

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA “ANTONIO NARRO”

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS



**“COMPORTAMIENTO ANTAGÓNICO DE *Bacillus megaterium* (de Bary, 1884)
CONTRA HONGOS IN VITRO”**

POR

ANGELES MARTÍNEZ ORTEGA

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN AGROECOLOGÍA

Torreón, Coahuila, México

Diciembre de 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"
UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

"COMPORTAMIENTO ANTAGÓNICO DE *Bacillus megaterium* (de Bary, 1884)
CONTRA HONGOS IN VITRO"

TESIS QUE PRESENTA:

ANGELES MARTÍNEZ ORTEGA

ELABORADA BAJO LA SUPERVISIÓN DEL COMITÉ DE ASESORÍA Y APROBADA
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERO EN AGROECOLOGÍA

Aprobada por:

ASESOR PRINCIPAL:



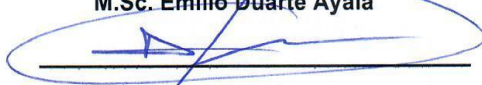
Dr. Jesús Vázquez Arroyo

ASESOR:



M.Sc. Emilio Duarte Ayala

ASESOR:



Dr. Alfredo Ogaz

ASESOR:



M.C. Gerardo Zapata Sifuentes



M.C. Víctor Martínez Cueto



COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

DICIEMBRE DE 2016

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA "ANTONIO NARRO"

UNIDAD LAGUNA

DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

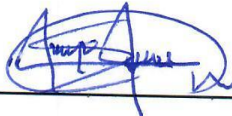
"COMPORTAMIENTO ANTAGÓNICO DE *Bacillus megaterium* (de Bary, 1884)
CONTRA HONGOS IN VITRO"

TESIS QUE PRESENTA:

ANGELES MARTÍNEZ ORTEGA

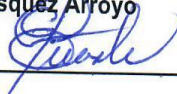
QUE SOMETE A CONSIDERACIÓN DEL H. JURADO EXAMINADOR:

PRESIDENTE:



Dr. Jesús Vásquez Arroyo

VOCAL:



M.Sc. Emilio Duarte Ayala

VOCAL:



M.C. Gerardo Zapata Sifuentes

VOCAL SUPLENTE:



Dr. Alfredo Ogaz



M.C. Víctor Martínez Cueto
COORDINADOR DE LA DIVISIÓN DE CARRERAS AGRONÓMICAS

TORREÓN, COAHUILA, MÉXICO

DICIEMBRE DE 2016

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarme la oportunidad de lograr un paso más en mi vida, por darme las fuerzas para salir adelante.

A la universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna por que durante casi 5 años me brindo las oportunidades de continuar mis estudios, las salidas a campo para la realización de las prácticas y los apoyos económicos que nos brindaron que bien o mal siempre llegaron en el momento oportuno.

A mi asesor el Dr. Jesús Vásquez Arroyo por el tiempo brindado, su paciencia y las palabras de aliento que me motivaron a seguir adelante, la ayuda brindada en la realización de este trabajo.

Al Biólogo Eduardo Blanco Contreras por los consejos brindados, el apoyo y la motivación de nunca darme por vencida, gracias por todo el conocimiento brindado en el transcurso de la carrera.

A la Bióloga Mercedes Sáenz por las pláticas y los regaños que me ayudaron a salir adelante, su amistad y el apoyo brindado.

Al M. Sc. Emilio Duarte Ayala por su ayuda brindada como maestro, al M.C. Fortino Domínguez Pérez por brindarme su conocimiento, las conversaciones de ayuda y sobre todo su amistad.

DEDICATORIAS

A mis padres Pedro Martínez Sánchez y Herlinda Ortega Santaella por brindar tanto como a mí y a mis hermanos el apoyo incondicional para lograr este sueño que sin su apoyo no lo hubiéramos podido lograr, las palabras de motivación, consejos, regaños, y sobre todo por brindarme los recursos necesarios para continuar con mis estudios.

A mis hermanos Kike José y Angélica, porque a pesar de nuestras indiferencias siempre nos hemos apoyado los unos a los otros, por estar tanto en los momentos difíciles como en los buenos.

A mi sobrino José Enriquito porque a tu llegada nos has llenado de felicidad tanto a tus papas como a los demás de sacar lo máximo para seguir adelante, llegaste a dar una unión más fuerte en la familia.

A mis amigos de la escuela y compañeros de generación por la confianza brindada que a lo largo de estos años se convirtieron en una nueva familia, gracias por los momentos inolvidables que compartimos juntos, me apoyaron y creyeron en mí y a los que no igual porque me motivaron a seguir con mi deseo de concluir esta etapa de mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	i
DEDICATORIA.....	ii
ÍNDICE DE CUADROS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 OBJETIVO GENERAL.....	2
1.2 HIPOTESIS.....	2
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV):.....	3
2.2 Taxonomía y clasificación.....	4
2.3 Aislamiento de <i>Bacillus megaterium</i>	7
2.3.1 Efectos de promoción de crecimiento vegetal.....	8
2.3.2 Eventos de colonización.....	9
2.4 Los géneros bacterianos.....	10
2.4.1 El género <i>Bacillus</i>	10
2.4.1.2 Identificación.....	12
2.4.2 Características metabólicas de interés agronómico.....	12
2.4.3 Colonización de raíces.....	12
2.4.4 Mecanismos promotores de crecimiento vegetal.....	13
2.5 Patógenos fúngicos de la Comarca Lagunera.....	14
2.6 Mecanismos antagónicos para el control de fitopatógenos fúngicos.....	16
2.6.1 Producción de antibióticos.....	16
2.6.2 Producción de enzimas líticas.....	17
2.6.3 Producción de enzimas detoxificantes.....	17
2.6.4 Producción de sideróforos.....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Ubicación del experimento.....	19

3.2 Material biológico.....	19
3.3. Medios de Cultivo.....	19
3.4. Técnica de estría cruzada para la siembra y selección de cepa (Figura 1).....	20
3.5. Siembra en tubos y condiciones de incubación.	21
3.6. Siembra de hongos filamentosos.....	21
3.7. Cinética de crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i>	22
3.8. Tinción de Gram.	23
3.9 Ensayos preliminares.....	24
3.10 Ensayos antagónicos in vitro.....	24
4. RESULTADOS.....	26
4.1. Caracterización de <i>Bacillus megaterium</i>	26
4.2. Cinética de crecimiento de <i>B. megaterium</i> en caldo nutritivo.	27
4.3 Cinética de crecimiento del <i>Fusarium oxysporum</i> en PDA.....	28
4.4 Resultados de antagonismos bacteriano contra <i>Fusarium xysporum</i>	30
5. DISCUSIÓN.....	33
6. CONCLUSIONES.....	33
REFERENCIAS.....	35

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de la bacteria <i>Bacillus megaterium</i> SR28C.	6
Cuadro 2. Géneros de hongos registrados en los suelos de la Laguna, Coahuila-Durango, México cuadro tomado de Samaniego-Gaxiola <i>et al.</i> , (2007), con modificaciones.....	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Técnica de siembra bacteriana por estrías en cajas Petri con medio sólido.	21
Figura 2. Caracterización de <i>Bacillus megaterium</i> , es una bacteria Gram-positiva, figura a en forma de cadenas (Amornrat, 2009) y de barras características (b) resultado del estudio.	27
Figura 3. Curva de crecimiento de <i>Bacillus megaterium</i>	28
Figura 4. Crecimiento de <i>F.oxysporum</i> en PDA.....	29
Figura 5. Crecimiento de <i>F.oxysporum</i> en Agar nutritivo.	29
Figura 6. Reproductibilidad y repetitividad del crecimiento de <i>F. oxysporum</i> en dos medios (Agar nutritivo y PDA).	30
Figura 7. Comprobación de la inhibición del crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> con <i>B. megaterium</i> y sin este.	31
Figura 8. Efecto antagónico de la concentración decimal de <i>B.megaterium</i> sobre <i>F. Oxysporum</i> utilizando AN como medio de cultivo del hongo. Las cajas petri de la parte duperior, representan la inhibición con dilución 10-3, mientras abajo, son diluciones de 10 ⁻⁷ , 10 ⁻⁸ y 10 ⁻⁹ . 32	
Figura 9. Efecto inhibitoria de la densidad óptica (D.0.= 0.116) de <i>B. megaterium</i> sobre el hongo <i>F. oxysporum</i>	32

RESUMEN

Uno de los problemas fitopatológicos que afectan a los cultivos de la Comarca Lagunera son los ocasionados por *Fusarium*. El uso de agentes biológicos para controlar fitopatógenos representa una alternativa ecológica para inhibir las enfermedades. Se ha demostrado que *Bacillus megaterium* actúa contra hongos fitopatógenos, como el de la cebolla causada por *Sclerotium cepivorum*, la soya por *Rizoctonia solani* y el arroz por *Fusarium roseum* y *Alternaria alternata*. El objetivo del presente estudio fue determinar el comportamiento antagónico in vitro de *B. megaterium* contra hongos. El estudio se realizó en el Laboratorio de Agroecología de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Regional Laguna. El ensayo in vitro se llevó a cabo en placas de agar nutritivo inoculadas con tres porciones de agar de 0.5 cm de diámetro del cultivo de hongos de tres días, utilizando un sacabocados, las pruebas fueron por quintuplicado. Se llevaron a cabo estudios de cinética de crecimiento para hongos utilizando los medios de cultivo de agar de papa dextrosa y agar nutritivo. Para el caso de *B. megaterium*, la cinética se llevó a cabo en caldo nutritivo realizando lecturas de densidad óptica a una longitud de onda de 400 nm. Del cultivo bacteriano se realizaron diluciones decimales para determinar la concentración mínima de antagonismo. Resultados, el medio de cultivo sólido para el crecimiento de la bacteria, resultó apropiado para el crecimiento de hongos. Cabe destacar que el comportamiento antagónico de *B. megaterium* fue de todo o nada, donde la dilución del cultivo de 10^{-3} , fue la mínima que inhibe al hongo. Así mismo, se encontró que a una densidad óptica de 0.116, se inhibió el crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

Palabras Claves: Antagonismo, *Bacillus megaterium*, *Fusarium oxysporum*

1. INTRODUCCIÓN

El uso de agentes biológicos para proteger la planta contra patógenos representa una alternativa ecológica a los pesticidas utilizados para controlar las enfermedades de las plantas. Los éxitos de un agente de control biológico en la supresión de las enfermedades de las plantas dependen de establecer poblaciones metabólicamente activas que pudieran mediar la protección del hospedero y competir directa o indirectamente con los patógenos por los recursos de los nutrientes (Bashan, 1998).

Dentro de las alternativas para combatir esta problemática se encuentra el uso de las bacterias conocidas Rizobacterias Promotoras del Desarrollo Vegetal (PGPR) las cuales promueven incrementos en el crecimiento de las plantas así como de la producción y algunas otras actúan como agentes de control biológico (Loredo- Ostil *et al.*, 2004).

Entre los microorganismos más usados en el control biológico han sido bacterias y hongos: en el caso de las bacterias, los géneros *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.* y *Paenibacillus* son los más comunes (Gonzales *et al.*, 2004). Así como también en múltiples estudios han publicado que dentro de las PGPR más referenciadas son *Azospirillum sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhizobium sp.*, *Burkholderia sp.*, *Enterobacter sp.*, *Azotobacter sp.*, *Erwinia sp.*, *Herbaspirillum sp.*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Xanthomonas sp.* (Loredo- Ostil *et al.*, 2004).

El género *Bacillus* es un microorganismo común del suelo que a menudo se recupera del agua, el aire y los residuos de la planta en descomposición, en forma de bastón, bacterias Gram-positivas. Estas células son de 0,5-2,5 μm de ancho y 1,2-10 μm de largo (Reva *et al.*, 2004, citado por Amornrat, 2009). Algunas especies son estrictamente aerobias, otras son anaerobias facultativas o micro aerófilas, pero todas son catalasa positivas. Las especies de *Bacillus* también producen endosporas ovoides o cilíndricas que son resistentes a condiciones ambientales adversas y proporcionan una ventaja selectiva para la supervivencia y la diseminación.

Además, se ha demostrado que *B. megaterium* actúa contra hongos patógenos de las plantas, como la cebolla causada por *Sclerotium cepivorum*, la enfermedad de la soya

causada por *R. solani* y el arroz enfermedades causadas por *Fusarium roseum*, *Alternaria alternata* y *R. solani*.

1.1 OBJETIVO GENERAL.

Determinar la supresión de hongos fitopatógenos mediante bacterias promotoras de crecimiento vegetal para su aplicación en cultivos agrícolas.

Objetivo específico.

Determinar la supresión de hongos con la cepa nativa de *Bacillus megaterium*.

1.2 HIPOTESIS.

H₀: *Bacillus megaterium* inhibe el crecimiento de hongos in vitro.

H_a: *Bacillus megaterium* no inhibe el crecimiento de hongos in vitro.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV)

Existen bacterias asociativas las cuales habitan en la rizosfera que ayudan a estimular el crecimiento de diferentes plantas, también llamadas bacterias promotoras del crecimiento vegetal, estas estimulaciones son por medios de mecanismos como síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal, fijación de nitrógeno, solubilización de nutrientes y el control de patógenos del suelo (Loredo- Ostil *et al.*, 2004; Laslo *et al.*, 2012), producción de fitohormonas y sideróforos, la solubilización de fosfato y la síntesis de enzimas que alteran los niveles de fitohormonas (Holguin *et al.*, 2001).

En las últimas décadas, se han hecho investigaciones sobre el papel de las bacterias de la rizosfera o rizobacterias de diversas gramíneas. Diversas bacterias asociadas son consideradas bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), por la capacidad para estimular directamente el crecimiento de las plantas, por diversos mecanismos como el incremento en el volumen de la raíz (Bowen y Rovira, 1999), ayudan también a la inducción de resistencia sistémica a patógenos (Van Peer, *et al.*, 1991), como también a la interacción sinérgica con otros microorganismos del suelo. El uso de estas bacterias promotoras de crecimiento vegetal que colonizan la rizosfera de las plantas pueden ser de vida libre, asociativas, aerobias, anaerobias facultativas (Bashan *et al.*, 1996, citado por Loredo *et al.*, 2004).

El término PGPR incluye tres tipos de bacterias del suelo, en función de su estilo de vida: i). las bacterias que habitan en la zona alrededor de la raíz (rizosfera) de vida libre, ii). los que colonizan la superficie radicular (rizoplano), y iii). las bacterias endofíticas que viven dentro de las raíces. Sin embargo, esta división no es exclusiva, ya que cualquier cepa bacteriana individuo puede adoptar los tres estilos de vida, dependiendo de las condiciones ambientales del suelo y la raíz que están involucrados (Alavi *et al.*, 2013).

El empleo de microorganismos (PGPR) en la agricultura es mínimo; en el caso de las bacterias que controlan plagas y enfermedades su uso sólo representa el 1.4% (380

millones de dólares) del mercado global. Los productos más abundantes son los generados a partir de *Bacillus thuringiensis* (Jiménez *et al.*, 2001).

Estas bacterias pueden prevenir los efectos nocivos de uno o más factores estresantes al medio ambiente, Además con una identificación selección y aplicación de estos microorganismos benéficos pueden aumentar las opciones para poder enfrentar crecientes problemas causados al medio ambiente (Kilian *et al.*, 2000).

2.2 Taxonomía y clasificación

La taxonomía fue revolucionada en el siglo XIX por Charles Darwin, el fundador de la taxonomía evolutiva. Darwin explico porque ciertas especies están relacionadas entre sí. También discutió métodos y dificultades de clasificación (Drews, 2000).

Las bacterias forman parte de los microorganismos que se caracterizan por carecer de membrana nuclear y por tener ribosomas 70s por lo cual se clasifican en el reino *Procariotae* (Pisabarro, 2009), pro de primitivo y cariota de núcleo, todos los organismos vivos se pueden dividir en dos tipos de células: eucariotas y procariotas (Piréz y Mota, 2000).

Cohn (1875), noto que las especies y géneros de bacterias tenían significado diferente que aquellos de organismos superiores, porque la generación propagativa no fue conocida. La clasificación de las bacterias tenía que iniciar por la caracterización de "género forma" y "especie forma". Desde sus inicios, Cohn estaba convencido que el reino de las bacterias consistía de especies con características inherentes. Él defendía este concepto contra el de Theodore Billroth (1829-1894) y muchos otros contemporáneos quienes consideraban que todas las bacterias esféricas o de bastón pertenecían a la misma especie de plantas y tenían únicamente una forma de vida, la cual se puede adaptar a diferentes ambientes y puede cambiar de acuerdo con ellos (pleomorfismo): Micro-, Meso-, Megacoccus y Micor-, Meso- y Meganacterias. Billroth combinó todos los géneros propuestos por Cohn y las especies polimorficas

Coccobacteria septica, excepto para Spirillum y Spirochaete, las cuales él no consideró. Joseph Lister defendía la idea de que las bacterias son generadas de conidias de hongos y que éstas pueden cambiar su morfología durante el cultivo en diferentes medios (Drews, 2000).

Otra de las formas en las que las bacterias pueden clasificarse es en dos grupos diferenciales por medio de una prueba llamada tinción Gram, las bacterias Gram-positivas y las Gram-negativas estas se diferencian porque las positivas carecen de membrana externa, tienen una gruesa capa de peptidoglicano y presentan ácidos teicoicos en su superficie, por otro lado las Gram-negativas tienen membrana externa portadora de lipopolisacárido y una capa de peptidoglicano más fina. Las bacterias Gram-negativas presentan mayores problemas de permeabilidad a ciertos antibióticos que las Gram-positivas; sin embargo muchas bacterias Gram-positivas presentan otros mecanismos de resistencia (esporas) de las cuales carecen las Gram-negativas, y una mayor resistencia a antisépticos. Desde su morfología las bacterias Gram-negativas suelen ser bacilos, comas (*Vibrio*) o espirilos, dentro de las Gram-positivas encontramos cocos y bacilos (Pisabarro, 2009).

Las bacterias que interaccionan con las plantas, de acuerdo al efecto que producen se clasifican en (Glick *et al.*, 1999):

Bacterias benéficas (simbiontes y de vida libre).

Bacterias dañinas (patógenos que atacan a la planta).

Bacterias neutrales.

Mientras la especie *Bacillus megaterium* ha sido clasificada en el reino Procaryote división Bacteria, orden *Cytophagaceae*, Family *Bacillaceae* y género *Bacillus* (Cowan, 1974). De acuerdo con Raikumar *et al.*, (2013), presentan las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas en el Cuadro 1, para la cepa de *B. megaterium* SR28C, así como su descripción de pruebas bioquímicas, se señalan por Munjal *et al.* (2016).

Cuadro 1. Características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de la bacteria *Bacillus megaterium* SR28C.

CARACTERÍSTICA	Bacillus megaterium SR28C
Tinción Gram	+
Morfología celular	Bacilo
Morfología colonial	Redonda, lisa y blanca
Esporas	+
Mótilidad	+
Crecimiento en/sobre	
5°C	-
40 °C	+
6 % Na Cl	+
Oxidasa	-
Catalasa	+
Producción de indol	-
Producción de H₂S	-
Prueba de Voges Proskauer	-
Utilización de	
Arabinosa	+
Manitol	+
Maltosa	+
Glucosa	+
Citrato	+
Butirato	+
Lactato	+
Producción de ácido de	
Glucosa	+
Manitol	+
Xilosa	+
Sorbitol	+
Descarboxilación de ornitina	-
Descarboxilación de Lisina	-
Reducción de nitratos	+
Hidrólisis de	
Caseína	+
Almidón	-
Gelatina	+
Esculina	+

2.3 Aislamiento de *Bacillus megaterium*

En la naturaleza, los microorganismos generalmente se encuentran en poblaciones, formando parte de comunidades de gran complejidad. El aislamiento de bacterias a partir de muestras naturales se realiza, en la mayoría de los casos, mediante la técnica de estría cruzada para producir colonias aisladas en cultivos sólidos y así, obtener un cultivo puro. Cuando la técnica por estría se aplica para aislar un microorganismo de interés a partir de mezclas donde se encuentra en pequeñas cantidades, generalmente se obtendrán las bacterias dominantes. En este caso, se utilizan medios selectivos o de enriquecimiento, los que contienen nutrientes especiales, antibióticos, altas concentraciones de sales y/o condiciones de pH, luz o temperatura que incrementarán la población del microorganismo de interés y así se facilitará su aislamiento (Aquihuatl *et al.*, 2012).

B. megaterium, es una bacteria Gram-positiva ubicua que puede encontrarse en diversos ambientes. Es un organismos modelo para estudiar una diversidad de procesos celulares incluyendo morfología, replicación y esporulación (Fierro-Romero *et al.*, 2016). Así mismo se ha caracterizado por altos niveles de resistencia intrínseca a condiciones hostiles incluyendo 20% de salinidad y exposición de metales (Rajkmur *et al.*, 2013). Cepas de *B. megaterium* MNSH1-9K-1 (con clave de acceso en GenBank KM654562.1), se han utilizado para estos estudios y para su aislamiento, se describe el procedimiento por Isaac G. (Comunicación personal) se emplean medios líquidos para su aislamiento PHGII (Fierro-Romero *et al.*, 2016).

Por otra parte, se ha puesto de manifiesto la necesidad de aislar cepas candidatas como probióticas, entre las cuales se encuentra *B. megaterium* presente en gansos silvestres. Una cepa de ésta fue aislada BHG1.1 a partir de muestra fecal de gansos (Wang *et al.*, 2016).

Así mismo, se ha aislado, identificado y secuenciado el genoma completo de especies de *Bacillus* de tejidos internos de una planta medicinal empleada *Costus igneus* en Puerto

Rico. Dentro de las especies identificadas, se reportó a *B. megaterium* RIT381 (Polter *et al.*, 2015).

De igual forma, se aisló una cepa de bacteria degradante del herbicida quinclorac de raíces de la planta de tabaco cultivada en un suelo contaminado éste producto. El aislado fue identificado como cepa Q3 de *B. megaterium*. Para ello, se lavaron y desinfectaron raíces de plantas de tabaco y 0.3 g de tejido fresco fue molido en agua ultrapura empleando un mortero estéril. Se distribuyó el fluido molido (50 μ L) sobre cajas petri con agar de sales minerales que contenían 20 mgL^{-1} del herbicida. Las colonias que presentaron zonas claras se seleccionaron como degradantes del compuesto (Liu *et al.*, 2014).

2.3.1 Efectos de promoción de crecimiento vegetal.

Los efectos de las bacterias en las plantas se muestran de dos formas:

- Por medio de una acción directa.

En la cual proveen a la planta de nutrimentos sintetizados por las bacterias o la ayudan facilitándola en la captura de nutrientes provenientes del medio. Este tipo de PGPR se considera como biofertilizantes y fitoestimuladores, dentro de las cuales se encuentran las bacterias fijadoras de nitrógeno, las cuales brindan una ayuda al desarrollo de la planta cuando existe poco nitrógeno en el suelo (Glick *et al.*, 1999).

- Por medio de una acción indirecta.

Disminuyen o previenen los efectos negativos de agentes patógenos, estas bacterias que protegen a la planta del ataque de patógenos se le denominan agentes de control biológico (Glick *et al.*, 1999).

Se ha estudiado que las bacterias que promueven el crecimiento de las plantas contienen la enzima I aminociclopropano-I-carboxilato de metilo (ACC) deaminasa la cual

ayuda a facilitar el crecimiento y desarrollo de las plantas por la disminución de los niveles de etileno en la planta ya que alteran la expresión de genes y modulan positivamente el crecimiento de las plantas (Glick *et al.*, 2007).

Algunas especies de *Bacillus*, como *B. subtilis*, producen antibióticos y son consideradas rizobacterias promotoras del crecimiento, debido a que ejercen control biológico sobre algunos patógenos del suelo. Otras especies, como *B. megaterium*, *B. polymyxa* y *B. circulans*, tienen mecanismos para promover el crecimiento de las plantas, diferentes al control de patógenos, como fijación de nitrógeno y solubilización de fosfatos, haciendo más disponibles los nutrientes en la rizosfera, en beneficio de las plantas (Bashan *et al.*, 1996).

2.3.2 Eventos de colonización

La colonización de la raíz comprende la capacidad de las bacterias para establecerse sobre o en la raíz de la planta, para propagarse, sobrevivir y dispersarse a lo largo de la creciente raíz en la presencia de la microflora indígena. Las rizobacterias son considerados como competidores microbianos eficientes en la zona de las raíces (Bakker *et al.*, 2007).

En el suelo existen bacterias que pueden disminuir la concentración de etileno en la planta, mediante la degradación del precursor del etileno, que es el 1-aminociclopropano-1- carboxilato (ACC). Las bacterias llevan a cabo este proceso a través de la deaminasa de ACC, enzima microbiana no presente en tejidos vegetales, que rompe la molécula de ACC y genera productos como: amonía y α - cetobutirato. Las bacterias con actividad de deaminasa de ACC colonizan las raíces y utilizan como fuente de carbono y nitrógeno al ACC, presente tanto en la parte interna de las raíces como en exudados radiculares. El consumo del ACC por las bacterias induce la difusión del ACC hacia afuera de las raíces y provoca que disminuya la concentración interna de ACC, lo que reduce a su vez la concentración de etileno (Glick *et al.*, 1999).

2.4 Los géneros bacterianos

Entre los microorganismos más estudiados permanecen a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*; algunos de los cuales sobreviven en condiciones de estrés (Loredo- Ostil *et al.*, 2004), los cuales son utilizados como control biológico.

La mayoría de los estudios sobre la interacción de estas bacterias con las plantas se han realizado en condiciones in vitro o en invernaderos, sin embargo; aun cuando los beneficios de estas bacterias están documentadas, la información en campo es escasa (Loredo-Ostil *et al.*, 2004).

2.4.1 El género *Bacillus*

El género *Bacillus* incluye a las bacterias Gram positivas, phylum Firmicutes, clase Bacilli, especies con baja relación G+C, capaces de colonizar un amplio rango de ambientes. Unas pocas especies de Bacilos son conocidas como patógenas al hombre. Entre éstas *B. anthracis* y *B. cereus*, que son especies completamente relacionadas (Pueyo *et al.*, 2014). Su secuencia genómica consta de 5.7 Mpb de la cepa tipo ATCC 14581 (Arya *et al.*, 2014). *B. thuringiensis*, una especie patogénica de insectos, también esta relacionada con *B. anthracis* y *B. cereus* (Han *et al.*, 2006). De manera general, el género *Bacillus* no es patogénico al hombre. Esta es una forma contrastante con otros Firmicutes Gram (+), con baja relación G+C pertenecientes al género *Staphylococcus*. Estos son peligrosos al humano por lo general (Pueyo *et al.*, 2014).

B. megaterium BmBP17 libera compuestos volátiles contra diversos patógenos como son: *Phitophthora capsici*, *Pythium myriotylum*, *Athelia rolfsii*, *Gibberella moniliformis*, *Colletotrichum gleosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Magnaporthe oryzae*, *Ralstonia solanacearum* y *Xanthomonas axanopodis pv punicae*. El antimicrobiano que más efecto inhibitorio mostró fue Pirazina, 2-etil-3-metil, seguido de pirazina ,2-etil-; pirazina, 2,5-dimetil y Pirazina, 2-metil, los cuales se pueden emplear para la protección de cultivos (Munjál *et al.*, 2016). Así mismo, se ha reportado una cepa de *B. megaterium* que secreta

una mezcla de lipopéptidos cíclicos con acción inhibitoria contra *Bacillus cereus* (Pueyo *et al.*, 2014).

Por otra parte, se ha reportado la cepa de *B. megaterium* (B69) con potencial biotecnológico por la producción de proteasas y amilasas, mismas que actúan sinérgicamente, generando diversos productos de degradación de sustratos complejos (Saxena y Singh, 2014), por otra parte, la cepa mj1212, tiene potencial por ser solubilizadora de fósforo, con lo que se regula los carbohidratos endógenos y contenido de aminoácido, promoviendo el crecimiento de las plantas de mostaza (Kang *et al.*, 2014).

Se ha reportado que una cepa de *Bacillus* co-productora de una diversidad de lipopéptidos, los cuales representan una referencia para futuras investigaciones, entre estos se encuentra las surfactinas cíclicas, lineales, esperina entre otros (Ma *et al.*, 2016). Así mismo, la cepa de *B. megaterium* BOFC15 ha demostrado potencial para incrementar la tolerancia a sequía, utilizando como modelo a *Arabidopsis thaliana* y su implementación en agricultura sustentable (Zhou *et al.*, 2016).

2.4.1.1 Aislamiento de *Bacillus megaterium*

La cepa de *Bacillus megaterium* fue proporcionada por la maestra en ciencias. María Eduvigis Valdez de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango Campus Gómez Palacios.

En aislamientos se ha obtenido la secuencia de una cepa de *B. megaterium* aislada de gansos silvestres y se considera con aplicación como probiótica y se ha depositado en Genbank con clave LUCO00000000 (Wang *et al.*, 2016). Así mismo, se ha reportado un fago de esta bacteria, siendo un miovirus, el cual consiste de 242 genes y es único si se compara con los fagos reportados en GenBank (Reveille *et al.*, 2016), de igual manera se aisló un podofago Pavlov, el cual infecta acepas de *B. megaterium* industriales PV361

y DSM337, la cepa fue aislada de suelos de College Station en Texas, USA (Burgos *et al.*, 2015).

2.4.1.2 Identificación

Se realizaron pruebas bioquímicas como las indicadas por Munjal *et al.* (2016), que se llevaron a cabo por la Maestra en Ciencias María Eduvigis Valdez de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango campus Gómez Palacios, quien gentilmente nos proporcionó la cepa de *B. megaterium*.

2.4.2 Características metabólicas de interés agronómico

En los últimos años, la ingeniería de plantas que son resistentes a una gran variedad de patógenos, incluyendo virus, bacterias y hongos se ha convertido muy popular. Pero Desafortunadamente esto no es práctico ya que se están diseñando plantas contra todos los patógenos (y otros tipos de estrés) que pudieran encontrarse en el medio ambiente, ya que estos pueden variar de un lugar a otro y de una estación a otra. Alternativamente, uno puede seleccionar bacterias de biocontrol que protegen a las plantas contra una gama de diferentes agentes patógenos (Glick *et al.*, 2007).

2.4.3 Colonización de raíces

La colonización de las raíces es el proceso por el cual las bacterias que sobreviven a la inoculación en las semillas se multiplican en la esfermosfera en respuesta a los exudados de las semillas, se transfieren al sistema radical en vías de desarrollo y logra multiplicarse en las raíces (Beauchamp *et al.*, 1991).

El proceso por el cual las bacterias se mueven hacia la raíz y la colonizan no es muy claro, no obstante, se han encontrado algunos factores que favorecen este proceso como lo son una mayor disponibilidad de carbono, condiciones favorables de humedad

(Herman *et al.*, 1994), tiempo de generación y quimiotaxis y la capacidad de movimiento (Beauchamp *et al.*, 1991).

La quimiotaxis es el movimiento de los microorganismos hacia la raíz en respuesta a un gradiente de concentración de nutrimentos o de otros estímulos producidos por las plantas. La quimiotaxis puede ser una respuesta a sustratos específicos y no específicos de la raíz, así como a los gradientes de dióxido de carbono (Elmerich *et al.*, 1992). Si la cantidad de sustrato producido por los exudados de la raíz de la planta es bastante grande, los organismos que son capaces de utilizar este sustrato serán los cuales obtengan una ventaja competitiva, una vez que el crecimiento microbiano activo comienza alrededor de la raíz, es normal que las sustancias que estos microorganismo requieran se metabolicen (Bowen y Rovira, 1999).

Un factor importante para la movilidad de las bacterias a las raíces es la presencia o ausencia de flagelos, las bacterias de los géneros *Pseudomonas*, *Herbaspirillum* y *Campylobacter* poseen flagelos polares, mientras que *Azotobacter* tiene flagelos periféricos, *Azospirillum* puede presentar flagelos polares o flagelos laterales (Elmerich *et al.*, 1992), las bacterias del género *Bacillus* poseen flagelos peritricos (Koneman, 2001).

2.4.4 Mecanismos promotores de crecimiento vegetal

Según (Glick *et al.*, 1999) existen dos mecanismos utilizados por las bacterias para estimular el crecimiento de las plantas estos son los mecanismos indirectos y directos.

Entre los mecanismos indirectos utilizados son:

- Producción de antibióticos.
- Agotamiento del hierro procedente de la rizosfera.
- Inducción de resistencia sistémica.
- Síntesis de metabolitos antifúngico.
- Producción de enzimas que destruyen la pared celular de los hongos.

- Competencia en la colonización de las raíces y competencia de nutrientes

Entre los mecanismos directos utilizados por las PGPR para estimular el crecimiento de las plantas son:

- Solubilización de fosforo.
- Fijación de nitrógeno atmosférico.
- Captura y solubilización de hierro presente en el suelo por medio de los sideróforos.
- Producción de fitohormonas (auxinas, citoquinina, giberelinas, entre otras).
- Disminución de la producción de etileno.

Algunas especies de *Bacillus*, como *B. subtilis*, producen antibióticos y son considerados rizobacterias promotoras del crecimiento, debido a que ejercen control biológico sobre algunos patógenos del suelo. Otras especies como *B. megaterium*, *B. polymyxa* y *B. circulans*, tienen mecanismos para promover el crecimiento de las plantas (Lugtenberg y Kamilova, 2009).

2.5 Patógenos fúngicos de la Comarca Lagunera

La Laguna es una cuenca que abarca parte de los estados de Durango y Coahuila, México. Se caracteriza por un clima seco desértico con una precipitación anual que oscila dentro de la región entre 80 a 250 mm por año, y una temperatura máxima promedio de 33.7 °C. En La Comarca Lagunera se han establecido cultivos como el nogal (*Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch), algodónero (*Gossypium hirsutum* L.) y alfalfa (*Medicago sativa* L.), desde hace más de 50 años, con un manejo agrícola del suelo que incluye irrigación, fertilización e incorporación de residuos de las cosechas entre los principales hongos destacan *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* como se muestra en el cuadro 2 (Samaniego-Gaxiola et al., 2007).

Cuadro 2. Géneros de hongos registrados en los suelos de la Laguna, Coahuila-Durango, México cuadro tomado de Samaniego-Gaxiola *et al.*, (2007), con modificaciones.

Géneros	No.colonias	Valor índice de importancia
Lugar Tierra Blanca (Cultivo nogal).		
<i>Drechslera</i>	1	2.6
<i>Neocosmospora</i>	1	2.6
<i>Starkeomyces</i>	1	2.6
<i>Humicola</i>	2	2.8
<i>Chaetomium</i>	3	3.0
<i>Phoma</i>	3	3.0
<i>Stachybotrys</i>	6	4.0
<i>Ulocladium</i>	3	4.0
<i>Verticillium</i>	3	4.0
<i>Ascochyta</i>	2	4.9
<i>Curvularia</i>	9	5.0
<i>Scytalidium</i>	8	5.8
<i>Torula</i>	16	7.0
<i>Rhizoctonia</i>	13	7.7
<i>Alternaria</i>	25	7.8
<i>Trichoderma</i>	32	9.6
<i>Rhizopus</i>	63	16.5
<i>Mortierella</i>	65	16.9
<i>Aspergillus</i>	84	17.9
<i>Penicillium</i>	108	21.2
<i>Cladosporium</i>	162	25.9
<i>Glimaniella</i>	342	44.7
<i>Fusarium</i>	623	71.7
El chupón (Cultivo nogal).		
<i>Stachybotris</i>	1	2.3
<i>Verticillium</i>	1	2.3
<i>Scytalidium</i>	3	3.6
<i>Alternaria</i>	5	4.2
<i>Scopulariopsis</i>	14	5.3
<i>Rhizopus</i>	31	8.7
<i>Mucor</i>	87	18.7
<i>Aspergillus</i>	211	25.2
<i>Doratomyces</i>	108	27.1
<i>Penicillium</i>	1605	94.7
<i>Fusarium</i>	1703	98.8
Predio San Jorge (Cultivo Alfalfa).		
<i>Colletotrichum</i>	2	2.9
<i>Curvularia</i>	7	5.5
<i>Trichoderma</i>	14	7.2
<i>Alternaria</i>	17	7.6
<i>Mucor</i>	22	8.7
<i>Doratomyces</i>	7	9.1

<i>Rhizoctonia</i>	107	21.6
<i>Cladosporium</i>	97	21.6
<i>Rhizopus</i>	104	28.2
<i>Aspergillus</i>	357	50.7
<i>Penicillium</i>	471	65.2
<i>Fusarium</i>	576	71.4

2.6 Mecanismos antagónicos para el control de fitopatógenos fúngicos

Las PGPR ayudan indirectamente en el aumento del crecimiento de las plantas mediante la supresión de los fitofármacos mediante la producción de productos químicos que inhiben el crecimiento de patógenos de las plantas, como lo son los sideróforos, los antibióticos, las enzimas líticas y las enzimas detoxificantes son todos ejemplos de compuestos químicos lineales producidos por microbios del suelo (Saraf *et al.*, 2013).

2.6.1 Producción de antibióticos

La producción de uno o más antibióticos es el mecanismo más comúnmente asociado con la capacidad de las bacterias promotoras del crecimiento de las plantas de actuar como agentes antagonistas contra los fitopatógenos (Glick *et al.*, 2007). La base de antibiosis, actividad de biocontrol basada en la secreción de moléculas que matan o reducen el crecimiento del patógeno objetivo, se ha comprendido mejor en las últimas dos décadas (Whipps, 2001). Los antibióticos abarcan un grupo heterogéneo de compuestos orgánicos de bajo peso molecular que son perjudiciales para el crecimiento o actividades metabólicas de otros microorganismos (Duffy *et al.*, 2003).

Según Haas y Défago (2005), existen seis clases de compuestos antibióticos (para los cuales están mejor relacionados con el control biológico de enfermedades de las raíces: fenazinas, floroglucinoles, piroluteorina, pirrolnitrina, lipopéptidos cíclicos (todos ellos difusibles) y cianuro de hidrógeno (HCN, que es volátil). Más recientemente, los biosurfactantes lipopeptídicos producidos por especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* han sido implicados en el biocontrol debido a su potencial efecto positivo en las interacciones

competitivas con organismos, incluyendo bacterias, hongos, oomicetos, Protozoos, nematodos y plantas (Raaijmakers *et al.*, 2010).

2.6.2 Producción de enzimas líticas

Las enzimas líticas son ejemplos de compuestos químicos lineales producidos por microbios del suelo, los cuales degradan muchos compuestos orgánicos incluyendo la quitina (paredes celulares de hongos).

Las enzimas líticas actúan sobre grupos de compuestos químicos particulares, Por ejemplo, glucósidos pepsina y tripsina sobre los enlaces peptídicos y las esterases sobre los ésteres. Un gran número de sustratos pueden ser atacados reduciendo así, el número de enzimas digestivas que de otro modo serían requeridas, este tipo de acción favorece a las bacterias permitiéndoles evadir la respuesta inmune o profundizar más el sitio de acción, lo que hace que la infección se disemine.

2.6.3 Producción de enzimas detoxificantes

Estas enzimas previenen el daño de las toxinas patógenas, además de las enzimas digestivas, muchos patógenos producen enzimas las cuales les permiten detoxificar las sustancias antimicrobianas producidas por la planta, como la saponina glicosil hidrolasa, que degrada las saponinas y la hidratasa del cianuro, que detoxifica este compuesto, entre estos tipos de enzimas esta la catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa.

2.6.4 Producción de sideróforos

En el suelo, la actividad de producción de sideróforos desempeña un papel muy importante en la determinación de la capacidad de diferentes microorganismos para mejorar el desarrollo de la planta.

Los sideróforos microbianos mejoran La absorción de hierro por las plantas que son capaces de reconocer el complejo férrico-sideróforo bacteriano (Dimkpa *et al.*, 2009) y

son importantes en la captación de hierro por las plantas en presencia de otros metales como el níquel y el cadmio (Dimkpa *et al.*, 2008).

Sin embargo, todavía no está claro si los complejos bacterianos de sideróforo pueden contribuir significativamente a los requerimientos de hierro de la planta. Las BPCV que producen sideróforos bajo condiciones de limitación de hierro pueden favorecer el crecimiento de las plantas, suministrando directamente el hierro para que pueda ser asimilado por las plantas y eliminando el hierro circundante en el ambiente para el crecimiento de fitopatógenos reduciendo así su competitividad (Tank *et al.*, 2012), La producción de sideróforos confiere ventajas competitivas a PGPR que pueden colonizar raíces y excluir a otros microorganismos de este nicho ecológico (Haas y Défago, 2005). En condiciones altamente competitivas, la capacidad de adquirir hierro a través de sideróforos puede determinar el resultado de la competencia para diferentes fuentes de carbono disponibles como resultado de la exudación radicular (Crowley, 2006).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación del experimento

El experimento se realizó en el laboratorio de Agroecología ubicada en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna con las coordenadas (24° 22' de Latitud Norte y 102° 22' de Longitud oeste con elevación a 1120 msnm). El clima es semiárido, con una precipitación anual promedio de 224.6 mm y temperatura media anual de 21.11 °C.

3.2 Material biológico

Se empleó la cepa de *Bacillus megaterium* la cual fue proporcionada por la Maestra en Ciencias María Eduviges Valdez de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango campus Gómez Palacios. La cepa fue sembrada en placas con agar nutritivo y mantenidas en incubación a 28°C durante 24-72 horas hasta la aparición de colonias. La cepa del hongo *Fusarium oxysporum* fueron recuperados en agar de papa y dextrosa (PDA) mediante la transferencia de un pequeño fragmento de micelio al medio de cultivo e incubado durante 7 días a una temperatura de 28°C.

3.3. Medios de Cultivo

Agar papa-dextrosa (PDA). Es un medio sólido complejo de uso general para el cultivo de hongos y su composición es como sigue:

Ingredientes	(g/L)
Glucosa	20.0
Extracto de papa	4.0
Agar	15.0
pH	5.6

Agar nutritivo (AN). Es un medio sólido complejo de uso general para el cultivo de bacterias.

Ingredientes	(g/L)
Peptona de caseína	5.0
NaCl	8.0
Extracto de carne	3.0
Agar	15.0
pH	6.5-7.0

- a. Disolver cuidadosamente los ingredientes en el orden indicado y ajustar el pH.
- b. Calentar a ebullición durante 1 minuto.
- c. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Los medios de cultivo deshidratados: agar nutritivo y PDA fueron comprados de marcas comerciales (DIBICO, México). Se prepararon de acuerdo con las especificaciones del fabricante y se esterilizaron en autoclave horizontal (Aesa de 25x50 cm). Pruebas de esterilidad de los medios se llevaron a cabo dejando los matraces con medio por 24-48 h afuera de la campana de flujo laminar (Telstar AH100. Barcelona, España).

3.4. Técnica de estría cruzada para la siembra y selección de cepa (Figura 1)

- A. Dividir cada una de las cajas Petri por la parte de atrás en cuatro cuadrantes. Esterilizar el asa con calor en el mechero.
- B. Dejar enfriar el asa y tomar la muestra de una colonia.
- C. Inocular la muestra haciendo 4 o 5 estrías simples muy juntas de lado a lado sobre el primer cuadrante de la caja, cerrar la caja. Flamear el asa de inoculación y hacer girar la caja Petri un cuarto de vuelta.
- D. Abrir nuevamente la caja y con el asa de siembra esterilizada y fría, tocar la superficie del de estrías recién hechas en un punto alejado del inicio. Hacer un segundo grupo de estrías como en el caso anterior. Realizar el mismo procedimiento en el tercer cuadrante y en el último cuadrante, sin flamear el asa de siembra hará una estría más abierta (simple).
- F. Las cajas con la base hacia arriba se incuban a 35°C durante 24-48 h.

3.5. Siembra en tubos y condiciones de incubación

A. Después de la incubación de los cultivos, seleccionar, de las cajas Petri con AN, la colonia más aislada de cada cepa.

B. Transferir con el asa, previamente esterilizada y fría, una pequeña muestra de la colonia a un tubo de CN.

C. Incubar los tubos a 35°C durante 24-48 h. Observar la aparición de turbidez y proceder a la preparación de frotis para la tinción de Gram.

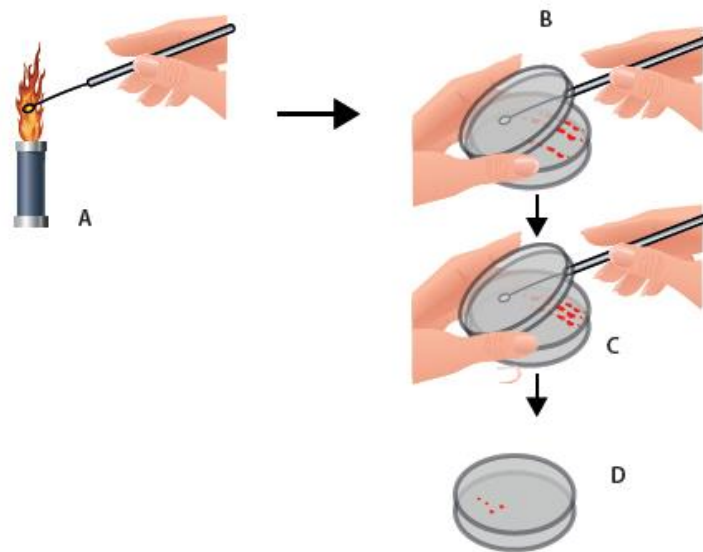


Figura 1. Técnica de siembra bacteriana por estrías en cajas Petri con medio sólido.

3.6. Siembra de hongos filamentosos

1. Para sembrar los hongos filamentosos, se separa una parte de micelio de los hongos proporcionados correspondientes con asa bacteriológica, previamente esterilizada en la flama del mechero.

2. Se coloca el micelio en el centro de una caja de Petri con medio por inoculación por piquete.

3. Se incuban las cajas de Petri en forma invertida, envueltas en papel o en una bolsa de plástico, a 28-30 °C durante 3-5 días.

3.7. Cinética de crecimiento de *Bacillus megaterium*

Se preparará un cultivo de *B. megaterium* en un matraz Erlenmeyer con CN. Este cultivo (matraz A) se utilizará como inóculo.

El crecimiento se cuantificará, midiendo la turbidez del cultivo durante 12 horas de incubación, con toma de muestra cada dos horas.

Preparación de material y medios de cultivo

Se preparó 150 mL de caldo nutritivo en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y se esterilizaron a 1.01 Kg cm² por 15 minutos en un autoclave horizontal.

Inoculación de matraces y tratamiento de muestras (Figura 2)

a. En condiciones asépticas, inocular 10 mL del cultivo de *B. megaterium* (del matraz A) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 150 mL de caldo nutritivo (matraz B).

b. Homogeneizar el cultivo agitando suavemente y tomar de inmediato, con pipeta estéril, 3 mL que se pasan a un tubo de ensaye estéril. Esta muestra corresponde al tiempo cero (t=0).

c. Colocar el matraz B en un agitador orbital a una velocidad de 120 rpm, incubando a la temperatura correspondiente. De la misma forma, se tomarán muestras de 3 mL cada 60 min hasta completar 8 h de incubación.

d. Leer la densidad óptica (D.O.) de cada muestra en un espectrofotómetro ultravioleta visible (Velab, Modelo VE-5600UV) a 400 nm, previamente calibrado con medio de cultivo estéril.

e). Preparar una curva de crecimiento del tiempo de incubación contra la lectura de densidad óptica y elaborar una ecuación de regresión para la confiabilidad de la curva, utilizando el programa de excel y seleccionando la opción de valores logarítmicos.

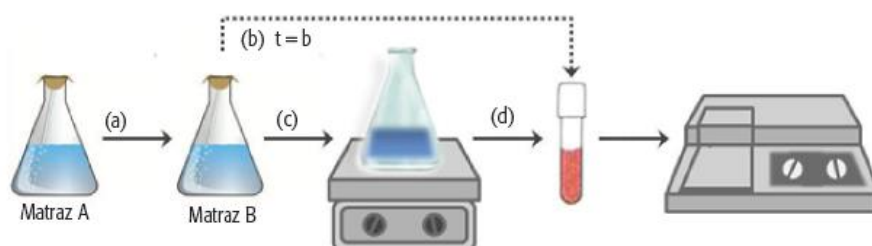


Figura 2. Diagrama para la inoculación y preparación de la curva de crecimiento de *B. megaterium* en caldo de cultivo durante 12 horas.

3.8. Tinción de Gram

Para la confirmación de la bacteria objeto de estudio, se realizó la técnica rápida de cinco minutos de tinción Gram.

Se prepararon tres frotis seco del cultivo en medio líquido, tomar una asada del cultivo y distribuirlo homogéneamente sobre el portaobjeto, dejar secar al aire y fijar por calor durante realizando pases rápidos a través de un mechero de alcohol sin que se sobrecaliente el portaobjeto. Si es medio sólido, se realiza frotis húmedo, se coloca una gota de agua destilada estéril, se flamea el asa bacteriológica, se enfría en el medio sólido y se toma una asada del medio y distribuye homogéneamente sobre el portaobjetos y procede como en medio líquido. Una vez fijado el frotis, se procede a la tinción, utilizando el juego de colorantes de Gram (Sigma®, Gram staining Kit, Cat-77730, USA) colocando con un gotero cristal violeta por un minuto, enjuagar con agua destilada empleando un piceta. Enseguida, se coloca el lugo por un minuto y enjuagar, secar y colocar alcohol decolorante por 10 segundos, enjuagar y finalmente colocar el colorante de contraste Safranina por un minuto, enjuagar y secar al aire. Observar al microscopio óptico (Karl Seiz, Germany), en objetivo de 10 X para fijar el campo y posteriormente

aplicar una gota de aceite de inmersión y observar a 100X utilizando el objetivo de inmersión. Tomar fotografía con teléfono celular para guardar la evidencia.

3.9 Ensayos preliminares

Para la realización de los ensayos preliminares, se utilizó una cepa de *Fusarium oxysporum* identificada gentilmente por el Dr. Vicente Hernández Hernández del departamento de parasitología de la UAAAAN Unidad Regional Laguna, la cual se cultivó en cajas Petri con agar nutritivo (AN) y agar de papa y dextrosa (PDA), para observar en que se desarrollara en ambos medios mejor durante tres días de incubación a temperatura ambiente $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Una vez determinado establecidos el crecimiento del hongo en ambos medios de cultivos, se dispuso a realizar las pruebas de antagonismo con *Bacillus megaterium*, utilizando el AN como medio de cultivo.

Se realizaron tres réplicas con el hongo y con *Bacillus megaterium* y como control se utilizaron tres placas para *F. oxysporum* donde estos se encontraba solamente incubando a $28^\circ\text{C} \pm$ durante tres días, checando su crecimiento cada 12 h.

3.10 Ensayos antagónicos in vitro

Para este trabajo la cepa de la bacteria *B. megaterium* se utilizó de dos maneras la primera en donde con la ayuda de una micropipeta se tomó 100 μl de la bacteria y se extendió en placas con Agar nutritivo (AN), enseguida se hacían diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-9} de esta concentración con agua peptonada de las cuales se extendían en placas con agar nutritivo.

Para las pruebas de antagonismo se hicieron tres repeticiones, todas estas se hicieron en placas con agar nutritivo (AN). Se sembró *B. megaterium* a diferentes concentraciones para evaluar las pruebas se utilizó la cepa de *F. oxysporum*, donde se tenía la caja Petri con agar nutritivo y se le extendía la bacteria con la ayuda de un sacabocado de 3.8 mm

de diámetro se ponía el cultivo del hongo fitopatógeno, se incubo durante 72 h a $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para generar resultados confiables, es necesario que los laboratorios cumplan con los requisitos de ensayo y calibración de sus pruebas, con lo cual demuestran que son técnicamente competentes y que son capaces de producir resultados técnicamente válidos. Para ello, es necesario tomar en cuenta los siguientes conceptos en el desarrollo de cualesquier metodología (NAS, 2016).

Reproducibilidad: La capacidad de un investigador para duplicar los resultados de un estudio previo utilizando los mismos materiales. Un segundo investigador deberá usar los mismos datos crudos para construir los mismos archivos de análisis e implementar los mismos análisis estadísticos, generando los mismos resultados. La reproducibilidad es una condición mínima necesaria para que un hallazgo pueda ser creíble e informativo.

Repetibilidad. (también referida como reproducibilidad empírica), la capacidad de ver los datos, ejecutar códigos y seguir los protocolos especificados y diseñados como se describen en una publicación científica.

Replicabilidad. La capacidad de un investigador para duplicar los resultados de un estudio previo si se siguen los mismo procedimientos, pero nuevos datos son generados.

Robustez. La resistencia de las conclusiones cuantitativas o cualitativas a (ligeros o moderadas) cambios en los procedimientos y supuestos del grupo experimental o analítico.

Reproducibilidad estadística. La noción de cómo la estadística y métodos estadísticos contribuyen a la probabilidad de que un resultado científico sea reproducible y estudiar y medir su reproducibilidad.

Confiabilidad. La confiabilidad se refiere a la confianza que depositamos sobre el instrumento de medición para que nos proporcione un mismo valor numérico, cuando la medición se realiza sobre el mismo objeto.

Validez. La validez significa que el instrumento de medición, realmente mide la propiedad que se supone es para medir. La confiabilidad de un instrumento no garantiza su validez.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de *Bacillus megaterium*

El género *Bacillus* incluye a las bacterias Gram positivas, phylum Firmicutes, clase Bacilli, especies con baja relación G+C, capaces de colonizar un amplio rango de ambientes

(Pueyo et al., 2014) y presenta pruebas características que ya se han señalado en apartados anteriores. De acuerdo con las preparaciones realizadas, se observó que *B. megaterium* tiene forma de una varilla o cadena en forma cilíndrica (Amornrat, 2009), lo que se confirma en nuestros resultados y que se presenta como evidencia la Figura 2.

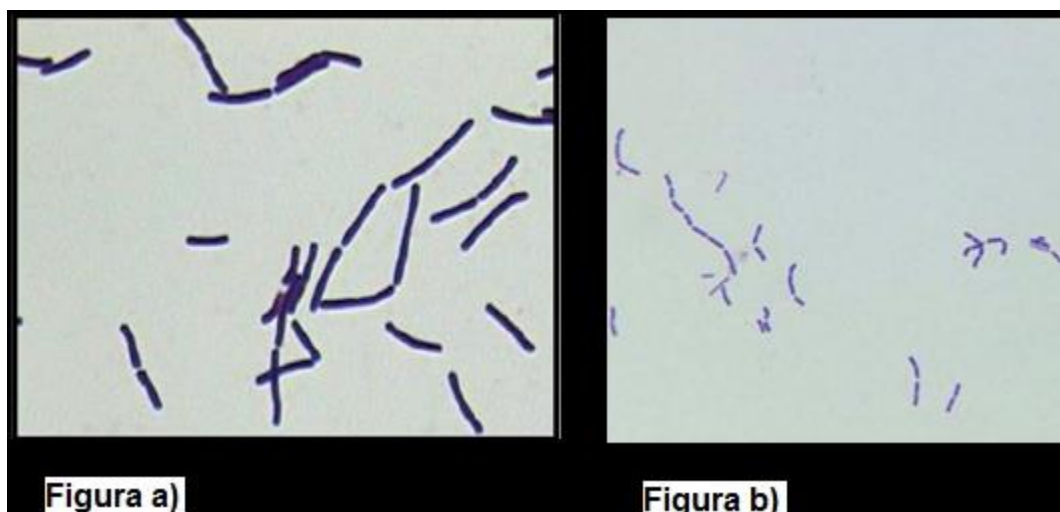


Figura 2. Caracterización de *Bacillus megaterium*, es una bacteria Gram-positiva, figura a en forma de cadenas (Amornrat, 2009) y de barras características (b) resultado del estudio.

4.2. Cinética de crecimiento de *B. megaterium* en caldo nutritivo

La cinética de crecimiento de *B. megaterium* se realizó en caldo nutritivo como medio de cultivo, encontrándose una ecuación de regresión con coeficiente de correlación de $r^2=0.93$, indicando la excelente correlación para el estudio (Figura 3). Este resultado es superior a los resultados de fermentaciones con especies de *Lactobacillus lactis*, los cuales presentan valores de $r^2= 0.772$ (Jurado-Gómez et al., 2015).

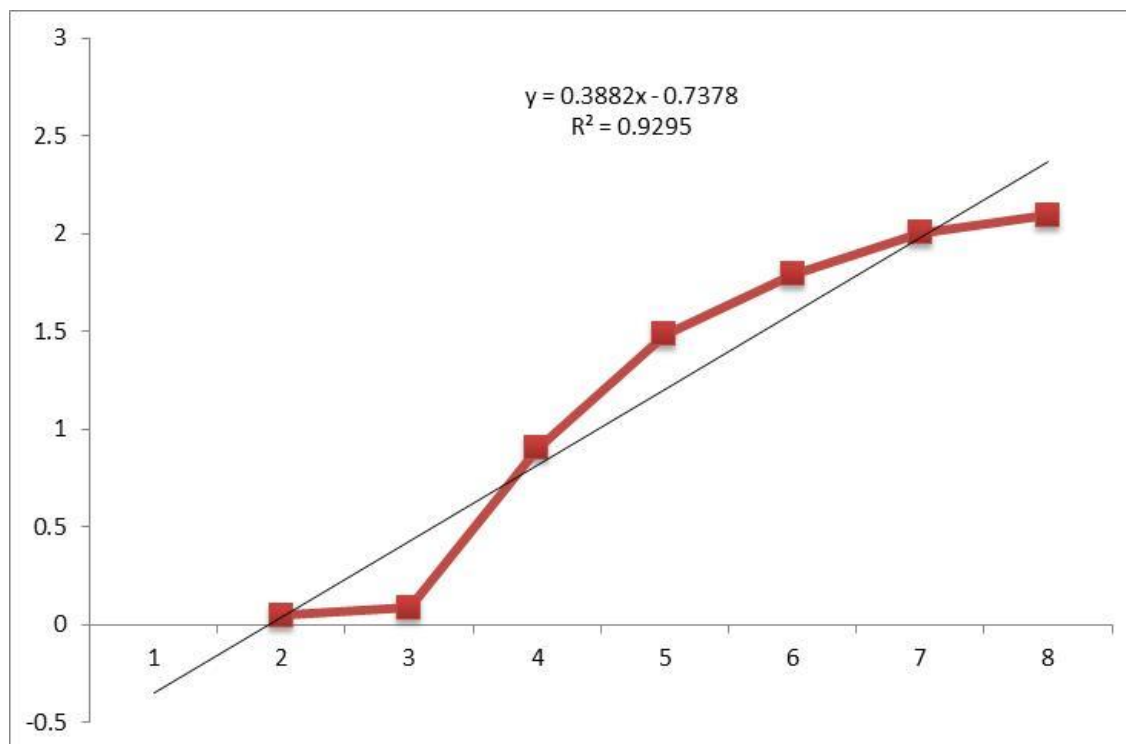


Figura 3. Curva de crecimiento de *Bacillus megaterium*.

4.3 Cinética de crecimiento del *Fusarium oxysporum* en PDA

De la misma manera, se realizó cinética de crecimiento para el hongo *F. Oxysporum*, se utilizó en PDA como medio de cultivo. En la Figura 4, se puede observar la cinética de crecimiento del *F. oxysporum* durante 40 h a una temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Debido al crecimiento radial de los hongos, se realizaron determinaciones longitudinales y transversales, mostrando resultados similares, así mismo se realizó la determinación con cinco repeticiones a fin de reducir errores en las determinaciones.

Así mismo, la cinética del hongo se realizó en el AN y presentó un buen coeficiente de correlación $r^2 = 0.96$, utilizando el modelo de crecimiento exponencial para la realización de la regresión (Figura 5).

De acuerdo con los conceptos señalados al final de la metodología, es importante que se tengan resultados de repetibilidad y reproducibilidad de los resultados y en el estudio, se realizaron cinco repeticiones (Figura 5).

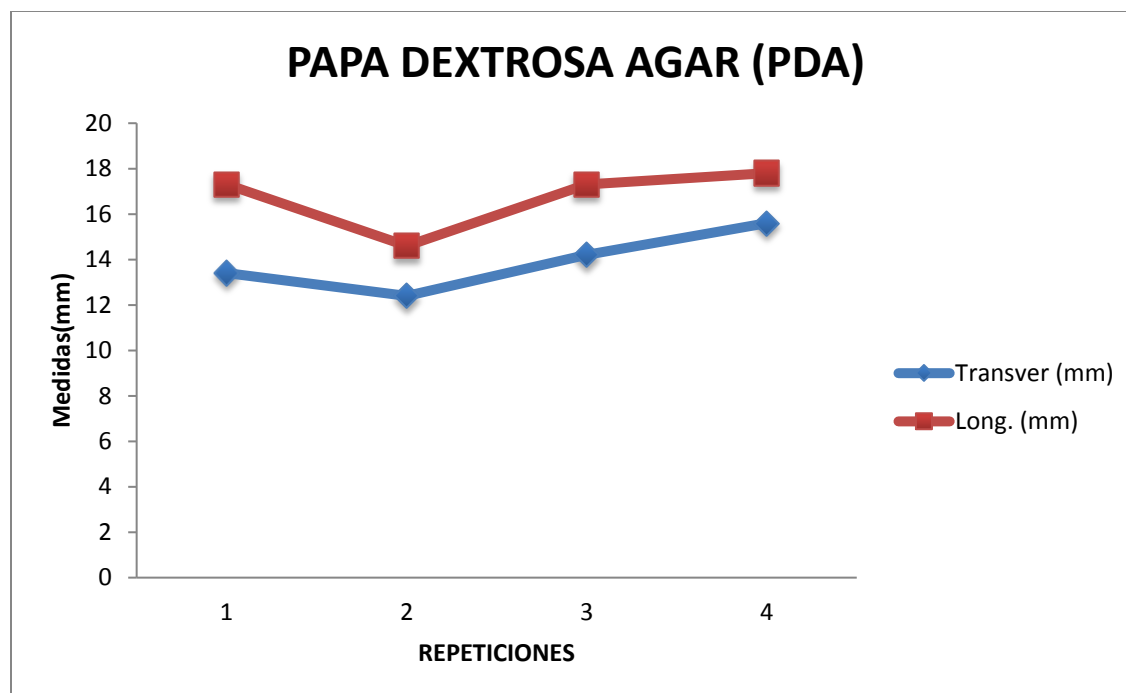


Figura 4. Crecimiento de *F.oxysporum* en PDA.

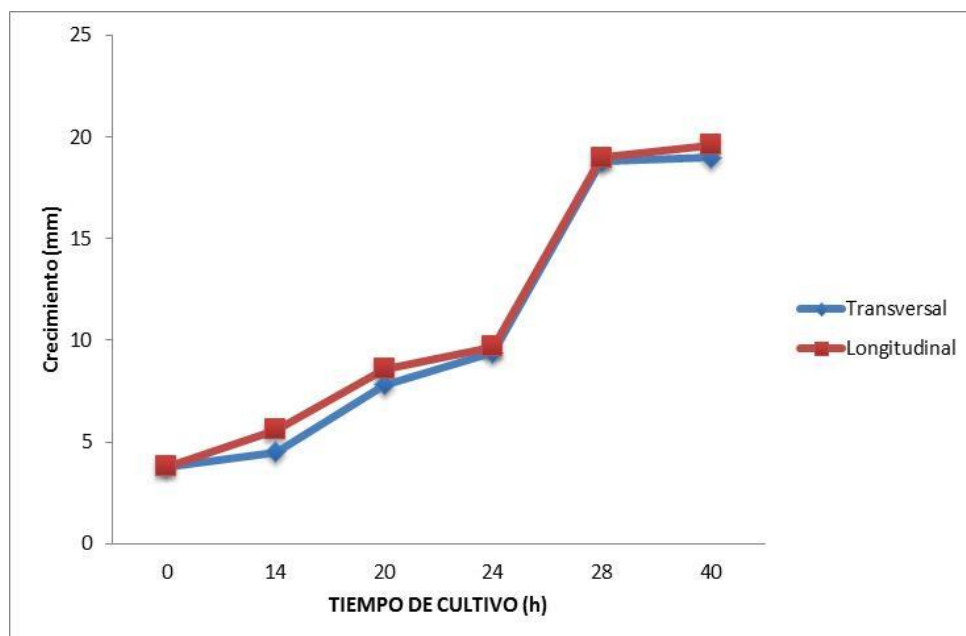


Figura 5. Crecimiento de *F.oxysporum* en Agar nutritivo.

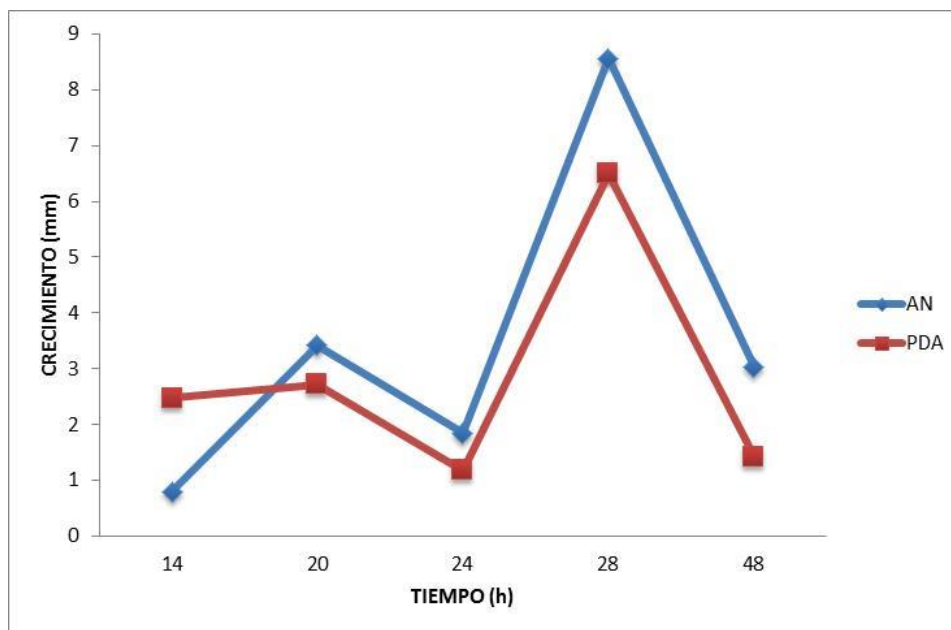


Figura 6. Reproducibilidad y repetitividad del crecimiento de *F. oxysporum* en dos medios (Agar nutritivo y PDA).

Se puede observar claramente que el hongo crece en ambos medios y, los altibajos, se deben a que los valores están representando el crecimiento diario del hongo, restando el valor final del valor anterior, por ello se observa que el máximo crecimiento se da a las 28 h en ambos medios de cultivo y dejan de crecer por falta de espacio a las 48 h, tiempo que duró el experimento en incubación.

4.4 Resultados de antagonismos bacteriano contra *Fusarium oxysporum*

En la literatura, la metodología para seleccionar antagonismo bacteriano contra patógenos de *Fusarium*, se tuvo la necesidad de medir el halo de inhibición (Song et al., 2014), quienes utilizaron especies de *Bacillus* para el control biológico de la pudrición de la raíz de ginseng causado por *Fusarium cf incarnatum*. En nuestro estudio, no hubo necesidad de realizar mediciones, pues la inhibición fue total (Figura 6).

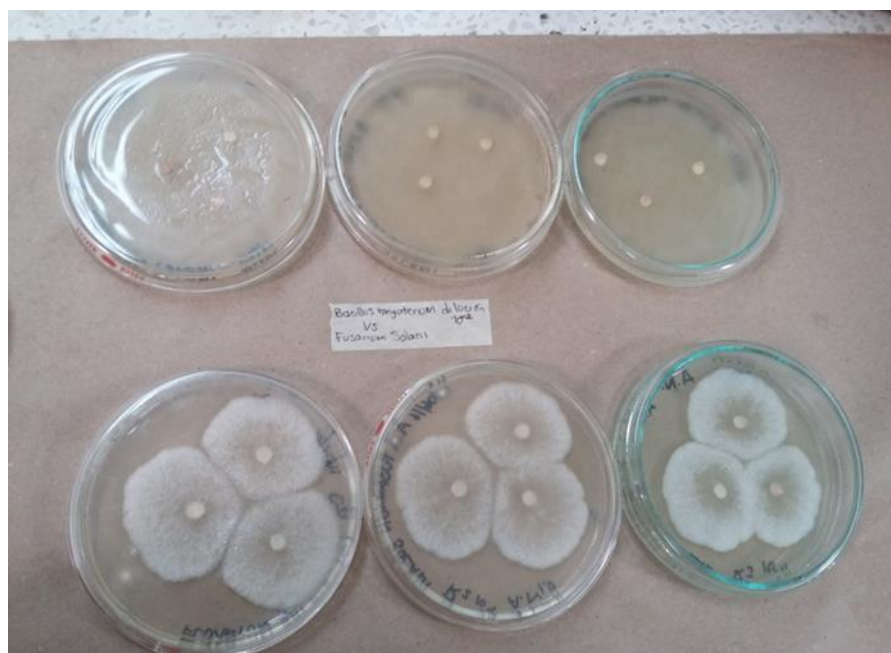


Figura 7. Comprobación de la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* con *B. megaterium* y sin este.

De la misma forma. Se realizaron diluciones decimales bacterianas y se inocularon para conocer la dosis infectiva, encontrándose que a dosis de 10^{-3} , se encuentra efecto inhibitorio (Figura 7).

En la figura 8, se presentan los resultados en lo que se utilizó la mínima densidad óptica ($\lambda=400$ nm) de 0.116 la cual es necesaria para que la bacteria pueda tener el efecto inhibitorio contra *F. oxysporum*. Valores superiores a esta densidad, no se logra obtener la inhibición del crecimiento del hongo. Esto nos demuestra que en las etapas iniciales del crecimiento bacteriano se presenta el efecto inhibitorio de *B. megaterium* contra *F. oxysporum*.

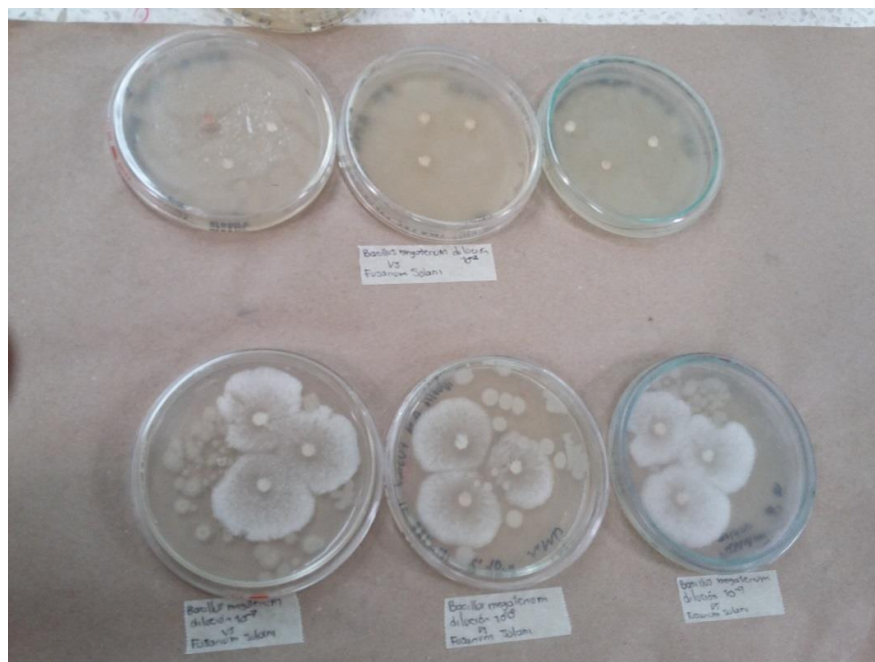


Figura 8. Efecto antagónico de la concentración decimal de *B. megaterium* sobre *F. Oxysporum* utilizando AN como medio de cultivo del hongo. Las cajas petri de la parte duperior, representan la inhibición con dilución 10^{-3} , mientras abajo, son diluciones de 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} .

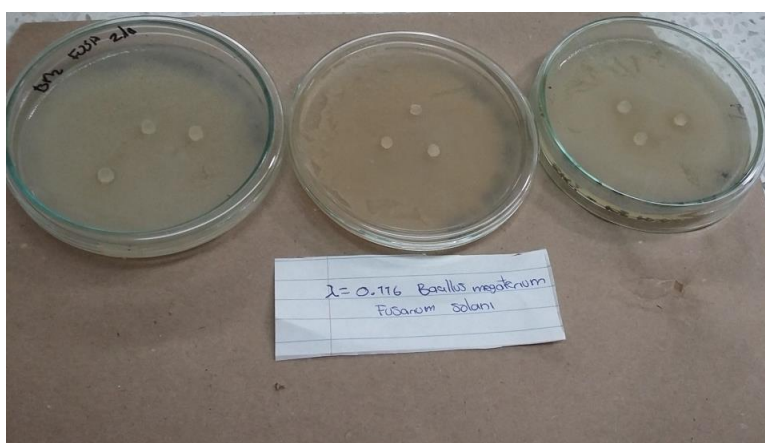


Figura 9. Efecto inhibitoria de la densidad óptica (D.O.= 0.116) de *B. megaterium* sobre el hongo *F. oxysporum*.

5. DISCUSIÓN

El género *Bacillus* incluye a las bacterias Gram positivas, phylum Firmicutes, clase Bacilli, especies con baja relación G+C, capaces de colonizar un amplio rango de ambientes. Unas pocas especies de Bacilos son conocidas como patógenas al hombre. Entre éstas *B. anthracis* y *B. cereus*, que son especies completamente relacionadas (Pueyo *et al.*, 2014). En el caso de *Bacillus megaterium*, es una bacteria que no es patógena al hombre y representa un microorganismos potencial de explotación biotecnológica en el control de enfermedades y como promotor de crecimiento vegetal.

Por otro lado las especies de *Fusarium* se encuentran en grandes cantidades en el suelo y estos parásitos no especializados tienen una gran variedad de huéspedes que pueden causar enfermedades en plantas y humanos, mientras tanto las especies de *Bacillus* se encuentran generalmente en diversos entornos naturales de suelo, agua y aire y tienen efectos antifúngico contra varios tipos de hongos patógenos de plantas (Zhang *et al.*, 2009), también muestran capacidad de control para la pudrición de las raíces y la fiebre *Phytophthora del ginseng* causada por *Cylindrocarpon destructans*, (Kim, 2004), otros estudios han reportado especies de *Bacillus* que controlan a hongos como *Pyricularia grisea* y *Curvularia* sp en el cultivo de arroz (Tejera *et al.*, 2012).

En nuestro estudio, un aislamiento bacteriano identificado como *B. megaterium* tenía una fuerte actividad antagonista contra el hongo *Fusarium oxysporum* presente en gran parte de los cultivos de la Laguna, lo cual que confirma las propiedades del género *Bacillus*.

6. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo demuestran el potencial de *B. megaterium* como un controlador biológico, inhibiendo el crecimiento de *F. oxysporum* en condiciones in vitro así como también se han demostrado en otros trabajos el efecto de antagonismo con otros hongos como *Pyricularia grisea* y *Curvularia* sp en el cultivo de arroz.

Cabe resaltar que para que *B. megaterium* demuestre esta inhibición se debe tener una densidad óptica ($\lambda=400$ nm) de 0.116 la cual es necesaria para que la bacteria pueda tener el efecto inhibitorio contra *F. Oxysporum*, destacándose que este hongo es uno de los importantes en la Comarca Lagunera en los cultivos de alfalfa y nogal.

Por ello se debe de profundizar el conocimiento que tiene las interacciones que se desarrollan en los suelos agrícolas, permitiendo así un manejo más eficiente de los sistemas, y así tener una alternativa como biofertilizantes para los diferentes cultivos y producción de una agricultura sustentable, disminuyendo el impacto sobre el medio ambiente como al igual del uso excesivo de fertilizantes químicos por la fertilización bacteriana.

REFERENCIAS

- Alavi, P., M. R. Starcher, C. Zachow, H. Muller y G. Berg 2013. "Root-microbesystems: the effect and mode of interaction of stress protecting agent (SPA) *Stenotrophomonas rhizophila* DSM14405 (T)." *Frontiers in Plant Science* 4: 141.
- Amornrat, C. M. 2009. Development of *Bacillus megaterium* formulations for suppression of rice sheath blight disease and study of mechanisms of biocontrol. Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla Doctor en Filosofía en Ciencias Farmaceuticas. 196.
- Aquihuatl, R. M. d. I. A., S. T. Volke, B. L. A. Prado, M. K. Shirai, V. F. Ramírez y G. M. Salazar 2012. Manual de prácticas de laboratorio Microbiología general. U. A. M. u. Iztapalapa. México.
- Arya, G., N. Petronella, J. Crosthwait, C. D. Carrillo y P. S. Shwed 2014. "Draft Genome Sequence of *Bacillus megaterium* Type Strain ATCC 14581." *Genome Announc* 2.
- Bashan, Y., G. Holguín y R. Ferrera-Cerrato. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. II. Bacterias asociativas de la rizosfera. *Terra* 14: 195-210.
- Bashan Y. 1998. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol. Adv.* 16: 729–770.
- Bakker, P., M. Raaijmakers Jos, V. Bloemberg Guido, M. Höfte, P. Lemanceau y M. Cooke 2007. "New perspectives and approaches in plant growth-promoting rhizobacteria research " *Eur J Plant Pathol*: 241-242.
- Beachamp, C., J. P. Dion, J.W., Kloepper and H. Antoun. 1991. Physiological characterization of opine-utilizing rhizobacteria for traits related to plant growth-promoting activity. *Plant Soil*. 132:273-279.
- Bowen, G. D y A. D. Rovira. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in agronomy*.66:102.
- Burgos, R. W., S. J. Mash, J. L. Cahill, E. S. Rasche y G. F. Kutty Everett 2015. "Complete Genome Sequence of *Bacillus megaterium* Podophage Pavlov." *Genome Announc* 3.
- Cohn, F. 1137s. Untersuchungen tiber Bacterien. Beiträge zur Biologie der Pflanzem, Vol. 1, pages 127-222.
- Cowan, S. T. 1974. Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria, 2nd ed., Cambridge.

- Drews, G. 2000. "The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century." *FEMS Microbiol Rev* 24: 225-49.
- Dimkpa C, Svatos A, Merten D, Büchel G and Kothe E (2008) Hydroxamate siderophores produced by *Streptomyces acidiscabies* E13 bind nickel and promote growth in cowpea (*Vigna unguiculata* L.) under nickel stress. *Can J Microbiol* 54:163-172.
- Dimkpa CO, Merten D, Svatos A, Büchel G and Kothe E (2009) Siderophores mediate reduced and increased uptake of cadmium by *Streptomyces tendae* F4 and sunflower (*Helianthus annuus*), respectively. *J Appl Microbiol* 107:1687-1696.
- Duffy, B., A. Schouten, and J. M. Raaijmakers. 2003. Pathogen self defense: Mechanisms.
- Elmerich, C., W. Zimmer y C. Vieille. 1992. Associative nitrogen fixing bacteria. pp. 212-258. In: Stacey, G., R.H. Burris y H.J. Evans (eds.). *Biological nitrogen fixation*. Chapman and Hall. New York
- Fierro Romero, G., Rivas Castillo, A., Gomez Ramirez, M., Pless, R. y Rojas Avelizapa, N., 2016. Expression Analysis of Ni- and V-Associated Resistance Genes in a *Bacillus megaterium* Strain Isolated from a Mining Site. *Curr Microbiol*.
- Glick, B. R. 2012. "Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications." *Scientifica* 15.
- Glick, B. R., C. Patten, G. Holguin y D. Penrose 1999. "Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria." Imperial College Press: 280.
- Glick, B. R., Z. Cheng, J. Czarny y J. Duan 2007. "Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria." *Eur J Plant Pathol*: 329-339.
- González, R., J. Montealegre, R Herrera, 2004. Control biológico de *Fusarium solani* en tomate mediante el empleo de los bioantagonistas *Paenibacillus lentimorbus* y *Trichoderma* spp. *Ciencia e Investigación Agraria* 31: 21-28.
- Han CS1, Xie G, Challacombe JF, Altherr MR, Bhotika SS, Brown N, Bruce D, Campbell CS, Campbell ML, Chen J, Chertkov O, Cleland C, Dimitrijevic M, Doggett NA, Fawcett JJ, Glavina T, Goodwin LA, Green LD, Hill KK, Hitchcock P, Jackson PJ, Keim P, Kewalramani AR, Longmire J, Lucas S, Malfatti S, McMurry K, Meincke LJ, Misra M, Moseman BL, Mundt M, Munk AC, Okinaka RT, Parson-Quintana B, Reilly LP, Richardson P, Robinson DL, Rubin E, Saunders E, Tapia R, Tesmer JG, Thayer N, Thompson LS, Tice H, Ticknor LO, Wills PL, Brettin TS, Gilna P. 2006.

- Pathogenomic sequence analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolates closely related to *Bacillus anthracis*. *J Bacteriol.* 188 (9):3382-90.
- Haas, D. y G. Defago. 2005. "Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads." *Nat Rev Micro* 3: 307-319.
- Herman, R.P., K.R. Provencio, R.J. Torrez y G.M. Seager. 1994. Seasonal and spatial population dynamics of the nitrogen-efficient guild in a desert bajada grassland. *Applied Environ. Microbiol.* 60: 1160-1165
- Holguin, G., Vazquez, P., and Bashan, Y. 2001. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of the mangrove ecosystems: an overview. *Biol. Fertil. Soils* 33: 265-278.
- Jímenez, R., G. Virgen, S. Tabares y V. Olalde 2001. "Bacterias promotoras del crecimiento vegetal agro-biotecnología " *Avance y perspectiva* 20: 395-400.
- Kang, S. M., R. Radhakrishnan, Y. H. You, G. J. Joo, I. J. Lee, K. E. Lee y J. H. Kim 2014. "Phosphate Solubilizing *Bacillus megaterium* mj1212 Regulates Endogenous Plant Carbohydrates and Amino Acids Contents to Promote Mustard Plant Growth." *Indian J Microbiol* 54: 427-33.
- Kim CH. *Bacillus* spp. as biocontrol agents of root rot and phytophthora blight on ginseng. *Plant Pathol J* 2004;20:63e6.
- Kilian, M., U. Steiner, B. Krebs, H. JUnge, G. Schmiedeknecht y R. Hain 2000. "FZB24 *Bacillus subtilis*-mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality." *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*: 72-93.
- Koneman, E. W. 2001. Diagnóstico microbiológico: Texto y atlas de color. Quinta Edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana. Loos, C. A. (1961). Eradication of the burrowing nematode.
- Laslo É, GyÖgy É. Mara G. Tamás É, Abrahám B, Lányi S. 2012. Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop Prot* 40:43-48.
- Liu, M., Luo, K., Wang, Y., Zeng, A., Zhou, X., Luo, F. y Bai, L., 2014. Isolation, identification and characteristics of an endophytic quinclorac degrading bacterium *Bacillus megaterium* Q3. *PLoS One* 9, e108012.
- Loredo-Ostil, C., L. López-Reyes y D. Espinosa-Victoria 2004. "Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas." *Terra Latinoamericana* Vol 22: 225-239.

- Lugtenberg, B. y F. Kamilova 2009. "Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria." *Annu. Rev. Microbiol* 63: 541-560.
- Ma, Y., Q. Kong, C. Qin, Y. Chen, Y. Chen, R. Lv y G. Zhou 2016. "Identification of lipopeptides in *Bacillus megaterium* by two-step ultrafiltration and LC-ESI-MS/MS." *AMB Express* 6: 79.
- Munjal, V., A. V. Nadakkakath, N. Sheoran, A. Kundu, V. Venugopal, K. Subaharan, S. Rajamma, S. J. Eapen y A. Kumar 2016. "Genotyping and identification of broad spectrum antimicrobial volatiles in black pepper root endophytic biocontrol agent, *Bacillus megaterium* BP17." *Biol. Control* 92: 66-76.
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2016. Statistical changes in assessing and fostering the reproducibility of science results: Summary of a workshop. Washington, D.C. The National Academic Press. doi.10.17226/21915
- Pérez, M y M. Mota. 2000. *Morfología y estructura bacteriana*.
- Pisabarro, A. 2009. *Microbiología clínica 1 curso de diplomatura en enfermería. Producción Agraria*. Pamplona, Universidad Pública de Navarra.142.
- Polter, S.J., Caraballo, A.A., Lee, Y.P., Eng, W.W., Gan, H.M., Wheatley, M.S., Savka M.A., Thomas, B.N. y Hudson, A.O., 2015. Isolation, Identification, Whole Genome Sequencing, and Annotation of Four *Bacillus* Species, *B. anthracis* RIT375, *B. circulans* RIT379, *B. altitudinis* RIT380, and *B. megaterium* RIT381, from Internal Stem Tissue of the Insulin Plant *Costus igneus*. *Genome Announc* 3.
- Pueyo, M. T., B. A. Mutafci, M. A. Soto-Arriaza, P. Di Mascio y A. M. Carmona-Ribeiro 2014. "The self-assembly of a cyclic lipopeptides mixture secreted by a *B. megaterium* strain and its implications on activity against a sensitive *Bacillus* species." *PLoS One* 9: e97261.
- Raaijmakers, J. M., De Bruijn, I., Nybroe, O., and Ongena, M. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1037–1062.
- Rajkumar, M., Ma, Y. y Freitas, H., 2013. Improvement of Ni phytostabilization by inoculation of Ni resistant *Bacillus megaterium* SR28C. *J Environ Manage* 128, 973-980.
- Reveille, A. M., K. A. Eldridge y L. M. Temple 2016. "Complete Genome Sequence of *Bacillus megaterium* Bacteriophage Eldridge." *Genome Announc* 4.

- Samaniego-Gaxiola, J. A. y Y. Chew-Madinaveitia 2007. "Diversidad de géneros de hongos del suelo en tres campos con diferente condición agrícola en la Laguna, México." *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78: 383-390.
- Saraf, M., U. Pandya y A. Thakkar 2014. "Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens." *Microbiological research* 18-29.
- Saxena, R. y R. Singh 2014. "Contemporaneous Production of Amylase and Protease through CCD Response Surface Methodology by Newly Isolated *Bacillus megaterium* Strain B69." *Enzyme Res* 2014: 601046.
- Song, M., Y. H. Young y K. Y. Ho 2014. "Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium cf. incarnatum*." *Ginseng Research* 38: 136-145.
- Tank, N., N. Rajendran, B. Patel y M. Saraf 2012. "Evaluation and biochemical characterization of a distinctive pyoverdine from a *Pseudomonas* isolated from chickpea rhizosphere. ." *Brazilian Journal of Microbiology*: 639-648.
- Tejera N, Boeglin WE, Susuki T, Schneider C. 2012 dependent and independent biosynthesis of dihydroxy arachidonic acids in activated human. *53*:87-94.
- Van Peer, R., Niemann, G.N. y Schippers, B., 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt in carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734.
- Wang, W., S. S. Zheng, H. Sun, J. Cao, F. Yang, X. L. Wang y L. X. Li 2016. "Draft Genome Sequence of *Bacillus megaterium* BHG1.1, a Strain Isolated from Bar-Headed Goose (*Anser indicus*) Feces on the Qinghai-Tibet Plateau." *Genome Announc* 4.
- Whipps, M. J. 2000. "Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere." *journal of experimental botany* 52: 487-511.
- Zang, J.X. A. G. Xue y J.T. Tambong. 2009. Evaluation of seed and soil treatments with novel *Bacillus subtilis* strains for control of soybean root rot caused by *Fusarium oxysporum* and *F. graminearum*
- Zhou, C., Z. Ma, L. Zhu, X. Xiao, Y. Xie, J. Zhu y J. Wang 2016. "Rhizobacterial Strain *Bacillus megaterium* BOFC15 Induces Cellular Polyamine Changes that Improve Plant Growth and Drought .