también tiene valor taxonómico (Castillo *et al.*, 2004).

### **Técnicas de efectividad antagónica**

- a) Goteo de los aislamientos. Se colocan 5 o 6 gotas alrededor del borde de una caja de Petri, la cual se deja en incubación durante dos días a 15 °C. Un disco del hongo evaluado, de una semana de crecimiento, se coloca en el centro de la caja y se mide el halo de inhibición.
- b) Depositar una gota del cultivo bacteriano en una caja de Petri a una distancia de 10 cm del micelio del hongo creciendo activamente en PDA. Se incuba por siete días y después se mide la zona de inhibición.
- c) Las cepas de *Bacillus* se cultivan en un frasco de 500 ml durante siete días en 100-200 ml de caldo de papa, el cual se agita constante; la solución debe mantenerse en la oscuridad. Después se agregan 6 g de agar, se pone en la autoclave a 121 ° C por 20 min y se procede a verter en cajas de Petri. Una vez que el medio se ha solidificado se colocan en las cajas de Petri discos de 0,7 cm de diámetro conteniendo el hongo a evaluar. La evaluación se basa en el porcentaje de inhibición del hongo.
- d) Las colonias de bacterias antagonistas se siembran utilizando una aguja para este propósito, dejando cuatro colonias por caja de Petri. Se incuban a 28 °C durante dos días. Estas se matan con vapores de cloroformo y se retira el crecimiento. Después se hace la siembra del hongo evaluado, preferiblemente ya esporulado, utilizando una aguja para este propósito (Kim *et al.*, 1997).



## **Importancia de Enfermedades Fitopatogenas**

Son aquellas causadas por bacterias, hongos, virus y nematodos fitopatogenos. Para que una enfermedad se desarrolle debe haber un huésped susceptible, un patógeno virulento, y un ambiente apropiado para el desarrollo de la enfermedad (Jones *et al.*, 1993).

Los patógenos que causan elevadas pérdidas de frutas y hortalizas son normalmente las bacterias y los hongos, sin embargo, con mayor frecuencia son especies de hongos las causantes del deterioro patológico de frutas, tallos, hojas y productos subterráneos (raíces, tubérculos, cormos, etc.). Algunas fuentes estiman que dichas pérdidas son del orden de 5-25% desarrollados y 20-50% en países en desarrollo (FHIA, 2007).

### **Hongos fitopatogenos**

A nivel mundial los hongos fitopatógenos originan pérdidas que ascienden a miles de millones de dólares al año (National Academy of Sciences 1980). El daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos. En cuanto a las pérdidas económicas, éstas pueden ser de tipo cuantitativo y/o cualitativo (sabor, textura, color y forma) (Ashworth *et al.*, 1981). De los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas, como pueden ser los virus, hongos, bacterias, nemátodos, fitoplasmas, y viroides, son los hongos el grupo que más enfermedades ocasiona y por lo tanto sobre el que más investigación se ha realizado. Se sabe que más de 8,000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas. Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por

más de una especie de hongo fitopatógeno, y una especie de hongo fitopatógeno puede atacar a más de una especie de planta (Agrios, 2005).

En la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades de pre y poscosecha en los cultivos de hortalizas, cereales, frutales siendo estos responsables de pérdidas económicas cuantiosas; el daño que ocasionan no solo se refiere a las mermas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (Agrios, 2005).

Una amplia gama de hongos han sido caracterizados como causantes del deterioro patológico en una variedad de productos. Estos hongos pueden estar afectando la parte aérea de la planta como lo son: *Alternaria*, *Cercospora*, *Mycosphaerella*, *Colletotrichum*, *Puccinia*, *Tilletia*, entre otros. Y también la parte subterránea entre los principales géneros están: *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Sclerotinia*, *Pythium*, *Verticillium*, entre otros (FHIA, 2007).

En México son muy pocas las investigaciones que se han realizado sobre control biológico de fitopatógenos mediante microorganismos antagonistas. La mayoría de estas investigaciones han sido efectuadas en laboratorio o invernadero y muy pocos en campo. En la mayoría de los casos el modo de acción de los microorganismos con actividad de biocontrol ha sido la producción de metabolitos con actividad antibiótica, entre ellos, el género *Bacillus* es un promisorio candidato, ya que se caracteriza por sintetizar péptidos con actividad antibacteriana y antifúngica. Una de las alternativas es el uso de bacterias como agentes de control biológico dada la diversidad genética que presenta *Bacillus*, tanto en el suelo como en la rizósfera, se les considera como colonizadores eficaces (Kim *et al.*, 1997).

## *Fusarium oxysporum* según Alexopoulos 1979

### Taxonomía

Phylum	Ascomycota
Subphylum	Pezizomycotina
Clase	Sordariomycetes
Orden	Hypocreales
Familia	Nectriaceae
Genero	<i>Fusarium</i>

### Importancia

Este hongo se caracteriza por producir distintas formas especiales, las cuales no se pueden diferenciar por su morfología o por las características culturales de las colonias, pero son fisiológicamente diferentes por su capacidad de parasitar y ocasionar enfermedades en plantas hospedantes específicas.

La especie *Fusarium oxysporum* tiene la capacidad de atacar un gran número de plantas de importancia agrícola y ocasiona principalmente marchitamientos vasculares, seguidos de la muerte de la planta. En hortalizas se registra atacando entre otras plantas al tomate (f.sp. *lycopercisi*), cebolla (f.sp. *cepae*), repollo (f.sp. *conglutinans*), y remolacha (f.sp. *betae*). En frutales se ha registrado en banano (f.sp. *cubense*), cítricos (f.sp. *citri*), y guayaba (f.sp. *psidii*). En leguminosas de grano en fríjol (f.sp. *phaseoli*), soya (f.sp. *glycines*), lenteja (f.sp. *lentis*) y garbanzo (f.sp. *ciceris*), entre otros (Arbeláez, 2000).

## *Rhizoctonia solani* según Alexopoulos y Mims 1996

### Taxonomía

Reino	Fungi
División	Amastigomycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Deuteromycetes
Subclase	Hyphomycetide
Orden	Aganomycetales
Genero	<i>Rhizoctonia</i>

## Importancia

Como típico hongo del suelo sobrevive de distintas formas: como saprofito sobre restos orgánicos, como parásito en las raíces y otros órganos de plantas y, en forma pasiva, como esclerocios. El hongo puede infectar en muy distintas condiciones de temperatura y humedad, pero como patógeno relativamente débil ataca principalmente en tejido estresado y debilitado del hospedante. El ataque en los frutos se produce en condiciones húmedas y calurosas. Ocurre en frutos que tocan el suelo y que son invadidos en forma directa o en frutos más o menos distantes del suelo donde el inóculo llega por el salpicado de la lluvia o riego por aspersión.

Hospedantes: Alfalfa, Kiwi, Cacahuate, Papa, Pimiento, Soya, Sorgo, Tabaco, Tomate, entre otros (Belmonte *et al.*, 2006).

*Sclerotinia sclerotiorum* según Alexopoulos 1979

## Taxonomía

Reino	Fungi
Phylum	Ascomycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Deuteromycetes
Subclase	Leotiomycetidae
Orden	Helotiales
Familia	Sclerotiniaceae
Genero	<i>Sclerotinia</i>

## Importancia

El marchitamiento y secado de las hojas es el primer síntoma de esta enfermedad. En los tallos, los sitios de infección originales son los nudos de la parte media de los tallos, en donde se observan manchas oscuras, blandas, que se recubren de micelio blanco algodonoso. Posteriormente se forman sobre las lesiones esclerocios negros, que son la forma de resistencia del hongo. Cuando las plantas llegan al estado R7, los tejidos epidérmicos afectados se desintegran y el ataque llega a la médula. El micelio algodonoso crece en todas las partes de la planta infectada, lo que es un signo

característico del patógeno. Los esclerocios se forman en la parte exterior de los tallos sobre el micelio y dentro de la médula, tomando forma alargada. Hospederos: Durazno, Girasol, Maní, Soja, Tabaco, Tomate, Zanahoria (Escande *et al.*, 2002).

*Alternaria solani* según Alexopoulos 1979

Taxonomía

Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Hyphomycetes
Genero	<i>Alternaria</i>

Importancia

En plantas jóvenes causa podredumbre de cuello que mata al huésped. En plantas adultas se producen lesiones circulares con anillos concéntricos marcados y de superficie arrugada, en hojas y tallo. Llegan a provocar la muerte de la hoja. No suele afectar al fruto, pero en ocasiones lo llega a pudrir, entrando por la cicatriz del cáliz. También produce podredumbres en el tubérculo de la patata. Hospederos: papa y tomate (Mantecón, 2002).

*Botryodiplodia theobromae* según Alexopoulos 1979

Taxonomía

Reino	Hongos
Phylum	Ascomycota
Clase	Deuteromycetes
Orden	Botryosphaeriales
Familia	Botryosphaeriaceae
Genero	Botryodiplodia

Importancia

Las hojas de las plantas enfermas por esta causa presentan zonas de coloraciones pardo rojizas, enrollamientos y su estado final es totalmente seco y de textura quebradiza. En la palmera canaria se suele manifestar en las hojas

basales. Sobre el raquis aparecen manchas elípticas, de color pardo que corresponden a zonas necrosadas, más grandes a nivel de la inserción de los foliolos. Sobre éstos se observan igualmente manchas, tanto en las partes apicales como a lo largo de los nervios. A veces se observan zonas necróticas sobre el nervio central del foliolo, que hacen que éste se abra y acabe escindido en dos mitades. Finalmente provoca la muerte de las hojas afectadas, por destruir el tejido fotosintético de los foliolos y el tejido parenquimático y vascular del raquis foliar. Huéspedes: Rosa, aguacate, papaya, cítricos (Pérez-Piqueres *et al.*, 2000).

### *Cercospora musae* según Alexopoulos 1979

#### Taxonomía

Reino	Hongos
Phylum	Ascomycota
Clase	Deuteromycetes
Orden	Capnodiales
Familia	Mycosphaerellaceae
Genero	<i>Cercospora</i>

#### Importancia

*Cercospora musae* es el teleomorfo de *Mycosphaerella fijiensis* un hongo patógeno de plantas, agente causal de la enfermedad Sigatoka amarilla la mancha de la hoja sobre plantas de plátano. Carece de las paredes celulares engrosadas que están presentes en la base de las conidias de *Paracercospora fijien*, el anamorfo de *M. fijiensis* , y son más cortas y menos ondulado. Los conidióforos de *C. musae* son en forma de botella y mucho más pequeño que los conidióforos alargados de *P. fijiensis* , que a menudo son dobladas y con cicatrices visibles conidios (Fullerton, 1994).

# MATERIALES Y MÉTODOS

## Descripción de las Áreas de Trabajo

### Ubicación de experimento en laboratorio

La presente investigación se llevo a cabo en los laboratorios del Centro de Microbiología Aplicada (CEMAP) de la empresa GreenCorp Biorganiks de México S.A de C.V. con sus instalaciones en la ciudad de Saltillo, Coahuila.

### Aislamiento

El aislamiento de las bacterias benéficas se realizó a partir de muestras de suelo de distintos cultivos agrícolas y de diferentes partes del país.

Para el procesado de las muestras se pesaron 10 gr de suelo, después se vertieron en un matraz con 90 ml de agua destilada estéril, agitándose vigorosamente en vortex. De la solución obtenida, se extrajo una alícuota de 1 ml y posteriormente se realizaron diluciones seriadas en tubos contenidos de 9 ml de agua destilada estéril hasta llegar a la dilución  $10^{-5}$ , de las cuales se inocularon las tres últimas por separado en medio nutritivo B de King (KB) y Papa Dextrosa Agar (PDA) con una cantidad de 0,1 ml y se incubaron por un tiempo de 24 a 48 hrs a una temperatura de  $28 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

Las bacterias responsables de halos de inhibición para los demás microorganismos presentes se aislaron, purificándose en medio nutritivo B de King (KB) y Papa Dextrosa Agar (PDA), posteriormente se inocularon en 100 ml de caldo nutritivo, el cual se incubo en Shaker por un tiempo de 24 hrs a revoluciones constantes de 130 rpm y una temperatura de  $28^{\circ}\text{C} \pm 1$  hasta la formación de biomasa (Wichitra *et al.*, 2007), con la finalidad de obtener una concentración conocida de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) a las cuales hubo la necesidad de ajustarlas a  $1 \times 10^7$  UFC/ml.

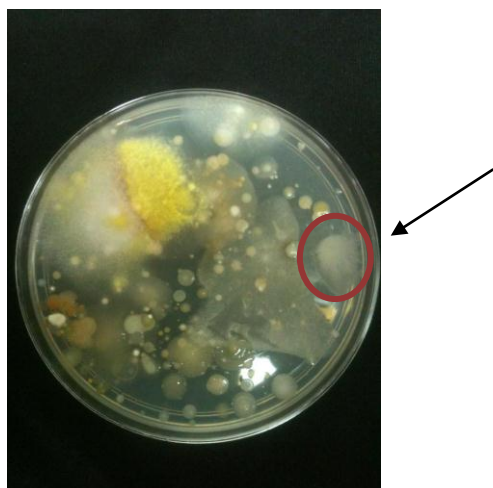


Figura 1. Colonia bacteriana causante de inhibición en hongo de suelo

A cada una de las cepas aisladas se les asigno una clave con la finalidad de facilitar su reconocimiento dentro de los ensayos, además de su clave final asignada como propiedad del banco de microorganismos pertenecientes al CEMAP. A continuación se presentan los datos distintivos para cada una de las cepas que originalmente mostraron actividad antagonista.

Cuadro 1. Datos de aislamiento de cepas de microorganismos antagonistas

<b>ANTAGONISTAS</b>	<b>CULTIVO</b>	<b>ESTADO</b>
BsG/B1-C	Cebolla	Guanajuato
BsG/B2-C	Cebolla	Guanajuato
<b>BsG/B2-S.L.P.</b>	<b>Chile poblano</b>	<b>San Luis Potosí</b>
BaG/B3-C	Cebolla	Guanajuato
BsG/B4-C	Cebolla	Guanajuato
<b>BsG/B1-S.L.P.</b>	<b>Chile poblano</b>	<b>San Luis Potosí</b>
BspG/AC1 (B1)	Alfalfa	Coahuila
BspG/AC2 (B2)	Alfalfa	Coahuila
BspG/AC3 (B3)	Alfalfa	Coahuila
BspG/TT1 (B4)	Tomate	Tamaulipas
BspG/CS2 (1)	Papa	Coahuila
<b>BspG/CS1 (2)</b>	<b>Tomate</b>	<b>Tamaulipas</b>
BspG/TT2 (3)	Tomate	Tamaulipas
BspG/TT3 (4)	Tomate	Tamaulipas
BspG/CS2 (5)	Caña de azúcar	San Luis Potosí
BspG/CS3 (6)	Papa	Coahuila
<b>BspG/A.T2</b>	<b>Caña</b>	<b>San Luis Potosí</b>
BspG/CT1 (7)	Chile	Tamaulipas
BspG/CT2 (8)	Chile	Tamaulipas
<b>BspG/A. PF</b>	<b>Caña</b>	<b>San Luis Potosí</b>



## Caracterización de Bacterias

La identificación de las cepas se realizó a partir de colonias aisladas, obtenidas de siembras en estrías en placas de papa dextrosa agar (PDA).

### Descripción macroscópica

Se describió la morfología de la colonia, tamaño, color, borde acompañada de registros fotográficos.

### Descripción microscópica

Se aplicó la coloración de Gram y coloración para endosporas bacterianas (Shaeffer-Foultun), para determinar tipo de pared y la morfología de las células bacterianas, así como el tipo de agregación, mediante observación microscópica a 100x.

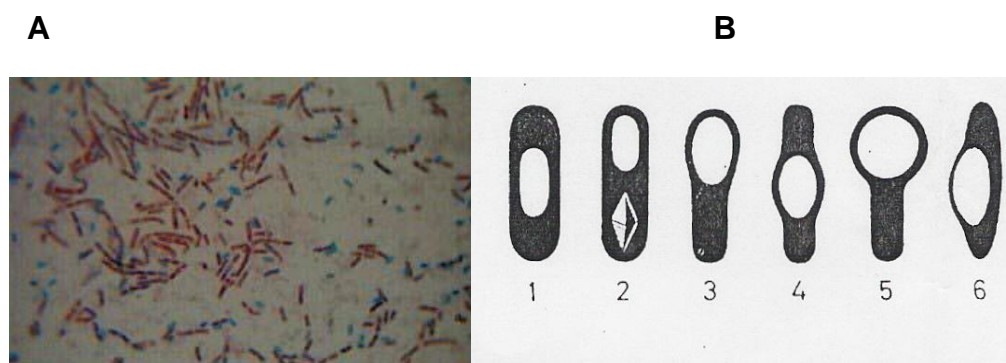


Figura 2: A: muestra de *Bacillus* con tinción de Wirtz a un aumento de 100X. B: tipos de esporas presentes al interior del cuerpo de la bacteria del género *Bacillus*, (1. espora central; 2. espora Terminal; 3. espora terminal con hinchazón de la célula madre; 4. espora central con hinchazón de célula madre; 5. espora terminal redonda, con hinchazón de la célula madre y 6. espora lateral). Extraído de Schlegel, 1997.

### Pruebas bioquímicas

La caracterización se realizó mediante las claves extraídas de los manuales de Bergey's (2000), y de la tesis de licenciatura de Márquez (2007) en base al

perfil bioquímico mencionado, tales como: catalasa (liberación de oxígeno), oxidasa (fuente de energía de citocromo), prueba de reducción de nitratos (anaerobiosis), prueba de Voges Proskauer (fermentación formica Aerógenes), prueba del Citrato (citrato fuente de energía y carbono), utilización de almidon (degradación de almidon), etc.



Figura 3. Pruebas bioquímicas.

## Pruebas Cualitativas de Antagonismo

### Material biológico

En esta investigación fueron requeridos los hongos fitopatogenos de mayor importancia agrícola pertenecientes al CEMAP. Los hongos necesarios para el ensayo fueron: *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Cercospora musae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani* y *Botryodiplodia theobromae*.

### Reactivación de hongos

Para las pruebas de antagonismo fue necesaria la reactivación de los hongos fitopatogenos, proporcionados del banco de microorganismos pertenecientes al Centro de Microbiología Aplicada conservados en Papa Dextrosa Agar, del cual

fue tomado un explante de 0.5 cm e inoculado en el mismo medio (PDA) durante 7 días a una temperatura de 28 °C.

### Prueba de antagonismo

En cajas con PDA se colocaron de cuatro a cinco discos de 5 mm de papel filtro impregnados con las bacterias antagonistas a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/ML por separado a una distancia de 2 cm del centro de la caja, colocados cada uno en posición de los puntos cardinales con 3 repeticiones cada una. Posteriormente se incubaron a 28 °C durante siete días (Yu *et al.*, 2002).

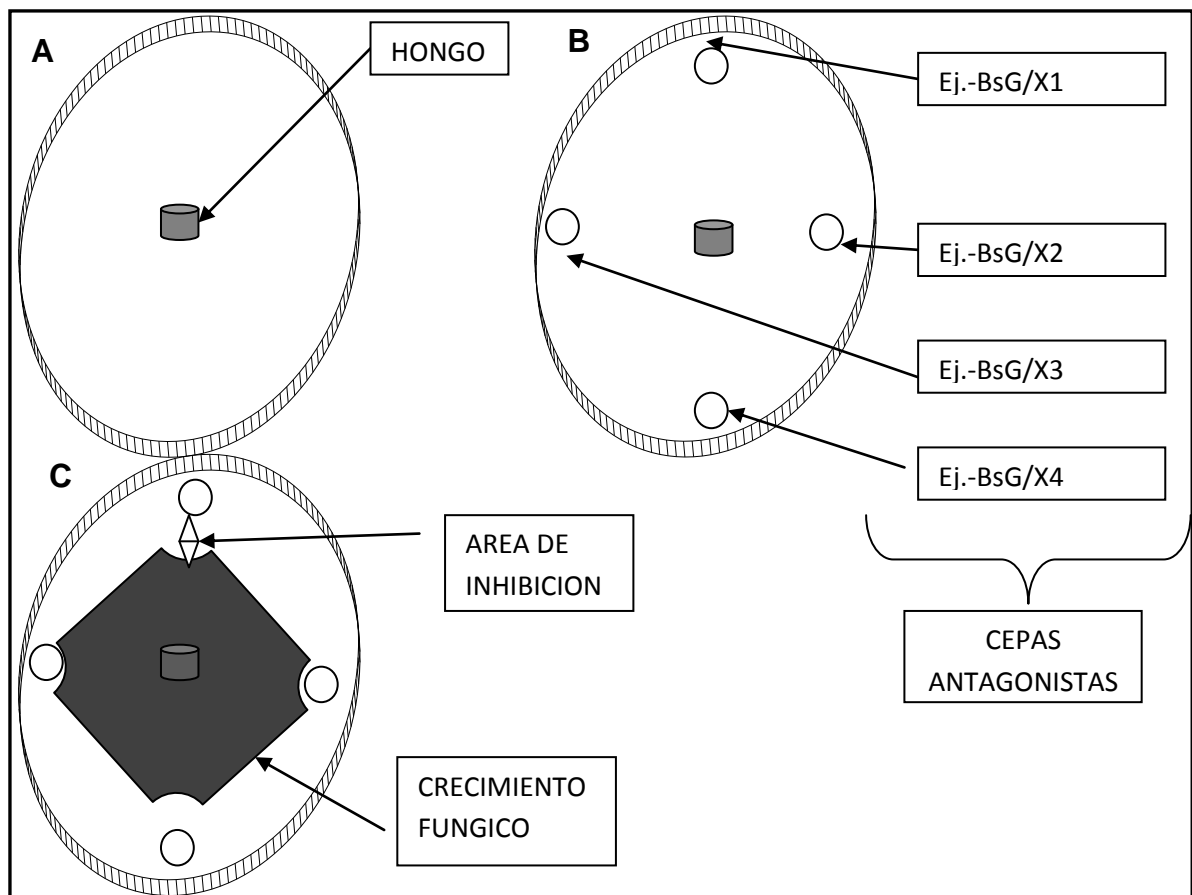


Figura 4. Diagramas del ensayo de antagonismo *in vitro* a hongos fitopatógenos. A) Explante del hongo, B) Bacterias benéficas y C) Área de inhibición.

Para la comprobación de esta prueba y la efectividad de los *Bacillus* fue necesario utilizar la presencia de un testigo absoluto, el cual consistió en crecer

el hongo en PDA sin la presencia de bacterias y bajo las mismas condiciones. Se observó el diámetro del halo de inhibición del hongo a causa de la bacteria, determinando por apariencia la efectividad de cada una de ellas, y seleccionándolas por su actividad contra cada uno de los hongos.

## Pruebas Cuantitativas

Esta prueba se realizó a partir de los resultados obtenidos de las pruebas cualitativas únicamente con las bacterias que presentaron mejores cualidades.

Para la finalidad de este ensayo se ajustaron soluciones con cada bacteria a una concentración de  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^8$  UFC/ML con la fórmula  $C1 \cdot V1 = C2 \cdot V2$  (C=Concentración y V=Volumen). Posteriormente, basándose en la técnica de medio envenenado en PDA descrito por Femenia en 2007, se diluyó cada bacteria y concentración por separado en el medio nutritivo en líquido a 3 dosis a razón de 1:100, 1:200 y 1:400. Después de haber solidificado el medio en placas petri, se realizó la inoculación con los hongos de 7 días de crecimiento, y se incubaron a una temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$  por 5 días (Sadfi *et al.* 2002; Kavitha *et al.* 2005). Cada tratamiento se realizó con 4 repeticiones y un testigo absoluto, que consistió en crecer cada hongo sin la presencia de bacterias y bajo las mismas condiciones.

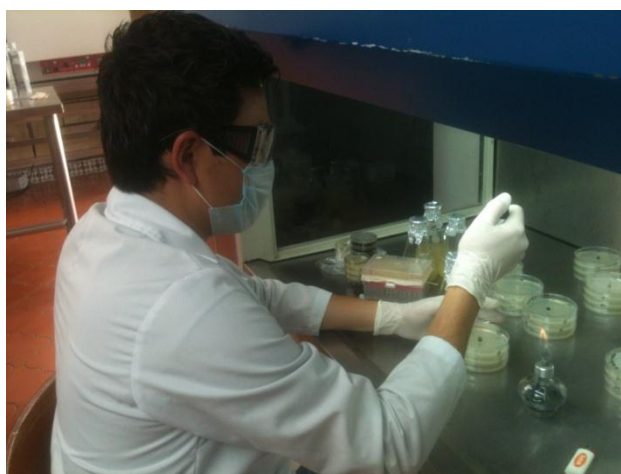


Figura 5. Inoculación de bacterias.

## **Análisis estadístico**

La variable a evaluar fue:

El porcentaje de inhibición para los hongos (% Inh) en base al crecimiento micelial de cada tratamiento (C.Trat) y considerando el crecimiento del hongo testigo (C. Tes) como 100%

Utilizando la siguiente fórmula:  $\% \text{ Inh.} = \frac{C.Tes - C.Trat}{C.Tes} * 100.$

Para la comparación de datos del potencial de las cepas como agentes de biocontrol se establecieron diferencias entre tratamientos mediante el análisis de Varianza (ANOVA) y una prueba de comparaciones múltiples Tukey, con el paquete estadístico "R" (R Project, versión 3.0.2.). El nivel de confiabilidad utilizado para todos los casos fue de 95%.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la investigación muestran al género *Bacillus* como predominante entre bacterias antagonistas en suelo agrícolas, la diversidad de ambientes de donde fueron aislados ayuda en la adaptación de estos organismos cuando son aplicados como formulación biológica.

### Caracterización de Cepas

De las muestras procesadas se seleccionaron 20 cepas bacterianas con características antagónicas.

A las colonias obtenidas de la resiembra en PDA se les realizó pruebas rápidas de identificación. Tal como lo describe Holt *et. al.* (2000) se clasificaron las bacterias por su forma bacilar, tinción de gram, tinción de esporas, catalasa y oxidasa, obteniendo parámetros cualitativos para posteriormente desarrollar la taxonomía de éstas. Descartando de esta forma a 11 bacterias por no presentar las características deseadas tales como: colonias opacas, de bordes redondeados e irregulares, centro transparente y de aspecto "seco", positivo a la prueba de oxidasa. Al microscopio la presencia de bacilos largos, agrupados de forma irregular, positivos a la tinción de Gram, presencia de endosporas después de la exposición al calor. Fue un total de 9 bacterias que pasaron estas pruebas, y que fueron consideradas para realizar el ensayo cualitativo contra los hongos, realizándoles a la par pruebas bioquímicas específicas para su identificación.

Cuadro 2. Descripción morfológica de bacterias

Cepa	Forma	Borde	Elevación	Superficie	Color	Consistencia	Tamaño
A.T2	Irregular	Aserrado	Plana	Opaca	Crema	Seca	0.2-0.3
A.PF	Irregular	Aserrado	Plana	Opaca	Crema	Seca	0.2-0.4
B1. SLP	Irregular	Aserrado	Plana	Opaca	Crema	Seca	0.2-0.3
B2. SLP	Irregular	Aserrado	Plana	Opaca	Crema	Seca	0.2-0.3
CS3 (6)	Irregular	Ondulado	Plana	Opaca	Crema	Seca	0.2-0.3
CS1	Irregular	Aserrado	Plana	Opaca	Crema	Seca	0.2-0.3
CS2	Irregular	Ondulado	Acuminado	Opaca	Crema	Seca	0.2-0.3
TT2	Irregular	Digitiforme	Acuminado	Rugosa	Crema	Ligosa	0.1-0.2
TT3	Irregular	Ondulado	Plana	Opaca	Crema	Seca	0.2-0.4

La morfología mostrada por las bacterias aisladas corresponde en mayoría al género *Bacillus* como se describen en el cuadro 2. Estas características se compararon con lo descrito en literatura y de lo cual fue parte fundamental en la identificación.



Figura 6. Crecimiento en medio de papa dextrosa agar (PDA), incubada a 28°C durante 24h.

El crecimiento de bordes irregulares es una de las características del género *Bacillus* como se muestra en la figura 6. Este es un factor que se tomo en cuenta para la identificación.

Cuadro 3. Características y pruebas bioquímicas para las distintas cepas

Prueba/ moss	Cepas de importancia								
	BspG/ Cs3 (6)	BspG/ A.PF	BspG/ A.T2	BspG/ B1SL P	BspG/ B2SLP	BspG/ CS1	BspG/ AC3 B3	BspG/ TT2	BspG/ TT3
Forma/ tamaño	Bacilo largo	Bacilo largo	Bacilo medio	Bacilo largo	Bacilo largo	Bacilo largo	Bacilo corto	Bacilo largo	Bacilo largo
Gram	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acido (KIA)	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A	K/A
Motilidad	+	-	+	-	-	+	+	+	-
Catalasa	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactosa	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Sacarosa	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina Dx	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Lisina Dm	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	-	-	+	+	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ornitina	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Prosk	-	+	+	+	/	+	+	+	-
Rojo de metilo	-	-	-	-	-	-	-	-	-
O/F	-	+	+	+	+	+	-	-	+
Anaerobiosis	+	-	-	-	-	-	-	+	-
NaCl 7%	+	+	+	+	+	+	+	+	-
50 °C	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Tinción de Esporas	Central	Subter- minal	Subter- minal	Central	Central	Lateral	Lateral	Central	Central

Los resultados observados de las pruebas de identificación detallados en el cuadro 3, fueron de la siguiente forma para la mayoría de las bacterias: tinción de Gram positiva, con endospora central, crecimiento aeróbico, catalasa positiva, presentando hidrólisis del almidón y reduciendo los nitratos, no producen indol, forman escasa cantidad de ácido sulfúrico, presentaron crecimiento en NaCl al 7%, tienen reacción positiva Voges Proskauer, son manitol negativo y utilizan el citrato.



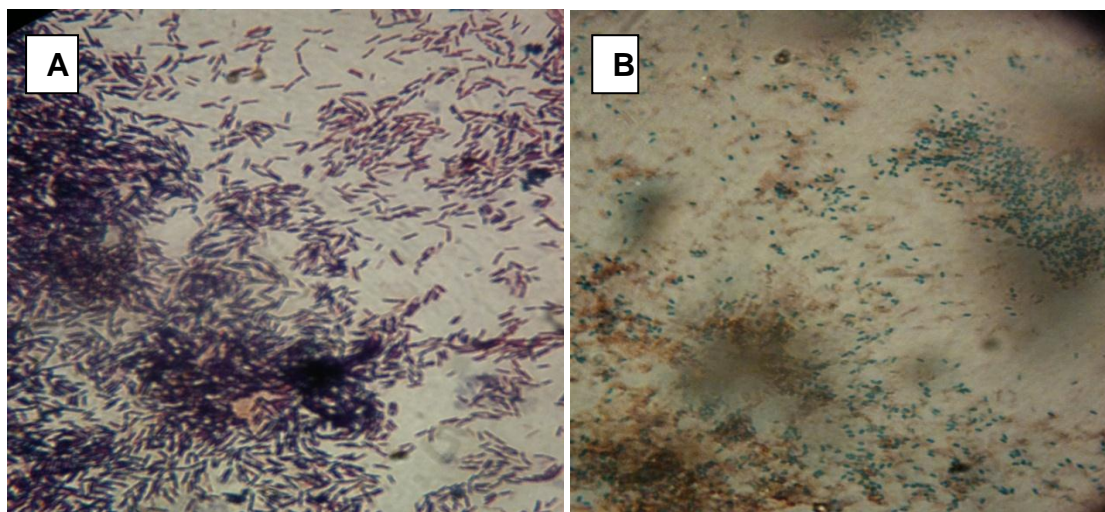


Figura 7. A. Bacilos al microscopio óptico. B. Tinción de esporas

Después de realizar las pruebas bioquímicas relevantes y disponibles en el laboratorio, permitieron ubicar taxonómicamente las cepas como correspondiente a la familia Bacillaceae, género *Bacillus*.

A continuación se presentan los datos resultantes de la caracterización de cada una de las cepas.

Cuadro 4. Identificación de cepas antagonistas aisladas

<b>ANTAGONISTA</b>	<b>BACTERIA</b>	<b>CULTIVO</b>	<b>ESTADO</b>
BsG/ (B1-SLP)	<i>Bacillus subtilis</i>	Chile poblano	San Luis Potosí
BsG/ (B2-SLP)	<i>Bacillus subtilis</i>	Chile poblano	San Luis Potosí
BspG/CS3	<i>Bacillus subtilis</i>	Alfalfa	Coahuila
BspG/AC3 (B3)	<i>Brevibacillus sp.</i>	Alfalfa	Coahuila
BspG/CS1 (2)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Tomate	Tamaulipas
BspG/TT2 (3)	<i>Bacillus spp.</i>	Tomate	Tamaulipas
BspG/TT3 (4)	<i>Bacillus spp.</i>	Tomate	Tamaulipas
BspG/A. T2 (5)	<i>Bacillus cereus</i>	Caña de azúcar	San Luis Potosí
BspG/A. PF (6)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Caña de azúcar	San Luis Potosí

Los resultados obtenidos de las pruebas de identificación ubican al género *Bacillus* como predominante en las bacterias aisladas. Las especies aisladas del presente estudio demuestra que estas bacterias son fácilmente recolectadas en muestras de suelo, obteniendo un buen número de ellas, tal como lo indica Castillo *et. al.* (2004) las bacterias pertenecientes a este género están ampliamente distribuidas en la naturaleza y son fácilmente aisladas desde suelo y restos de materia orgánica.

Tal como lo describe Romero-Tabarez (2006), *Bacillus subtilis* es una de las especies de este género comúnmente presentada en los suelos como lo fue en estas muestras analizadas. Esta bacteria ya fue estudiada, aislada e investigada por su producción de antibióticos y la capacidad de inhibir un gran número de fitopatógenos.

Dentro de otras especies que fueron aisladas y caracterizadas se encuentra *B. cereus*. En una publicación realizada por Vilain (2006), se aisló esta especie y se observó su ciclo vital en el suelo donde participa activamente en los ciclos biogeoquímicos, con capacidad de germinar, crecer y esporular y volver a crecer.

## **Pruebas Cualitativas**

La finalidad de esta prueba fue seleccionar las cepas que presentaran mejores cualidades para realizar los posteriores ensayos donde mostraran realmente su actividad inhibitoria obteniendo resultados cuantitativos.

Cuadro 5. Confrontación de cepas aisladas contra hongos fitopatógenos

PATOGENO	ANTAGONISTAS								
	Bsp G/A. PF	BspG /A.T2	BspG /B1 S.L.P	BspG /AC3 B3	BspG /CS1	Bsp G/T T2	BspG /TT3	Bsp G/C S3	BspG / B2 S.L.P
<i>Fusarium oxysporum</i>	✓	✓	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓
<i>Alternaria solani</i>	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Rhizoctonia solani</i>	✓	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓
<i>Botryodiplodia theobromae.</i>	✗	✓	✓	✗	✓	✗	✓	✓	✓
<i>Cercospora musae</i>	✓	✓	✓	✗	✓	✓	✓	✓	✓
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	✗	✗	✓	✗	✓	✗	✗	✗	✓

Mediante la técnica de discos impregnados se seleccionaron las cepas que por apariencia presentaban mayor dimensión del halo de inhibición para los hongos. En el cuadro 5 se observa que los hongos de suelo presentan mayor resistencia como: *Rhizoctonia solani* y *Sclerotinia sclerotiorum*, por el contrario *Alternaria solani* tuvo actividad susceptible a la mayoría de las bacterias.

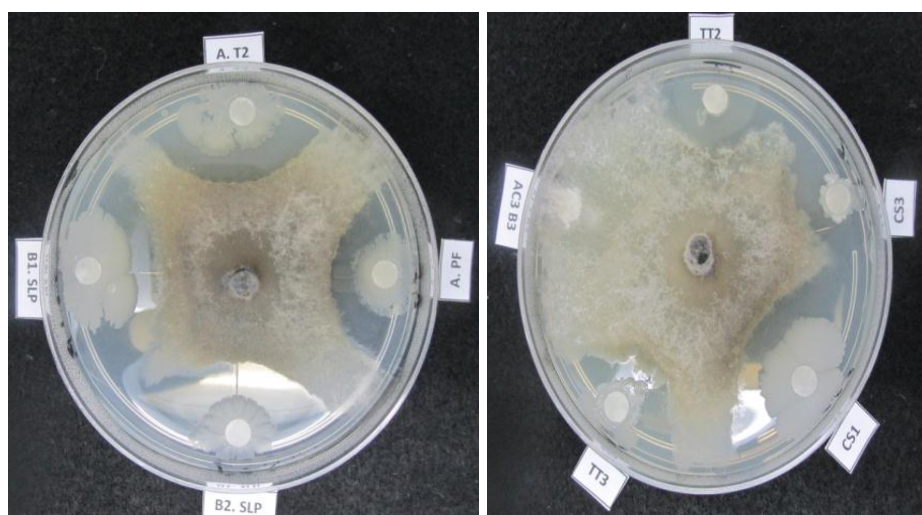


Figura 9. Antagonismo de bacterias benéficas sobre *Cercospora musae*

En forma cualitativa se seleccionaron a las bacterias que se observaron con mayor efectividad. Destacando a B1. S.L.P. y CS1 como las mejores,

inhibiendo a todos los hongos fitopatogenos. Además se selecciono a B2 S.L.P., A. PF y A.T2 por la efectividad mostrada en comparación a las restantes. De las 5 bacterias seleccionadas como las mejores se realizo una mezcla, con la finalidad de evaluar si el potencial era mejor en consorcio. A dicha mezcla se le asigno el nombre de MIX y se preparo ajustando las bacterias a una misma concentración ( $1 \cdot 10^6$  UFC/ML y  $1 \cdot 10^8$  UFC/ML).

## Pruebas Cuantitativas

Fue un total de 5 bacterias que mostraron actividad importante en la prueba cualitativa. Para la obtención de datos cuantitativos y la efectividad real de estas se realizo el ensayo final, utilizando las bacterias y el MIX a distintas concentraciones. Los porcentajes de inhibición obtenidos, se analizaron mediante un análisis de varianza al 95% de seguridad como se muestra en las tablas N y N, de las dos concentraciones evaluadas.

Cuadro 6. Análisis de varianza- concentración  $1 \times 10^8$  UFC/ML

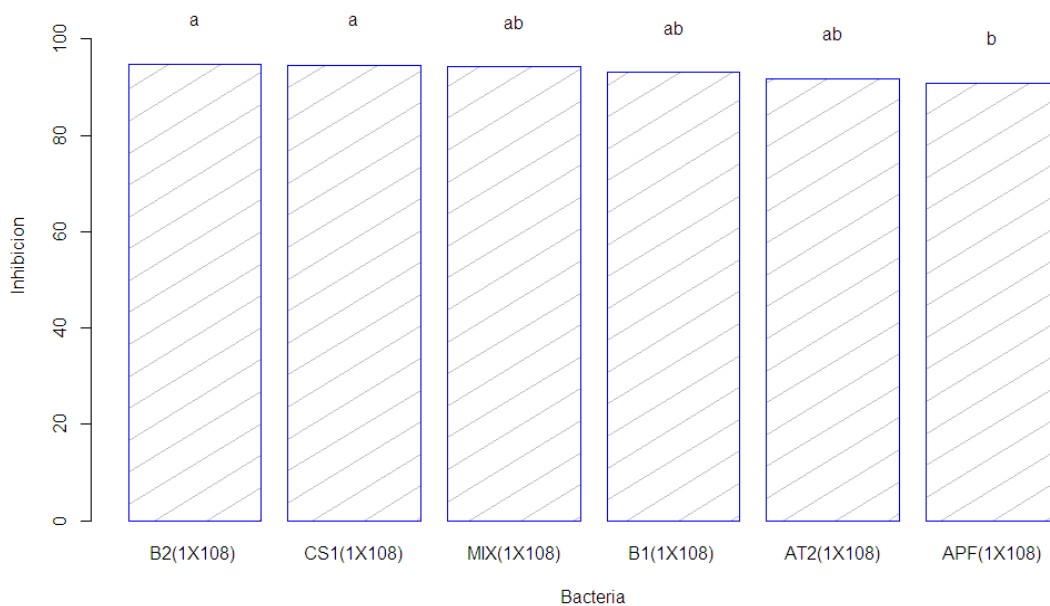
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
HONGO	5	29980.1	5996.0	8520.6596	< 2.2e-16 ***
DOSIS	2	495.9	247.9	352.3333	< 2.2e-16 ***
BACTERIA	5	654.9	131.0	186.1333	< 2.2e-16 ***
HONGO: DOSIS	10	259.4	25.9	36.8596	< 2.2e-16 ***
HONGO:BACTERIA	25	6054.1	242.2	344.1291	< 2.2e-16 ***
DOSIS: BACTERIA	10	21.9	2.2	3.1123	0.0009937 ***
HONGO:DOSIS:BACTERIA	50	165.1	3.3	4.6912	8.758e-16 ***

En la concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/ML por lo general las bacterias actuaron de la misma forma sobre los hongos con porcentajes arriba del 90 % de inhibición. Aunque en todos los tratamientos e interacción de estos, existió diferencia muy significativa como se observa en el cuadro 6.

### Cuadro 7. Prueba Tukey – concentración $1 \times 10^8$ UFC/ML

1	B2(1X108)	94.66667	a
2	CS1(1X108)	94.51852	a
3	MIX(1X108)	94.18519	ab
4	B1(1X108)	93.11111	ab
5	AT2(1X108)	91.81481	ab
6	APF(1X108)	90.88889	b

La media obtenida de las bacterias fue muy similar, es por esto que no existieron más de dos grupos en la comparación de datos realizada con la prueba Tukey (cuadro 7). En las cepas se encontraron sin marcada diferencia entre la de mayor acción en comparación a la menor.



Grafica 1. Actividad antagonista por bacteria - concentración  $1 \times 10^8$  UFC/ML

El mayor numero de colonias y la rapidez de propagación fue determinante en el control de los hongos, por lo tanto, el área de crecimiento disminuyo para el fitopatógeno y en comparación al testigo la diferencia fue muy notoria. En esta

concentración existió menos contraste de efectividad entre bacterias como se observa en la grafica 1.

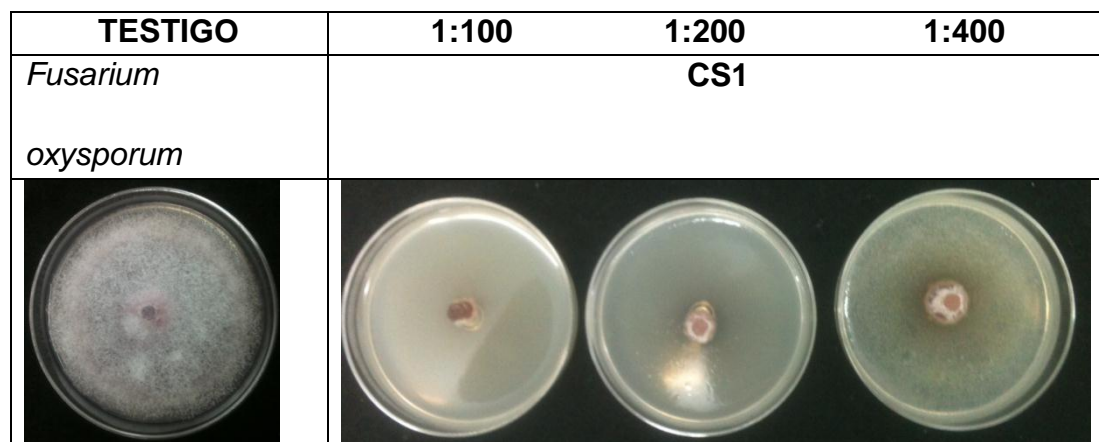


Figura 10. Inhibición del hongo *F. oxysporum* por la cepa CS1 en la concentración  $1 \times 10^8$  UFC/ML a 3 diferentes dosis (1:100, 1:200 y 1:400).

A mayor concentración de bacterias el efecto sobre los hongos es más visible, esto se debe a la competencia por espacio y la mayor rapidez de crecimiento de las bacterias. Esta es una de las ventajas de estos organismos en el control biológico, entre otras cualidades que presentan es la rapidez en el aprovechamiento de nutrientes, producción de sustancias inhibitoras (bacteriocinas), producción de endosporas que le permiten persistir en condiciones adversas, etc.

Cuadro 8. Análisis de varianza-concentración  $1 \times 10^6$  UFC/ML

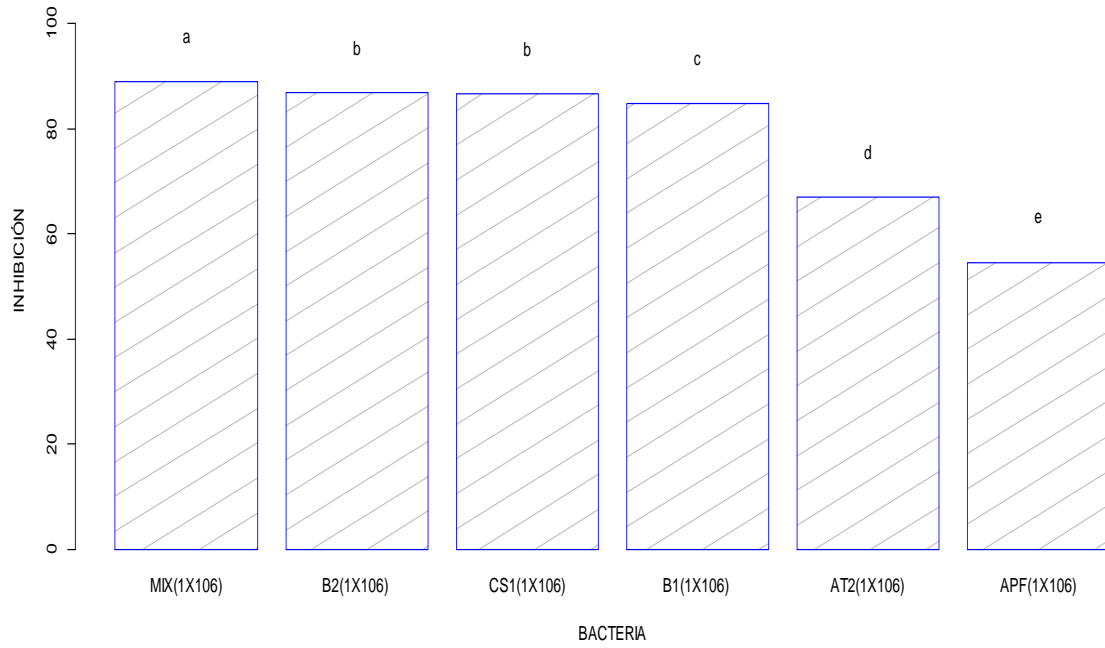
	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
HONGO	5	37843	7568.7	6663.746	< 2.2e-16 ***
BACTERIA	5	53220	10644.0	9371.337	< 2.2e-16 ***
DOSIS	2	3750	1875.0	1650.818	< 2.2e-16 ***
HONGO:BACTERIA	25	52016	2080.7	1831.878	< 2.2e-16 ***
HONGO:DOSIS	10	530	53.0	46.630	< 2.2e-16 ***
BACTERIA:DOSIS	10	427	42.7	37.561	< 2.2e-16 ***
HONGO:BACTERIA:DOSIS	50	1172	23.4	20.637	< 2.2e-16 ***

El análisis de varianza realizado de la concentración  $1 \cdot 10^6$  UFC/ML muestra la diferencia muy significativa de datos en lo particular de cada variable (Hongo, Bacteria y Dosis). Además, en la interacción de las 3 variables también existió diferencia muy significativa entre tratamientos.

Cuadro 9. Prueba Tukey – concentración  $1 \cdot 10^6$  UFC/ML

a	MIX(1X106)	88.89
b	B2(1X106)	86.93
b	CS1(1X106)	86.59
c	B1(1X106)	84.74
d	AT2(1X106)	67.07
e	APF(1X106)	54.57

En la comparación de medias de la prueba Tukey (cuadro 9) ubica al MIX como la más efectiva, aunque no muy alejada del grupo inmediato. Como se refleja en la grafica 2 existieron 4 cepas que tuvieron similar actividad. Las bacterias A.T2 y A.PF estuvieron por debajo del 70 % de inhibición en promedio, ubicándolas como las menos eficaces en comparación al resto de las bacterias. En investigaciones realizadas en Cuba, por Rojas *et al.*, (2008) obtuvo de la confrontación de cepas de *Bacillus spp.* sobre *Alternaria solani* y *Fusarium sp.* porcentajes de inhibición que rondaron el 85% pero a una concentración de  $1 \cdot 10^8$  UFC/ML.



Grafica 2. Actividad antagonista por bacteria – concentración 1x10<sup>6</sup> UFC/ML.

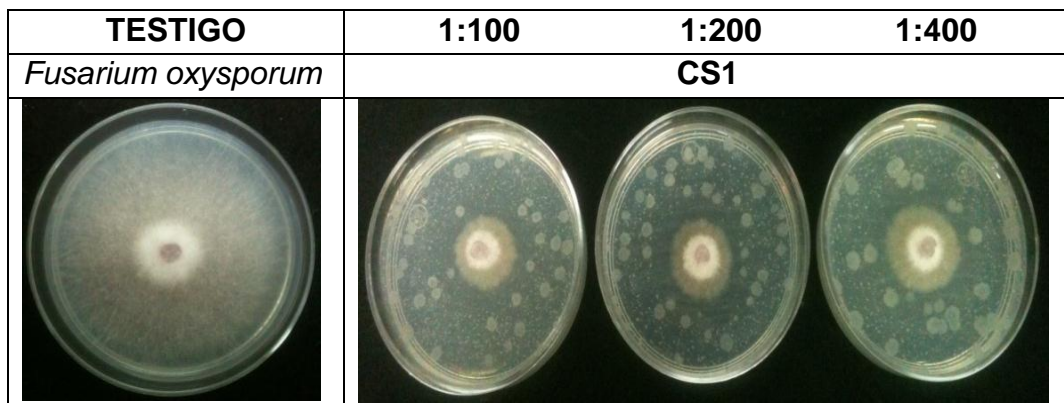
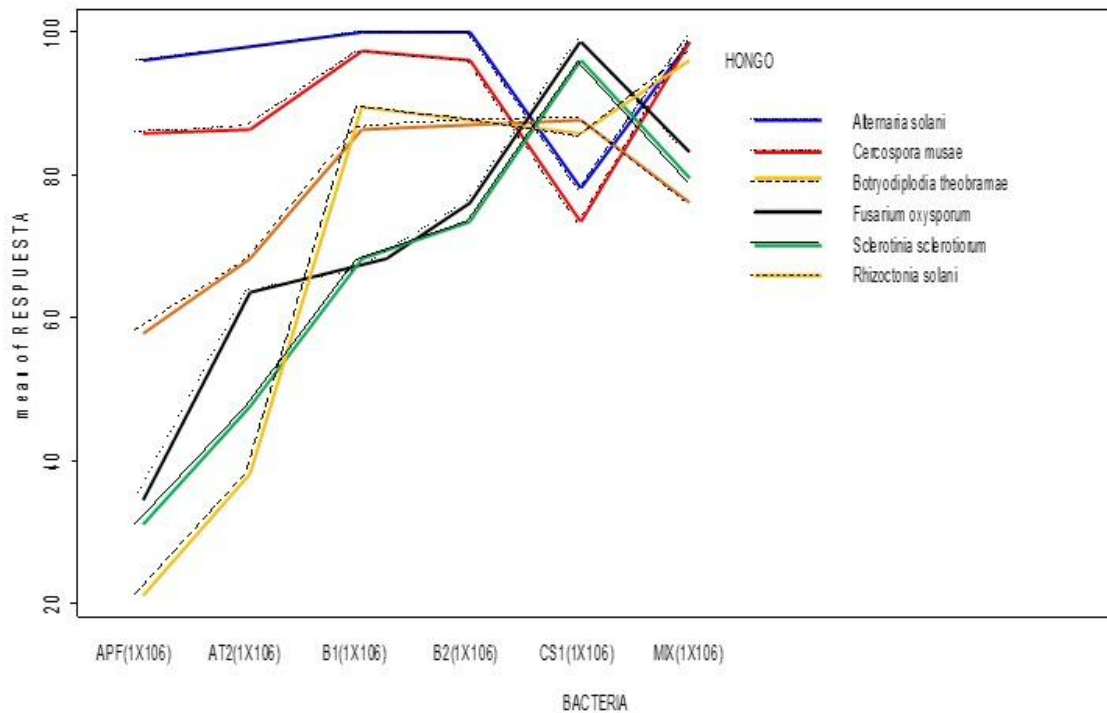


Figura 11. Inhibición del hongo *F. oxysporum* por la cepa CS1 en la concentración 1x10<sup>6</sup> UFC/ML a 3 diferentes dosis (1:100, 1:200 y 1:400).

Las cepas de este género deben aprovecharse en función de la obtención de bioproductos, así como la diversidad de mecanismos de acción de estas bacterias, en los cuales se debe profundizar aún más.





Grafica 3. Interacción de antagonismo de bacterias sobre hongos ( $1 \times 10^6$  UFC/ML).

En lo general la interacción observada de las bacterias sobre los hongos resulto con mayor susceptibilidad a los foliares (grafica 3). El hongo que presento mayor resistencia en cuanto a control de las bacterias fue *Sclerotinia sclerotiorum* mostrado anteriormente en la comparación de medias mediante la prueba Tukey. La mezcla MIX presento la mayor capacidad por inhibir a los hongos fitopatogenos y sin tantas variaciones. La bacteria CS1 presenta diferencia a las demás, inhibiendo en esta caso de mejor forma a los hongos fitopatogenos de suelo y con menor efecto sobre los foliares.

## CONCLUSIONES

La especie de bacteria predominante en las caracterizaciones fue *Bacillus subtilis*, la cual por sus características en forma de colonia y aprovechamiento de algunos nutrientes en específico fue posible su identificación, además de otras bacterias como *Bacillus cereus*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Brevibacillus spp.*

La mezcla de las mejores cepas (MIX) tuvo mejores resultados en comparación a la efectividad de las bacterias por separado, lo cual indica que presentaron buena afinidad entre estas y no perdieron sus cualidades antagonicas. Por el contrario, la bacteria A.PF se observó con los porcentajes de inhibición más bajos en los ensayos, para el caso de posteriores ensayos dando seguimiento a esta investigación se podría omitir esta bacteria.

La actividad biocontroladora de las bacterias aisladas en contra de los hongos fue buena, con esta investigación se demuestra que mediante el uso de bacterias antagonistas se puede contrarrestar el daño por organismos causantes de enfermedades en plantas. Mediante aplicaciones adecuadas del control biológico, podría en un futuro sustituir de forma considerable al control químico.

## BIBLIOGRAFIA

Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5<sup>a</sup> Edition. Academic Press. New York. 803 pP.

Alexopoulos, C. J. y C. W. Mims. 1979. Introductory micology. 3th. Edition. Willey y Sons. USA. 632 P.

Andrew, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annual Review Phytopathology 30: 603-635.

Arbeláez, T. Germán. 2000. Algunos aspectos de los hongos del genero *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia. 18 p.

Ashworth, L.J., Huisman, O.C., Weinhold, A.R.& Hancock, J.G. 1981. Estimating Yield Losses Caused by Soil-Borne Fungi. In: Crop Loss Assessment Methods. Supplement 3. Chiarappa, L. (ed.) pP. 91-95. FAO. CAB. England, U. K.

Badii, M. H. y Abreu, J. L. (2006). Control biológico: una forma sustentable de control de plagas. Daena: International Journal of Good Conscience, 1(1), 82-89.

Backman PA, Wilson MA, Murphy JF. (1997). Bacteria for biological control of plant diseases. Environmentally safe approaches to crop disease control. p.95-109. New York, USA: Lewis Publishers.

Belmonte, M. L.; Carrasco, N.; Báez, A. 2006. Cosecha Gruesa. Soja, Maíz, Girasol. Manual de campo. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Estación Experimental Agropecuaria - Anguil; Estación Experimental Agropecuaria - Barrow. Página/s: 106.

Bergey's (1994) Manual of Systematic Bacteriology. 9<sup>a</sup> Edition. Krieg NR, Holt J. (editores) Ed. Baltimore. London. p.1105-39

Bergeys D, 2000. Manual of the Determinative Bacteriology. Night Edition. Philadelphia 2 :540-589.

Bonmatin, J., Laprévote, O., Peypoux, F. (2003). Diversity Among microbial cyclic lipopeptides: Iturins and Surfactins. Activity-Structure Relationships to design new bioactive agents. *Comb. Chem. High Throughput Screening.*, 6, 541-556.

Brada, IE., Quintana, E., Pelaya, E., Araujo, T. 1995. Efecto de *Bacillus* spp. sobre la germinación y desarrollo de semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* M.) infestadas con *Fusarium oxysporum* Schl.var. *cubensis* Smith. Rescemenes Bioplág 95. (1995, Ciudad Habana, Cuba). INIFAT p.11.

Castellanos, J. J., Oliva, P., Izquierdo, E., Morales, N. 1995. Evaluación de *Bacillus subtilis* como biocontrol del patógeno *Alternaria porri* (Ell) en cebolla. Bioplaguicidas 95. Habana, Cuba. p. 21

Castillo, C., Sosa, B y Scorza, J. (2004). Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos, producidos por esporulados del género *Bacillus*. Rev. Soc. Ven. Microbiol. Vol. 24, num 1-2, p 65-67.

Chen Y. P., Rekha P. D., Arun A. B., Shen F. T., Lai W., Young C. C. 2006. Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology.;34:33-41.

De la Garza, GJL. 1996. Fitopatología general. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. Marín Nuevo León. 515p.

Emert EAB, Klimowicz AK, Thomas MG, Handelsman J (2004). Genetic of Zwittermicin A production by *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 70(1):104-13.

Escande, A.; Pereyra, V.; Pedraza M. V.; Troglia, C.; Quiroz, F. 2002. Sclerotinia en Girasol. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; Estación Experimental Agropecuaria - Balcarce, Buenos Aires; Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario (IDIA XXI). Nº 3, Oleaginosas, Sección Girasol. Página/s: 140 - 143.

Euzeby J. P. (2006). List of Prokariotic Names with standing nomenclature.. Disponible en: <http://www.bacterioCict.fr/index.html>.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). (2007). "Recursos genéticos microbianos en el simposio de recursos genéticos para América latina y el Caribe". Undécima reunión ordinaria. Roma, 11-15 de junio de. [www.fao.org/ag/cgrfa/cgrfa11.htm](http://www.fao.org/ag/cgrfa/cgrfa11.htm)

Femenía M. E. (2007). Caracterización química de cepas de hongos del género *colletotrichum*: síntesis de gloeosporiol. diseño y síntesis de modelos de agentes fungiestáticos. Universidad de Cádiz, España. 346 pp.

FHIA, 2007. Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias. 4:2-5.<http://fhia.org.hk/downloads/fhiainfdic2007.pdf>. accesada 02/11/10

Foster, A. (2001). Magazine: Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. Department of Molecular Biology and Biotechnology, University of Sheffield, UK. 91(2):364-72.

Fullerton, R. A. 1994. Sigatoka leaf diseases. In: Compendium of Tropical Fruit Diseases. Ploetz, R.C. et al. (Editors). The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota. Pp. 12-14.

Gerhardson, B. (2002), "Biological substitutes for pesticides", *Trends in Biotechnol.*, 20, 338-342.

Harman, G., Lumrden. 1990. The Rhizosphere. New York, Wiley & Sons.p. 259 – 280.

Holt, J., Krieg, N., Sneath, P., Staley, J. & Williams, S. (2000). Bergey's, Manual of Determinative Bacteriology. Novena edición. Edited by Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland, USA. 787 p.

Hoton F, Andrup L, Swiecicka I, Mahillon J. (2005). The cereulide genetic determinants of emetic *Bacillus cereus* are plasmidborne. *Microbiology*. 151:2121-24.

Hu LB, Shi ZQ, Zhang T, Yang ZM (2007). Fengycin antibiotics isolated from B-FS01 culture inhibit the growth of *Fusarium moniliforme* Sheldon ATCC 38932. *FEMS Microbiology Letters*. 272:91-8.

lañez, E. (2003). Curso de Microbiología General. Quimioterápicos de síntesis y Antibióticos. Buenos Aires-Argentina.

Jones, J.B., Jones, J.P. 1993. Compendium of tomato diseases. The America Phytopathological Society. Minnesota, Estados Unidos.

Kavitha, S., S. Senthilkumar, S. Gnanamanickam, M. Inayathillah, and R. Jayakumar. "Isolation and partial purification of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16." *Process Biochemistry* 40 (2005): 3236-3243.

Kim, DS., Cook, R.J., Weller, DM. 1997. *Bacillus* sp. L324-92 for biological control of three root disease of wheat grown with reduced tillage. *Phytopathology* 87:551-558.

Korsten L. y Janisiewicz, W. (2002), "Biological control of postharvest diseases of fruits", *Ann.Rev. Phytopathol.*, 40, 411-441.

Lazzarete, E, Menten, J. O. M, Bettiol, W. 1994. *Bacillus subtilis* antagonicos aos principaes patógenos asociados a sementes de feijao e trigo. *Fitopatología Venezolana* 7:42-46.

Lecuona, RE. Ed. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Argentina. 338 p.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. 1998. Brock biología de los microorganismos. 8ª Ed. Edit; Prentice Hall. España. 986p.

Mantecón, J.D. 2002. Enfermedades y plagas de la papa. Tizón temprano (*Alternaria solani* Sorauer). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Estación Experimental Agropecuaria - Balcarce. Página/s: 2. URL: Link. Fecha de consulta: 28/12/2010. Hospedero: Papa - Referencia: 411.

Marquez T. Francisco J. 2007. Tesis "Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo". Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile. 74 Pag.

Moffat, A.S. (2001), "Finding new ways to fight plant diseases", *Science*, 292, 2270-2273.

National Academy of Sciences. 1980. Desarrollo y Control de las Enfermedades de las Plantas. Control de Plagas de Plantas y Animales. Vol 1. Editorial Limusa. México. 223 pP.

Nelson M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Prospects for new inoculants. Online. Crop Management, Plant Management Network. 2004. Disponible en: <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/cm/review/2004/rhizobacteria/>.

Pérez-Piqueres, A., Vicent, A., Armengol, J. y García-Jiménez, J. (2000). *Botryodiplodia theobromae* Pat., patógeno en palmeras del género *Phoenix* en la Comunidad Valenciana. Cuadernos de Fitopatología 64: 153-157.

Raghavendra J, Brian B. 2005. Identification and Characterization of Novel Genetic Markers Associated with Biological Control Activities in *Bacillus subtilis*. PHYTO-96-0145.

Rasche, F.; Marco-Noales, E.; Velvis, H.; van Overbeek, L. S.; Lopez, M. M.; van Elsas, J. D.; Sessitsch, A. 2007. "Structural characteristics and plant-beneficial effects of bacteria colonizing the shoots of field grown conventional and genetically modified T4-lysosyme producing potatoes." 2006. (Cit. en: Whipps, J. M., P. Hand, D. Pink, and G. D. Bending. "Phyllosphere microbiology with special reference to diversity and plant genotype." *Journal of Applied Microbiology*,: 1744-1755).

Romero-Tabarez, M. (2006). 7-O<sub>2</sub>-malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. Division of Microbiology, German Research Centre for Biotechnology. Braunschweig, Germany. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 50(5): 1701-1709.

Oard, S., Rush, M. C., Oard, J. H. 2004. Characterization of antimicrobial peptides against a US strain of the rice pathogen *Rhizoctonia solani*. *Journal of Applied Microbiology* 97: 169-180.

Rojas, M. M., Tejera, B., Larrea J. A., Heydrich, M. 2008. Caracterización de cepas del género *Bacillus* asociadas al cultivo del arroz (*Oryza sativa*). 4to Encuentro Internacional del Arroz, La Habana, Cuba.

Sadfi, N., M. Chérif, M. R. Hajlaoui, A. Boudabbous, and R. Bélager. (2002). "Isolation and partial purification of antifungal metabolites produced by *Bacillus cereus*." *Annual Review of Microbiology* 52: 323-337

Schlegel, H. (1997). *Microbiología general*, Ediciones Omega, S.A., Barcelona. 654 p.

Serrano, L., C. Flores, M. Patiño, M. Ortiz, V. Albiter, M. Caro, R. Allende, A. Carrillo, E. Galindo (2003), "Desarrollo de bioprocesos para la producción de agentes de control biológico: experiencias de escalamiento y pruebas de campo", *Memorias del X Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, Puerto Vallarta, Jalisco.

Sharma, R. R., Singh, D., Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control* 50: 205–221.

Sid A., Ezziyyani m., Perez-Sanchez C., and Candela M<sup>a</sup> E. (2003). Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus spp.* and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*, L.) plants. *EUROPEAN J. of PLANT PATHOLOGY*, 109: 633 -637.

Sneath, P. H., J. G. Holt, J. T. Staley, and S. T. Williams. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 4. Baltimore: Williams & Wilkins, 2005.

Stein, T. (2005). MicroReview *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Mol Microbiol.*, 56, 845–857.

Tejera-Hernández Berto, Rojas-Badía Marcia M., Heydrich-Pérez Mayra. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos Fitopatógenos *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 42, núm. 3, pp. 131-138.

Toledo, D. B. (2004). Evaluación in vitro del efecto de cepas nativas de la bacteria *Bacillus sp.* en el biocontrol de la bacteria *Erwinia carotovora* (memoria de título). Universidad de Talca, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Agronomía, Chile.

Touré, Y., Ongena, M., Jacques, P., Guiro, A. and Thonart P. (2004). Role of lipopeptides produces by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *J Appl Microbiol.*, 96,1151-1160.

Torres, E., Frías, A. y Villa, P. M. (2001). Metabolitos antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PSS: Influencia de la fuente de carbono en la síntesis. *Bio Tecnología*, 10(1), 42-49.

VanLenteren, J. C. 2000. A greenhouse with out pesticides fact or fantasy?. *Crop Protection* 19: 375-384.

Vater, J., Kablitz, B., Wilde, C., Franke, P., Mehta, N. and Cameotra, S. (2002). Matrix- Assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactans in wole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 islated from petroleum sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68,6210-6219.



Vilain, S. (2006). Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. Department of Biology and Microbiology, South Dakota, Brookings, USA. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(7): 4970-4977.

Volpon, L., Besson, F., Lancelin, J. M. 2000. NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub>. *FEBS Letters* 485: 76-80.

Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M., Vater, J. (1997). Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63,44-49.

Webster, J. P. G., Bowles, R. G. and Willians, N. T. 1999. Estimating the economics benefits of alternative pesticide usage scenarios: Wheat productions in the United Kingdom. *Crop Protection* 18: 83-89.

Wichitra, L., Punpen, H., Samerchai, C. 2007. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 48: 113-121.

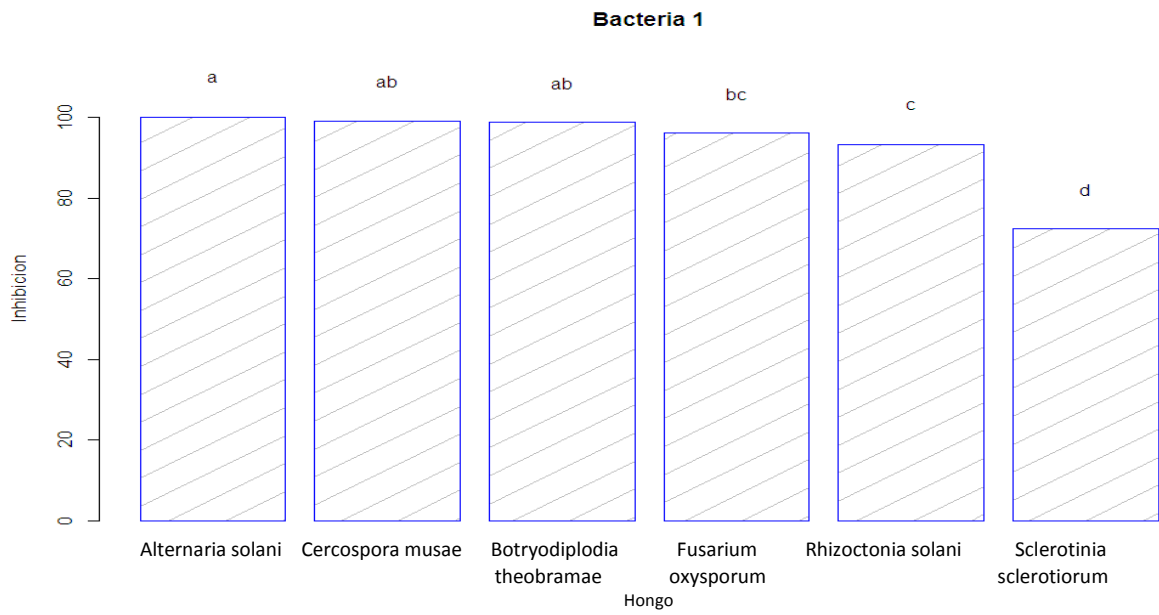
Wulff, E. G., Mguni, C. M., Mansfeld-Giese, K., Fels, J., Lübeck, M., Hockenhull, J. 2002. Biochemical and molecular characterization of *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* and *B. pumilus* isolates with distinct antagonistic potential against *Xanthomonas campestris*.

Yakimov, M., Timmis, K., Waray, V. and Fredrickson H. (1995). Characterization of a new Lipopeptide Surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface bacillus licheniformis BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61,1706-1713.

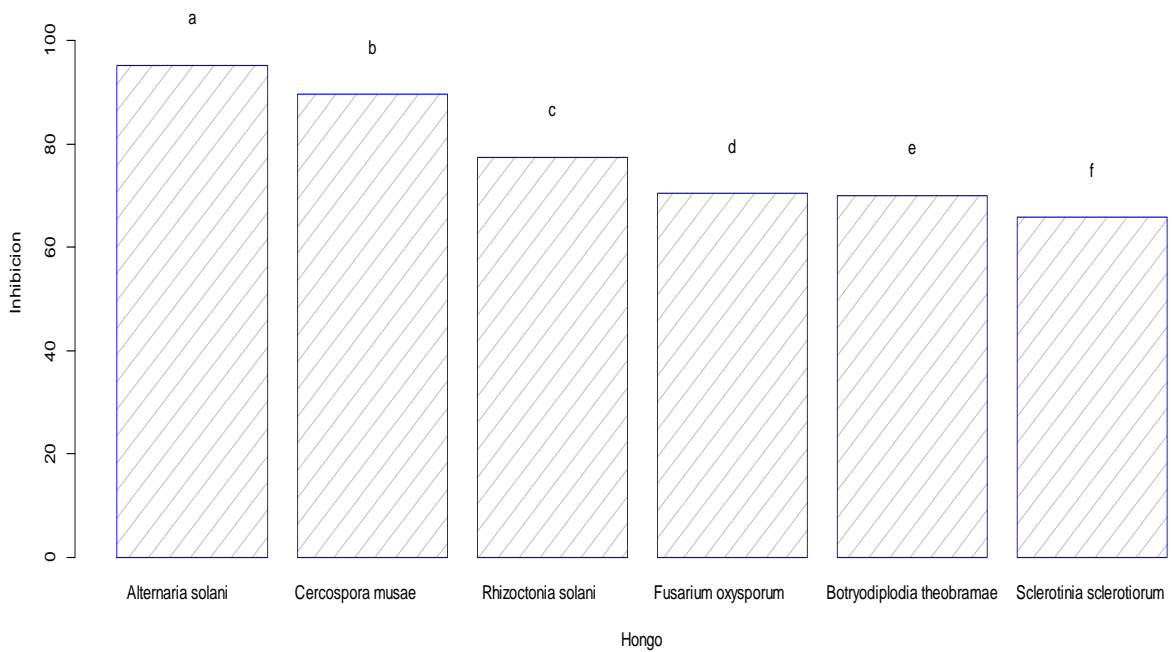
Yu, G. Y., Sinclair, J. B., Hartman G. L., Bertagnolli, B. L. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biology and Biochemistry* 34(7): 955-963.

Zavaleta-Mejía, E. y Ochoa M.D.L. 1992. Control Biológico de Fitopatógenos. Memorias XIX Congreso Nacional de Fitopatología. Buenavista Saltillo, Coahuila.140p.

# ANEXOS



Grafica 4. Comparación de susceptibilidad de hongos ( $1 \times 10^8$  UFC/ML)



Grafica 5. Comparación de susceptibilidad de hongos ( $1 \times 10^6$  UFC/ML)