



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
INHIBITORIA DE *Streptomyces*
TOLERANTES A GLIFOSATO,
CONTRA *Pectobacterium carotovorum*
y *Pseudomonas*
*syringae***

FECHA: FEBRERO DE 2026

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA: DAMARIZ FLORES CASTRO

DIRECTOR

D. C. ZAHAED EVANGELISTA MARTINEZ
LABORATORIO DE BIOPROCESOS
CIATEJ SUBSEDE SURESTE

CO-DIRECTORA

D. C. VIRIDIANA VARGAS CASTRO
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA-ALIMENTOS
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS-BUAP

Tabla de contenido

I.	INTRODUCCIÓN	3
II.	ANTECEDENTES.....	4
III.	JUSTIFICACIÓN	7
IV.	OBJETIVO GENERAL.....	8
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
V.	MARCO TEÓRICO	9
	PATÓGENOS VEGETALES	9
	SUSCEPTIBILIDAD DE LAS PLANTAS A LOS MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS POR EL USO CONTINUO DE LOS AGROQUÍMICOS EN LOS CAMPOS DE CULTIVO	13
	ACTINOBACTERIAS	16
VI.	HIPÓTESIS	21
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS	22
	1. REACTIVACIÓN DE ESTREPTOMICETOS CONSERVADOS EN CONGELACIÓN.....	23
	2. RESELECCIÓN DE ESTREPTOMICETOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN	24
	3. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EBs CONTRA <i>Pectobacterium</i> <i>carotovorum</i> Y <i>Pseudomonas syringae</i>	27
	4. CARACTERIZACIÓN DEL EB PRODUCIDO POR <i>Streptomyces</i> sp G63 ..	28
	5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO	30
	6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	31
VIII.	ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32
	1. REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Streptomyces</i> TOLERANTES A GLIFOSATO	32
	2. BUSQUEDA DE CEPAS PRODUCTORAS DE METABOLITOS ANTIBACTERIANOS	33
	3. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ACTIVOS DE LA CEPA G63	36
	4. CARACTERIZACIÓN	41
	5. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE LAS CEPAS REACTIVADAS	52
IX.	CONCLUSIÓN.....	58
X.	PERSPECTIVAS	59
XI.	ANEXOS.....	60

DEFINICIONES.....	64
XII. BIBLIOGRAFÍA.....	65

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la agricultura es uno de los pilares para sostener la necesidad básica de alimentación, así como para el desarrollo económico de muchos países agroindustriales. Sin embargo, esta práctica se ve limitada o disminuida principalmente por patógenos causantes de enfermedades (fitopatógenos), las cuales son combatidas tradicionalmente por métodos químicos que, además de presentar residualidad y toxicidad en el ambiente, afectan la salud humana y generan resistencia de los agentes patógenos tras su uso excesivo. Dicha resistencia provoca el aumento en la dosificación y, por lo tanto, el alza gradual en los costos de producción de alimentos (Ríos et al., 2021; Santra & Banerjee, 2025).

Las infecciones bacterianas impactan sustancialmente la sostenibilidad de las prácticas agrícolas en todo el mundo, lo que puede conducir a consecuencias negativas (Khan et al., 2023). De las bacterias fitopatógenas conocidas, cerca del 95% son del grupo de las gramnegativas y sólo el 5% pertenecen a las bacterias grampositivas (Khan et al., 2023). Uno de los aspectos muy relacionado con el proceso de infección bacteriana en plantas, lo constituye el sistema de comunicación mediante *quorum sensing* (QS), sistema mediado por acil homoserina lactonas (AHL) que participan en regular la expresión de factores de virulencia que permiten establecer interacciones con el huésped y que aparezcan los síntomas de la enfermedad (Anandan & Vittal, 2025).

Pectobacterium carotovorum (Pcc) es uno de los patógenos más importantes de los tubérculos, en especial de la papa, porque genera pérdidas económicas que han sido estimadas entre 50 y 100 millones de dólares anuales a nivel mundial. Adicionalmente, puede ser patógeno de hortalizas de las cuales causa pérdidas de entre el 15 y 30% de las cosechas (Anandan & Vittal, 2025). La bacteria se encuentra naturalmente en el suelo y puede sobrevivir en él de dos semanas a seis meses, dependiendo de condiciones ambientales como la humedad, el pH y la temperatura; este último factor puede determinar qué tipo de organismo predomina en una lesión (Chandrashekar et al., 2022; Guerrero et al., 2021). De manera similar, *Pseudomonas syringae* es un patógeno vegetal capaz de causar grandes pérdidas económicas por causar la enfermedad del tizón bacteriano en plantas ornamentales y en plantas importantes en la agricultura como el jitomate, el kiwi y varias leguminosas, en las cuales provoca muerte celular con colapso tisular (Grenz et al., 2024). Otros de los síntomas que causa *P. syringae* son los añublos florales, brotes latentes muertos, manchas foliares necróticas, venas y pecíolos foliares decolorados y/o ennegrecidos, manchas y ampollas en el fruto, muerte regresiva de las puntas de los brotes y canchros del tallo (Córdova et al., 2023).

II. ANTECEDENTES

Los crecientes problemas de calentamiento global, la interferencia antropogénica, la introducción de variedades de alto rendimiento y la aplicación de agroquímicos (fertilizantes, pesticidas, herbicidas) han provocado la disminución de la productividad agrícola y estrés biótico causado por hongos y bacterias patógenas (Santra & Banerjee, 2025).

Los microorganismos fitopatógenos tienen impactos perjudiciales en la producción de cultivos, así como en la estabilidad económica y política de los países. Actualmente se busca reemplazar el uso de antibióticos debido a la creciente preocupación de inducción de la propagación de genes de resistencia a los antibióticos (Nguyen et al., 2024).

Las *Actinobacterias* son un filo bacteriano que se estudia de manera activa para el control biológico debido a que estas bacterias que se han encontrado en agua, suelos y ambientes extremos con alta salinidad, con hiperacidez, zonas volcánicas, etc., han sido reportadas como endófitas en diversos taxones de plantas (Santra & Banerjee, 2025)., además el género *Streptomyces* es conocido por su producción de una diversidad de metabolitos de uso farmacéutico (Jahan et al., 2025).

En estudios realizados por Evangelista-Martínez et al. (2022), se evidencia que ciertas especies de *Streptomyces* son capaces de producir moléculas térmicamente estables, que pueden inhibir el crecimiento de bacterias y hongos patógenos para el ser humano, así como para las plantas. En dicho estudio se demostró que los metabolitos de la cepa CACIS-1.16CA tiene efectos inhibidores contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus pumilus* y *Pectobacterium carotovorum*. Vale la pena resaltar que, en otra evaluación, el exudado líquido producido y acumulado en las colonias de *Streptomyces* sp. AGS-58 tuvo un efecto inhibitor en la germinación de esporas de *Colletotrichum* spp., además de ejercer un efecto protector sobre los frutos de mango Ataulfo, controlando el daño causado por *L. theobromae* (Evangelista-Martínez et al., 2022).

De manera similar se demostró la eficacia de cepas de *Streptomyces* spp. como agentes de biocontrol *in vitro* e *in planta* contra *Pectobacterium carotovorum* (Maenaka et al., 2020), la cepa *Streptomyces rochei* aislada de aguas marinas, inhibió el crecimiento de *Ralstonia solanacearum*, *Pectobacterium carotovorum* y *Pectobacterium atrosepticum* e identificaron el compuesto bioactivo como ácido palmítico mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Elhalag et al., 2025).

El estudio de Thakur & Yadav (2023), demostró que la cepa de *Streptomyces* sp. AB-11 termotolerante y halotolerante, es productora de sideróforos que aumentan el peso fresco, el contenido relativo de agua, el número de brotes, la ramificación

de la raíz y el número de pelos radicales de las plántulas de garbanzo y es un prometedor agente de biocontrol contra los patógenos de las plantas *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas campestris*. Las actinomicinas X₂ y D de *Streptomyces* sp. RM-32 inhiben la producción de pioverdina en *Pseudomonas chirorii*, la cual es responsable de la adquisición de hierro y la virulencia de diversas especies de *Pseudomonas* (Maenaka et al., 2020).

Cassanelli et al. (2024) introduce un enfoque poco convencional al estudiar las adaptaciones de *Streptomyces* presentes en la filosfera del tomate para activar el sistema de defensa de la planta a nivel transcripcional para la defensa contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

Además, se ha registrado la efectividad de especies de *Streptomyces* para el biocontrol de diversos patógenos vegetales (ver cuadro 1). Por ejemplo, la cepa *Streptomyces* sp. JCK-8055 es efectivo para controlar el marchitamiento bacteriano del tomate y el fuego bacteriano del manzano producido por *E. amylovora* debido a la producción de aureotricina y tiolutina (Nguyen et al., 2024); la cepa de *Streptomyces* sp. reportada por Rashid et al. (2025) demostró la efectividad para controlar a *Colletotrichum acutatum*, demostrando su capacidad de hacer simbiosis con microorganismos no relacionados, en este caso el hongo no toxigénico *Aspergillus fumigatus* para inhibir en un 100% al patógeno vegetal y la cepa *Streptomyces lateritius* se presentó como un agente de biocontrol contra *Phytophthora sojae*, además de secretar proteasas, celulasas y sideróforos (Liu et al., 2025).

Cuadro 1. Antibióticos producidos por cepas de *Streptomyces*, utilizados en el tratamiento de enfermedades causadas por patógenos vegetales. Tomado de (Harir et al., 2018)

<i>Enfermedad</i>	<i>Cepa de Streptomyces</i>	<i>Antibiótico producido</i>
<i>Mancha de trigo</i>	<i>S. malaysiensis</i>	Malayamicina
<i>Enfermedades de la raíz del espárrago</i>	<i>S. griseus</i>	Faeriefungin
<i>Amplia gama de enfermedades de las plantas</i>	<i>S. griseochromogenes</i>	Blasticidina S
<i>Roya parda del trigo</i>	<i>S. hygrosopicus</i>	Gopalamicina
<i>El marchitamiento de la col</i>	<i>S. padanus</i>	Fungicromina

<i>Enfermedad de las plántulas de pasto</i>	<i>S. violaceusniger</i> YCED9	Nigericina y guanidilfungina A
<i>Tizón del pimiento por Phytophthora</i>	<i>S. humidus</i>	Ácido fenilacético
<i>Tizón del pimiento por Phytophthora</i>	<i>S. violaceusniger</i>	Tubercidina
<i>Sarna de la patata</i>	<i>S. melanosporofaciens</i> EF-76 y FP-54	Geldanamicina
<i>Mildiú polvoroso</i>	<i>Streptoverticillium rimofaciens</i>	Mildiomicina
<i>Mildiú polvoroso del pepino</i>	<i>Streptomyces</i> sp. KNF2047	Neopeptina A y B
<i>Enfermedad del tizón del arroz</i>	<i>S. kasugaensis</i>	Kasugamicina
<i>Tizón de la vaina del arroz</i>	<i>S. cacaoi</i> var. <i>asoensis</i>	Polioxina B y D
<i>Podredumbre de la raíz del guisante geldanus</i>	<i>S. hygrosopicus</i>	Geldanamicina
<i>Tizón de la vaina del arroz</i>	<i>S. hygrosopicus</i> var. <i>Limoneus</i> N.º T-7545	Validamicina

Si bien, la investigación sobre *Streptomyces* se ha enfocado en el biocontrol de enfermedades del suelo debido a su función como colonizador del suelo, la presencia en la filosfera es rara vez estudiada y permite el estudio para su uso en la protección de los cultivos de patógenos aéreos (Cassanelli et al., 2024).

Aunado a esto, de acuerdo con el análisis metagenómico realizado por Gangola et al. (2023), el género *Actinobacteria* está presente en suelos enriquecidos con pesticidas y resalta la oportunidad de la aplicación de microorganismos autóctonos presentes en ambientes contaminados para la biorremediación y el desarrollo de estrategias sustentables para el manejo de enfermedades en la producción agrícola.

Finalmente, estos microorganismos proporcionan una solución ecológica y de bajo costo para mejorar la producción de cultivos (Jahan et al., 2025).

III. JUSTIFICACIÓN

La utilización de compuestos químicos para erradicar malezas, insectos y microorganismos patógenos genera problemas de contaminación ambiental y efectos secundarios para los seres humanos expuestos a estas sustancias, tales como intoxicaciones y enfermedades a nivel cutáneo y respiratorio. Particularmente, el glifosato **es un herbicida que** representa un riesgo abiótico para la aparición de enfermedades infecciosas diversos tejidos de las plantas de interés agrícola y ornamental debido a la disminución de nutrientes disponibles para éstas, así como la disminución de la población de la rizosfera y la filosfera circundante. Probablemente, el glifosato al provocar daños tisulares en las plantas sea un factor adicional que aumenta la virulencia de los patógenos y se favorezca su entrada.

Las bacterias patógenas vegetales en agricultura causan la disminución del rendimiento de los cultivos y, por consiguiente, grandes pérdidas económicas anuales. La bacteria *Pectobacterium carotovorum* es la principal causante de la podredumbre blanda de la papa ya que macera los componentes del tejido vegetal, además de infectar a una gran variedad de otras especies vegetales. Por su parte, *Pseudomonas syringae* es el agente causal del tizón de halo en diversas leguminosas, entre las que destaca el frijol, por ser base de la dieta mexicana.

En los últimos años, diversas investigaciones están enfocadas en estudiar el control biológico o también conocido como biocontrol de especies fitopatógenas, que consiste en utilizar microorganismos vivos o sus metabolitos para combatir la infección y propagación. Se pretende suprimir la densidad de la población e impactar en un organismo plaga específico, haciéndolo menos abundante o dañino. Además, se ha comprobado que el biocontrol no solo es benéfico por su acción antimicrobiana, sino que favorece la biosfera circundante y la nutrición vegetal.

El grupo de bacterias del género *Streptomyces* es de gran interés debido a su capacidad de adaptarse a diferentes ambientes, incluso en condiciones extremas, así como porque producen metabolitos secundarios para su supervivencia (Alam et al., 2022). Estos metabolitos secundarios son estudiados en diversas áreas entre las que destacan la farmacéutica, agricultura y los biocombustibles. En este sentido, se ha encontrado que este género bacteriano produce compuestos que inhiben el crecimiento de hongos y bacterias patógenas tanto para el ser humano como para especies vegetales de interés agrícola.

Este trabajo de investigación se enfoca en la utilización de especies de *Streptomyces* o sus metabolitos como agentes de biocontrol contra los fitopatógenos *P. carotovorum* y *P. syringae*. Por lo tanto, el estudio propone que las cepas de *Streptomyces* aisladas de suelos contaminados con glifosato, habitantes nativos adaptados a estas condiciones podrían producir metabolitos secundarios bioactivos útiles para el biocontrol.

IV. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacteriana de las bacterias *Streptomyces* tolerantes al glifosato contra las bacterias fitopatógenas *Pectobacterium carotovorum* y *Pseudomonas syringae*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar cepas de *Streptomyces* tolerantes al glifosato productoras de metabolitos bioactivos contra *Pectobacterium carotovorum* y *Pseudomonas syringae*.
2. Seleccionar el medio de cultivo adecuado para la biosíntesis de metabolitos bioactivos contra fitopatógenos.
3. Realizar una fermentación en estado líquido para la obtención de los metabolitos bioactivos y evaluar su actividad antibacteriana.
4. Identificar la fracción de el/los extractos con actividad biológica.
5. Caracterizar mediante métodos analíticos la fracción bioactiva.
6. Identificar molecularmente a la cepa productora de metabolitos antibacterianos mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S.

V. MARCO TEÓRICO

PATÓGENOS VEGETALES

Las bacterias fitopatógenas infectan a una amplia gama de especies vegetales hospedantes, reduciendo el rendimiento y la calidad de la producción agrícola. Dañan casi el 10% de la producción alimentaria mundial, causando pérdidas económicas sustanciales e incluso amenazando la seguridad alimentaria (Anandan & Vittal, 2025; Thakur & Yadav, 2023).

Pectobacterium carotovorum (Pc) y *Pseudomonas syringae* (Ps) son bacterias fitopatógenas oportunistas que entran a los vegetales principalmente a través de aberturas naturales, en el caso de Ps, y principalmente a través de daños tisulares.

La pierna negra y la podredumbre blanda del tubérculo, causadas por la familia *Pectobacteriaceae*, representan amenazas significativas para la producción de papa, impactando tanto al sector de la papa para semilla como al de la papa para consumo (Oulghazi et al., 2025). El control de Pc se realiza con agentes químicos como bactericidas a base de cobre y antibióticos, sin embargo, muchos de ellos no son eficientes para su control, además existe la creciente necesidad de obtener alimentos más seguros y minimizar el uso de estos químicos (Oulghazi et al., 2025).

Pseudomonas syringae causa infecciones en casi todas las especies de cultivos agrícolas de interés económico, incluyendo frutas de hueso, frutas de pepita, otros hospedadores leñosos, cultivos y gramíneas, causando grandes pérdidas económicas. El control de Ps se basa en compuestos químicos a base de cobre y antibióticos, sin embargo, se ha detectado la aparición de resistencia bacteriana a estos compuestos, y se ha limitado el uso de estas estrategias, incluso combinadas (Córdova et al., 2023; Xin et al., 2018).

Pectobacterium carotovorum

El género *Pectobacterium* (antes conocido como *Erwinia*), que pertenece a la familia *Pectobacteriaceae*, está integrado por bacterias Gramnegativas, patógenas de diversas plantas a las cuales les ocasionan la enfermedad conocida como “pudrición blanda”, que posteriormente se convierte en la enfermedad de “pierna negra” por su efecto necrótrofo. *Pectobacterium carotovorum* es la especie más representativa del grupo que se encuentra normalmente en el suelo y entra a la planta principalmente a través de heridas causadas por daños mecánicos y daños causados por insectos (Doolotkeldieva et al., 2016; Chandrashekar et al., 2022).

Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum (Pcc) es un fitopatógeno altamente destructivo conocido por su capacidad para descomponer rápidamente

las paredes celulares de las plantas (Almasoudi et al., 2024). Es capaz de infectar a una gran variedad de hospedadores como tubérculos (ej. Papa y rábanos), cactáceas (ej. *Neobuxbaumia tetetzo*, conocido como tetecho), jitomate, zanahoria, chiles, entre otros (Mejía-Sánchez et al., 2018; Chandrashekar et al., 2022).

Esta bacteria es considerada como un patógeno oportunista sobre todo porque es capaz de vivir dentro del tejido vegetal sin causar síntomas hasta que la alta humedad, la baja concentración de oxígeno y los daños tisulares reducen la resistencia de la planta y favorecen el crecimiento bacteriano (Doolotkeldieva et al., 2016). En la comunicación entre el patógeno y la planta, la pectina, que es un componente de la pared celular vegetal, es utilizado como fuente de carbono provocando que se induzca la expresión de genes de virulencia que son importantes para que se pueda dar el desarrollo de la enfermedad. Es relevante mencionar que la molécula del *quórum sensing* (QS) producido por el patógeno, acil homoserina lactona (AHL), actúa como regulador transcripcional de genes de virulencia que afectan la expresión genética en *Pectobacterium* (Charkowski, 2009).

Adicionalmente, las especies del género producen un cóctel de enzimas hidrolíticas que degradan la pared celular vegetal (PCWDE, por sus siglas en inglés) que incluyen pectinasas (Pel), poligalacturonasas (Peh), celulasas (Cel), hemicelulasas, xilanasas y proteasas (Prt), todas contribuyendo en la maceración del tejido y la podredumbre blanda que generalmente se acompaña de mal olor (Chandrashekar et al., 2022).

Las PCWDE se secretan principalmente a través del sistema de secreción tipo II (T2SS), aunque las bacterias de podredumbre blanda también secretan proteínas que promueven la muerte de las células vegetales a través de sistemas de secreción tipo III (T3SS), como la proteína inductora de necrosis (Nip) y la proteína efectora DspE. Por otra parte, la bacteria favorece la resistencia a la enfermedad debido a que los oligogalacturónidos (OG) liberados por la acción de los PCWDE desencadenan la respuesta inmune de la planta, la inducción de la expresión de genes de defensa y la síntesis de varios compuestos defensivos (**Figura 1**). Sin embargo, en la fase temprana de la enfermedad, *Pectobacterium* es capaz de disminuir la producción de PCWDE y así minimizar la generación de patrones moleculares asociados al daño (DAMP, por sus siglas en inglés) (Davidsson et al., 2013).

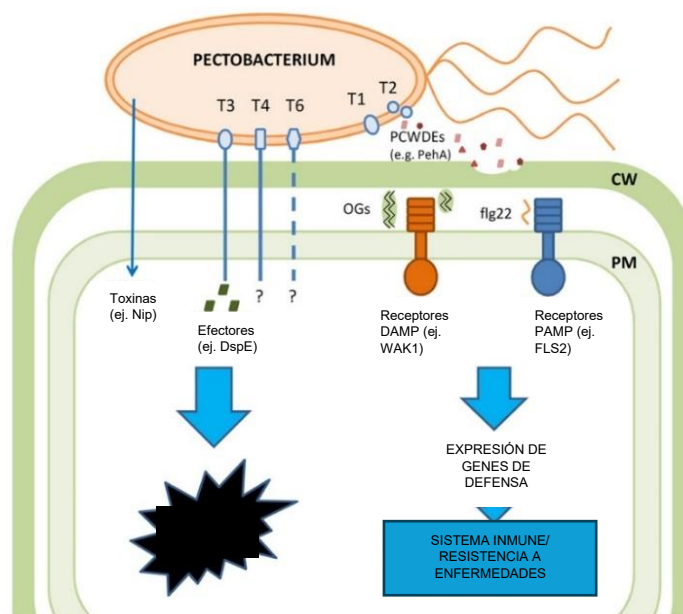


Figura 1. Interacción entre la bacteria *Pectobacterium* y las células vegetales en donde se muestra que la virulencia depende de la maceración del tejido vegetal a través de la acción de los PCWDE secretados por los sistemas tipo I (T1) y tipo II (T2). La muerte celular vegetal es promovida por la acción de toxinas como Nip y el efector DspE, que se secreta a través del sistema de secreción tipo III (T3). El sistema de secreción tipo IV (T4) y el sistema de secreción tipo VI (T6) pueden contribuir a la virulencia, pero aún no está clara su participación. Por otro lado, los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) conservados y los patrones moleculares asociados a daños (DAMP, por sus siglas en inglés) contribuyen a la resistencia de la enfermedad debido a la activación del sistema inmune de la planta. Tomado de Davidsson et al., (2013).

Pseudomonas syringae

Pseudomonas syringae (*P. syringae*) es una bacteria Gramnegativa distribuida globalmente, que forma un complejo de especies monofilético con 13 filogrupos, (Grenz et al., 2024). Este es uno de los patógenos vegetales más comunes en la filosfera, causando enfermedades en una amplia variedad de plantas a las cuales ingresa a través de heridas o aberturas naturales como los estomas, multiplicándose dentro del apoplasto, es decir, el patógeno se deposita dentro de los espacios intercelulares de los tejidos fotosintéticos (Xin et al., 2018; Grenz et al., 2024). Esta bacteria tiene dos fases de crecimiento interconectadas: la fase epífita, cuando las bacterias viven en la superficie de los tejidos de la planta, generalmente las partes aéreas como hojas, tallos, flores y frutos; y la fase endofítica, cuando las bacterias entran en el tejido vegetal y colonizan el espacio intercelular del apoplasto (Córdova et al., 2023).

La eficacia y eficiencia en la infección se basa en tres pasos clave de propagación y colonización (**Figura 2**), que ocurre en los siguientes pasos: (1) el desplazamiento

entre plantas a través del ciclo del agua, que les permite propagarse a nuevos hospedadores y encontrar nuevas fuentes de nutrientes; (2) la localización de entradas a los tejidos internos del hospedador y la modificación del apoplasto para facilitar la adquisición de nutrientes y agua; y (3) la modulación de las vías inmunitarias del hospedador para promover la colonización mediante la inyección de proteínas efectoras en el citoplasma de las células hospedadoras (Silva-Sanzana et al., 2022).

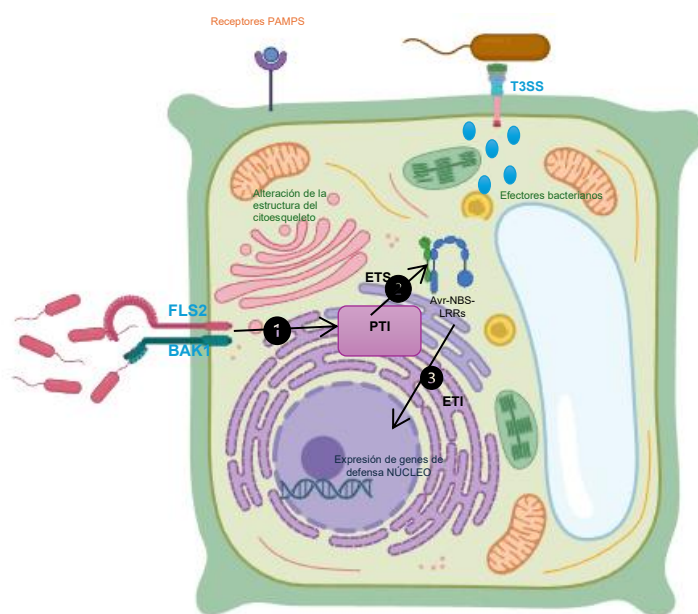


Figura 2. Estrategias para la infección de *Pseudomonas syringae* que incluye a) el movimiento de planta a planta, requiriendo vectores como insectos, b) la disrupción del huésped utilizando entradas naturales como estomas y heridas para penetrar el apoplasto e inducir un ambiente acuoso para promover el crecimiento bacteriano, y c) la supresión de las defensas del huésped al producir un inyectosoma que transloca los efectores directamente al citoplasma que bloquea la cascada de señalización posterior al reconocimiento de PAMP y altera la estructura del citoesqueleto. Tomado de Silva-Sanzana et al. (2022).

P. syringae ataca a las plantas utilizando una variedad de factores de virulencia, incluyendo proteínas efectoras, AvrE y HopM1, que se translocan a la célula vegetal a través del sistema de secreción de tipo III (T3SS), toxinas de moléculas pequeñas, exopolisacáridos, enzimas que degradan la pared celular y hormonas vegetales (Xin et al., 2018). En el apoplasto actúan las proteínas efectoras AvrE y HopM1, que se dirigen a proteínas hospedadoras conservadas para establecer un entorno acuoso esencial para la supervivencia bacteriana (Grenz et al., 2024).

La toxina lipopeptídica cíclica siringomicina es una molécula anfifílica que forma poros permeables a los iones en las membranas celulares vegetales alterando la homeostasis iónica y causando necrosis tisular en plantas con y sin flores. Además, la siringomicina exhibe propiedades biosurfactantes que facilitan la propagación del patógeno (Grenz et al., 2024).

La inmunidad desencadenada por patrones (PTI, por sus siglas en inglés) es originada por la unión de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés) a los receptores de reconocimiento de patrones (PRR, por sus siglas en inglés) localizados en la membrana celular vegetal. La supresión de la PTI es efectuada a través de un sistema de secreción tipo III (T3SS) por el cual se permite la inyección de proteínas efectoras al citoplasma como AvrPto, AvrPtoB, HopB1 y HopF2 que bloquean la cascada de señalización aguas abajo del reconocimiento de PAMP, los efectores HopW1, HopG1 y HopZ1a, alteran el citoesqueleto y, por lo tanto, se interrumpen procesos clave de las células vegetales asociados con la división, el crecimiento, el transporte de vesículas, las respuestas de defensa e incluso la regulación de la apertura estomática (Xin et al., 2018; Silva-Sanzana et al., 2022; Grenz et al., 2024).

P. syringae representa un reto actual al igual que muchas otras especies del género *Pseudomonas*, debido a la aparición de cepas multirresistentes a los tratamientos basados en formulaciones químicas, que se han vuelto resistentes como consecuencia del proceso de transferencia horizontal de genes entre bacterias (Córdova et al., 2023).

SUSCEPTIBILIDAD DE LAS PLANTAS A LOS MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS POR EL USO CONTINUO DE LOS AGROQUÍMICOS EN LOS CAMPOS DE CULTIVO

En la agricultura moderna se utilizan fertilizantes, pesticidas, fungicidas, herbicidas e insecticidas para satisfacer las necesidades nutricionales de los cultivos, principalmente para aumentar la productividad. Estas prácticas han contribuido significativamente a la degradación ambiental y la contaminación en diversos sistemas acuáticos y terrestres (Beyari, 2024; Chaudhary et al., 2024).

Aunado a esto, de los pesticidas y herbicidas utilizados en agricultura, como el glifosato, aproximadamente solo el 0,1% alcanzan los objetivos previstos, y se espera que el resto permanezca en la cadena alimentaria y el medio ambiente durante un período más prolongado (Chaudhary et al., 2024).

En la agricultura convencional, las plantas conocidas como malezas son consideradas indeseables ya que compiten con los cultivos por la luz solar y los nutrientes del suelo, impactando de manera significativa en el rendimiento de los productos agrícolas, (Fernández-Peña, 2023).

En la década de 1970 se descubre la aplicación de glifosato como herbicida. El principal mecanismo de acción del glifosato es como antagonista de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS) de la vía del ácido shikímico, la cual es responsable de la biosíntesis de aminoácidos y otros compuestos aromáticos en plantas, bacterias y algunos hongos (González-Moscoso et al., 2023). Como se muestra en la **Figura 3** el glifosato compite por el sitio de unión con el segundo sustrato (PEP). El resultado de la aplicación de glifosato provoca la supresión de la síntesis de proteínas necesarias y metabolitos secundarios, además, obstaculiza las vías de energía vital en plantas y microorganismos del suelo (Zhan et al., 2018).

Sobre esta misma vía, se ha estudiado que el glifosato actúa por quelación del Mn^{2+} , un cofactor para la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato (EPSP) sintasa (Johal & Huber, 2009). El glifosato como agente quelante de cationes metálicos divalentes, reduce la absorción y translocación de nutrientes en los cultivos, ya que son cofactores esenciales en muchos procesos biológicos de las plantas (Fernandez-Peña et al., 2023; González-Moscoso et al., 2023).

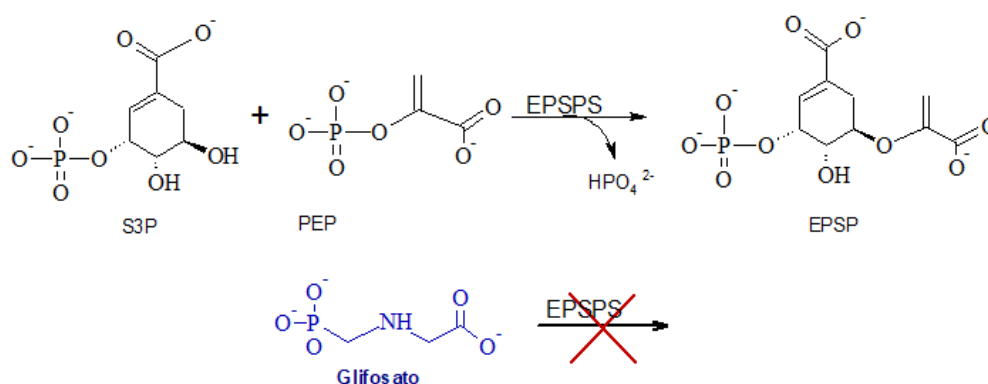


Figura 3. Acción antagonista del glifosato en la vía del ácido shikímico. En las plantas, la enzima cataliza la transferencia de la fracción enolpiruvilo del fosfoenolpiruvato (PEP) al grupo 5'-hidroxilo del shikimato-3-fosfato (S3P) con la liberación concomitante de fosfato inorgánico (Pi) (Griffin et al., 2021).

Ante la exposición a herbicidas a base de glifosato, la composición de la comunidad bacteriana del suelo sufre cambios adaptativos que favorecen la prevalencia de especies tolerantes al glifosato, con efectos potenciales en la capacidad o eficiencia de la microbiota del suelo para completar los ciclos del Carbono, Nitrógeno y Fósforo (González & Fuentes, 2022).

Esto puede aumentar la incidencia de muchas enfermedades como resultado del estado nutricional reducido de la planta y puede afectar negativamente a muchos microorganismos beneficiosos del suelo, añadiendo que las lesiones en el tejido radical ocasionadas por el herbicida favorecen el ingreso de fitopatógenos, lo que va acompañado de cambios en los exudados, que a su vez alteran la microbiota rizosférica y las propiedades fisicoquímicas del suelo (Rivera et al., 2019). Por lo que progresivamente disminuye el valor nutrimental de los suelos y el estado nutricional de los agro cultivos (González & Fuentes, 2022; Klátyik et al., 2023).

Así mismo, el uso prolongado de glifosato puede aumentar la gravedad de varias enfermedades al afectar a los cuatro componentes interactuantes del "diamante de las enfermedades de las plantas" (ver **Figura 4**) que comprende la planta, los entornos abióticos y bióticos y el patógeno (Johal & Huber, 2009).

El crecimiento reducido, las defensas deterioradas, la absorción y translocación deficientes de nutrientes y la fisiología alterada de las plantas por el glifosato pueden afectar la susceptibilidad o tolerancia a varias enfermedades. La quelación de nutrientes por glifosato en la planta y el suelo puede hacer que esos nutrientes sean inmóviles y no estén disponibles para el uso o la absorción de la planta, mientras que la toxicidad para los organismos sinérgicos y beneficiosos esenciales del suelo reduce aún más la disponibilidad de nutrientes que son críticos para la defensa fisiológica de una planta en la enfermedad (Johal & Huber, 2009).

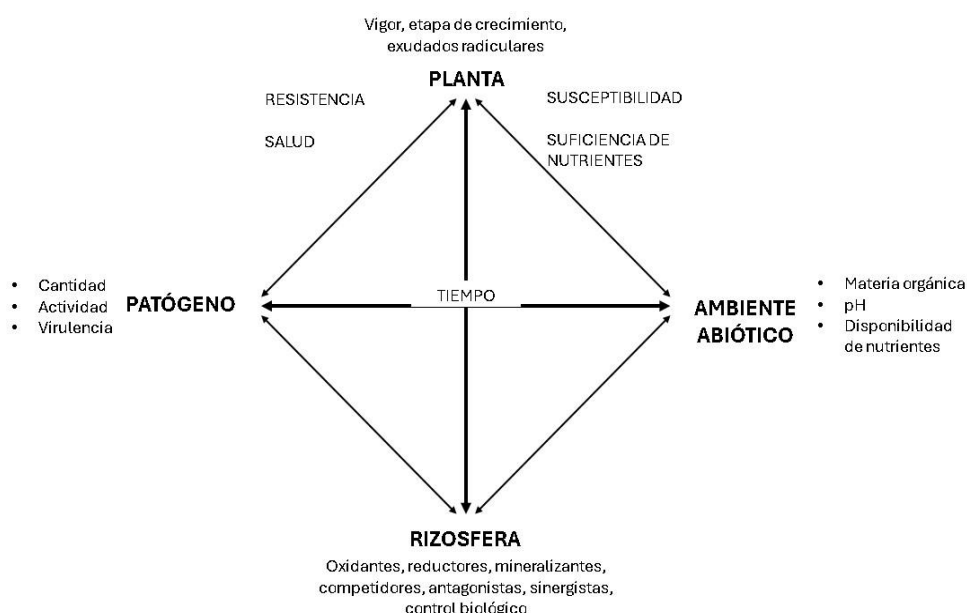


Figura 4. Los cuatro factores principales que interactúan y que influyen en la disponibilidad de nutrientes y las enfermedades que se ven afectadas por el glifosato. Recuperado de Johal and Huber (2009).

En su estudio, Palberg et al. (2024), proponen que el glifosato puede dañar a los componentes de la filosfera que previenen la infección independientemente del estado de resistencia al glifosato del huésped. Por lo tanto, el daño causado por el glifosato se extiende en la filosfera y la rizosfera.

En general, se han propuesto varias hipótesis en torno al aumento de la incidencia de enfermedades infecciosas en las plantas después de la aplicación de glifosato, entre ellas: (a) la exposición de patógenos al glifosato predispone al agente infeccioso a productos químicos sintéticos exógenos que aumentan la virulencia y la resistencia a los agroquímicos, (b) el glifosato puede proporcionar una fuente de carbono alternativa para los patógenos, y (c) la muerte inducida por glifosato de malezas problemáticas que actúan como reservorios para ciertos fitopatógenos causa aumentos repentinos en la densidad de colonias de campo durante la descomposición (Palberg et al., 2024).

Es necesario considerar que los microorganismos del suelo que desempeñan un papel decisivo en la regulación de los ciclos de nutrientes al degradar la materia orgánica propiciando la disponibilidad y asimilación de nutrientes esenciales para las plantas, disminuyen significativamente por la aplicación de glifosato y su retención en el suelo. Por lo que, Meenakshi et al. (2024) dice que la selección de muestras ambientales tiene un impacto significativo en la eficacia de aislar cantidades significativas de un determinado microorganismo, por lo tanto, tiene sentido estudiar actinomicetos de suelos agrícolas en los que se usa glifosato como tratamiento herbicida, dado que solo estarán presentes aquellos microorganismos que toleran la exposición a dicho herbicida.

Debido al gran problema que representa la aplicación de glifosato para generar susceptibilidad a enfermedades infecciosas, se hace necesario buscar microorganismos nativos que toleren el estrés ambiental en el que se encuentran para producir metabolitos secundarios inhibidores de fitopatógenos.

ACTINOBACTERIAS

El filo *Actinobacteria* se divide en seis clases de bacterias Grampositivas las cuales son: *Actinobacteria*, *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Rubrobacteria* y *Thermoleophilia*. Un gran número de especies son bacterias filamentosas con un alto contenido de guanina más citosina (G+C) en sus genomas en relación con otros filos de bacterias, que presentan un tamaño promedio de genoma de más de 5 megabases (Mb) (Lewin et al., 2016).

Las *actinobacterias* habitan diversos ambientes del suelo y acuáticos (por ejemplo, especies de *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Rhodococcus* y *Salinispora*), algunos son simbioses de plantas (por ejemplo, *Frankia* spp.), existen patógenos

de plantas o animales (por ejemplo, especies de *Corynebacterium*, *Mycobacterium* o *Nocardia*) o comensales gastrointestinales (por ejemplo, *Bifidobacterium* spp.) (Barka et al., 2016).

Fisiológica y ecológicamente, la mayoría de las actinobacterias son aerobias, con hábitos como heterótrofas o quimioautotróficas, no obstante, la mayoría son quimioheterotrófas y capaces de utilizar una amplia variedad de fuentes nutricionales, incluidos polisacáridos complejos, proteínas, grasas, lípidos, hidrocarburos, entre otras fuentes de carbono y nitrógeno (Lewin et al., 2016; Barka et al., 2016). Asimismo, estas bacterias han sido identificados como contribuyentes clave en los ciclos biogeoquímicos debido a su diversa fisiología y flexibilidad metabólica (Meenakshi et al., 2024). Otra característica del filo es la de ser generalmente bacterias mesófilas, con un crecimiento óptimo a temperaturas entre 25 y 30°C. Sin embargo, hay géneros termófilos capaces de crecer entre los 50-60°C. Estas bacterias crecen mejor a un pH entre 6 y 9, con un crecimiento máximo alrededor de la neutralidad, aunque se han aislado algunas cepas de *Streptomyces* de suelos ácidos (pH 3,5) (Barka et al., 2016; Jangra et al., 2025). Las actinobacterias son la fuente predominante de antibióticos, antifúngicos y otros compuestos bioactivos, que en general se describen como metabolitos bioactivos (Singh, 2022). Otro de los rasgos de este grupo es la producción de fitohormonas, tales como las auxinas, que favorecen el desarrollo de las plantas y por ello también se les considera como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Reyes et al., 2015; Jangra et al., 2025).

Por lo general, este grupo bacteriano está presente en densidades del orden de 10^6 a 10^9 células por gramo de suelo y las poblaciones del suelo están dominadas por el género *Streptomyces*, que representa más del 95% de las especies aisladas del suelo. Asimismo, algunas especies pueden formar asociación con hongos micorrícicos y una variedad de familias de plantas. A esta asociación se le conoce con el término de actinorriza y consiste en la infección de las raíces de la planta formando nódulos que favorecen el estado nutricional del hospedero (Reyes et al., 2015). Estudios previos sugieren que las actinobacterias y las especies de *Streptomyces*, en particular, son taxones importantes en los suelos para la supresión de enfermedades y la promoción del crecimiento vegetal (Choudoir et al., 2019).

GÉNERO *Streptomyces*

Dentro del filo Actinobacteria, el género *Streptomyces* es conocido por su prolífica producción de metabolitos secundarios y otros compuestos bioactivos (Choudoir et al., 2019; Jahan et al., 2025). Esto debido a que los estreptomicetos tienen significativamente más genes biosintéticos de metabolitos secundarios (smBGC) y

enzimas activas de carbohidratos (CAZimas) que muchas de otras especies de actinobacterias (Nikolaidis et al., 2023). Los genomas de los estreptomicetos comprenden un cromosoma de un tamaño que varía de 6 a 12 Mb, codificando de 5300 a 11 000 proteínas (Nikolaidis et al., 2023).

El ciclo de vida del micelio multicelular *Streptomyces* (**Figura 5**) comienza con la germinación de una espora que crece para formar hifas vegetativas (Barka et al., 2016). Este hábito de crecimiento, junto con las actividades de abundantes enzimas hidrolíticas extracelulares, les ayuda a acceder a los nutrientes atrapados en los polímeros insolubles del suelo y, a medida que el micelio del sustrato se vuelve limitado por nutrientes, comienza la producción de antibióticos y otros metabolitos secundarios; así como la formación de ramas aéreas reproductivas, que son al menos parcialmente parásitas en el micelio del que emergen. Las hifas aéreas forman compartimentos de punta aseptados que a menudo contienen muchas decenas de copias del genoma. Cuando dicho compartimento deja de crecer, experimenta una septación múltiple sincrónica para dar una cadena de compartimentos de esporas unigenómicos (Chater & Chandra, 2006).

Es necesario destacar que las especies de *Streptomyces* que se encuentran en el suelo o asociadas con las plantas coexisten en un entorno competitivo donde los recursos y el espacio son limitados (Nguyen et al., 2024).

El estudio del paisaje genético de *Streptomyces* realizado por Nikolaidis et al. (2023) demostró la capacidad del género para una rápida adaptación a entornos muy diversos y menciona que es probable que el género *Streptomyces* muestre un alto nivel de plasticidad genómica que involucra aquellos elementos que desempeñan un papel clave en las adaptaciones rápidas en diversos ambientes.

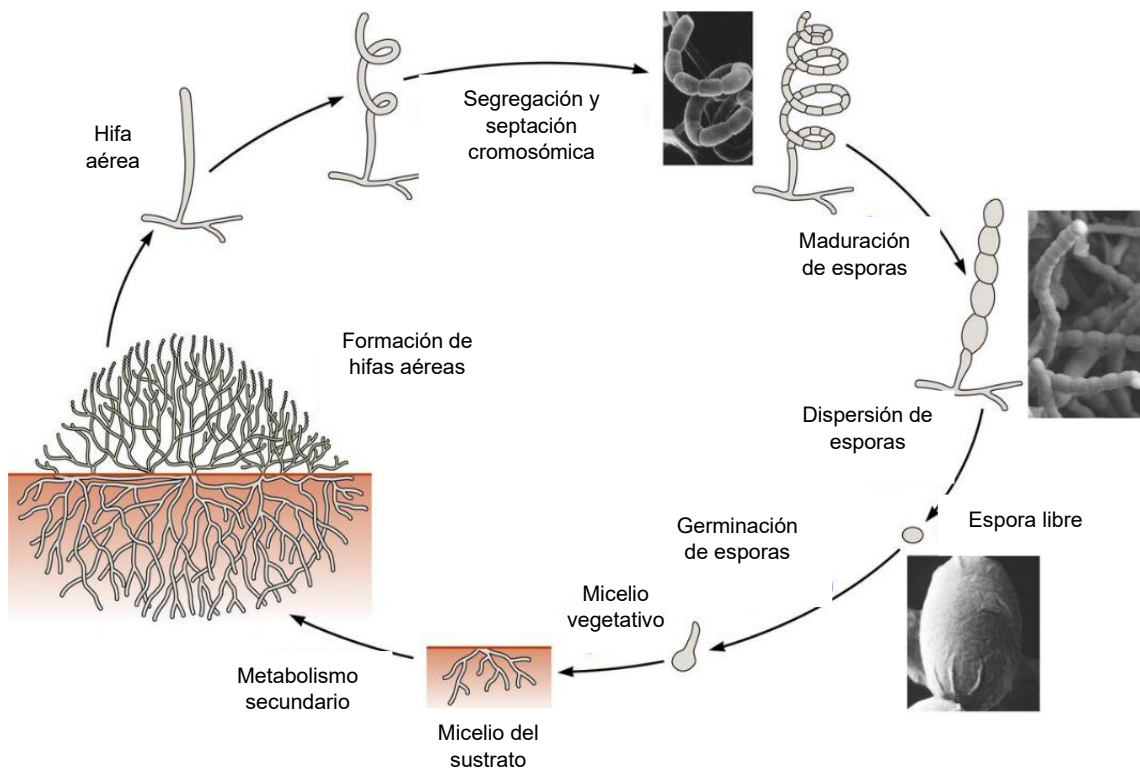


Figura 5. Representación esquemática del ciclo de vida de *Streptomyces*. El género *Streptomyces* tiene un estilo de vida predominantemente micelial, reproduciéndose principalmente mediante esporas asexuales que se producen por la septación de las hifas aéreas como respuesta a condiciones desfavorables. Una vez que se encuentran en un ambiente propicio para su desarrollo, dicha espora germina y comienza el desarrollo micelial. Modificado de Barka et al., (2016).

METABOLISMO SECUNDARIO DEL GÉNERO *Streptomyces* Y SUS CLÚSTER DE GENES BIOSINTÉTICOS

Es indispensable diferenciar los términos y explicar que, entre los metabolitos microbianos, los primarios, como el etanol, el ácido láctico y los aminoácidos, son necesarios para su crecimiento, multiplicación, reproducción y desarrollo. En cambio, los metabolitos microbianos secundarios, como los pigmentos y los antibióticos, mejoran sus procesos metabólicos, defensa y comunicación (Singh, 2022). Por lo tanto, el metabolismo primario se encarga de producir todas las sustancias básicas y necesarias para el crecimiento de la bacteria, mientras que el metabolismo secundario es accesorio para sintetizar moléculas que favorecen la supervivencia en condiciones de deficiencia de nutrientes.

La producción de metabolitos secundarios está asociada a la diferenciación morfológica (Harir et al., 2018). Dado que la germinación de una espora ocurre en respuesta a nutrientes solubles, el crecimiento micelial rápido y temprano explota los nutrientes solubles. Solo cuando estos nutrientes se han agotado, se exportan

enzimas para la degradación de nutrientes insolubles. En este momento, a medida que los nutrientes fácilmente asimilables comienzan a agotarse, se forma el micelio aéreo a partir de la lisis parcial del micelio vegetativo. Tiene sentido que los antibióticos se secreten al mismo tiempo, para proteger los materiales vegetales solubilizados contra otros microorganismos que podrían avanzar hacia adentro y competir con el micelio. Esto podría incluso considerarse como una estrategia de emboscada, en la que los posibles predadores que buscan nutrientes constituyen una nutrición potencial adicional: una noción llamada "atracción fatal", (Chater, 2006; Barka et al., 2016; Harir et al., 2018).

Por lo que, la privación de nutrientes y el consiguiente cese del crecimiento son los principales desencadenantes del inicio de la producción de antibióticos (Barka et al., 2016).

Los antibióticos producidos por el género *Streptomyces* se agrupan de acuerdo con sus características de estructura química en ansamisinias, macrólidos, aminoglucósidos, tetraciclinas, antraciclinas y β -lactámicos (Harir et al., 2018). Las vías implicadas en la producción de metabolitos secundarios son: la vía peptídica, la vía de la policétido sintasa (PKS), la vía de la policétido sintasa no ribosómica (NRPS), la vía híbrida (sintética de policétidos no ribosómicos), la vía del shikimato, la vía sintética de β -lactamas y la vía de los carbohidratos (Harir et al., 2018).

En medicina, agricultura y biorremediación los *Streptomyces* tienen numerosos beneficios potenciales claros, como fuentes de nuevos antibióticos, antifúngicos, agentes anticancerígenos y otros metabolitos secundarios que podrían usarse en medicina o para mejorar el crecimiento de las plantas y la resistencia a las enfermedades (Chater, 2006; Devi et al., 2023; Choudoir et al., 2019).

Por lo tanto, en este estudio se pretende evaluar si los actinomicetos aislados de suelos agrícolas tratados con glifosato son capaces de producir metabolitos secundarios con actividad antibacteriana contra los dos fitopatógenos de importancia agrícola y económica, *P. carotovorum* y *P. syringae*.

VI. HIPÓTESIS

Las cepas del género *Streptomyces* aisladas a partir de suelos contaminados por el herbicida glifosato, producen metabolitos bioactivos capaces de inhibir el crecimiento de las bacterias fitopatógenas *Pectobacterium carotovorum* y *Pseudomonas syringae*.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

El proyecto se realizó en 6 etapas que se describen en la Figura 6:

1. Reactivación de cepas conservadas en criogenia.
2. Preselección de cepas con actividad antibacteriana.
3. Evaluación de la producción de los compuestos antibacterianos por el método de fermentación líquida.
4. Caracterización:
 - a) Actividad biológica: cinética de producción de metabolitos antimicrobianos.
 - b) Física: Efecto de la Temperatura
 - c) Química: Cromatografía de capa fina (TLC), barrido espectral y espectrometría de masas.
5. Identificación molecular y análisis filogenético.
6. Análisis estadístico.

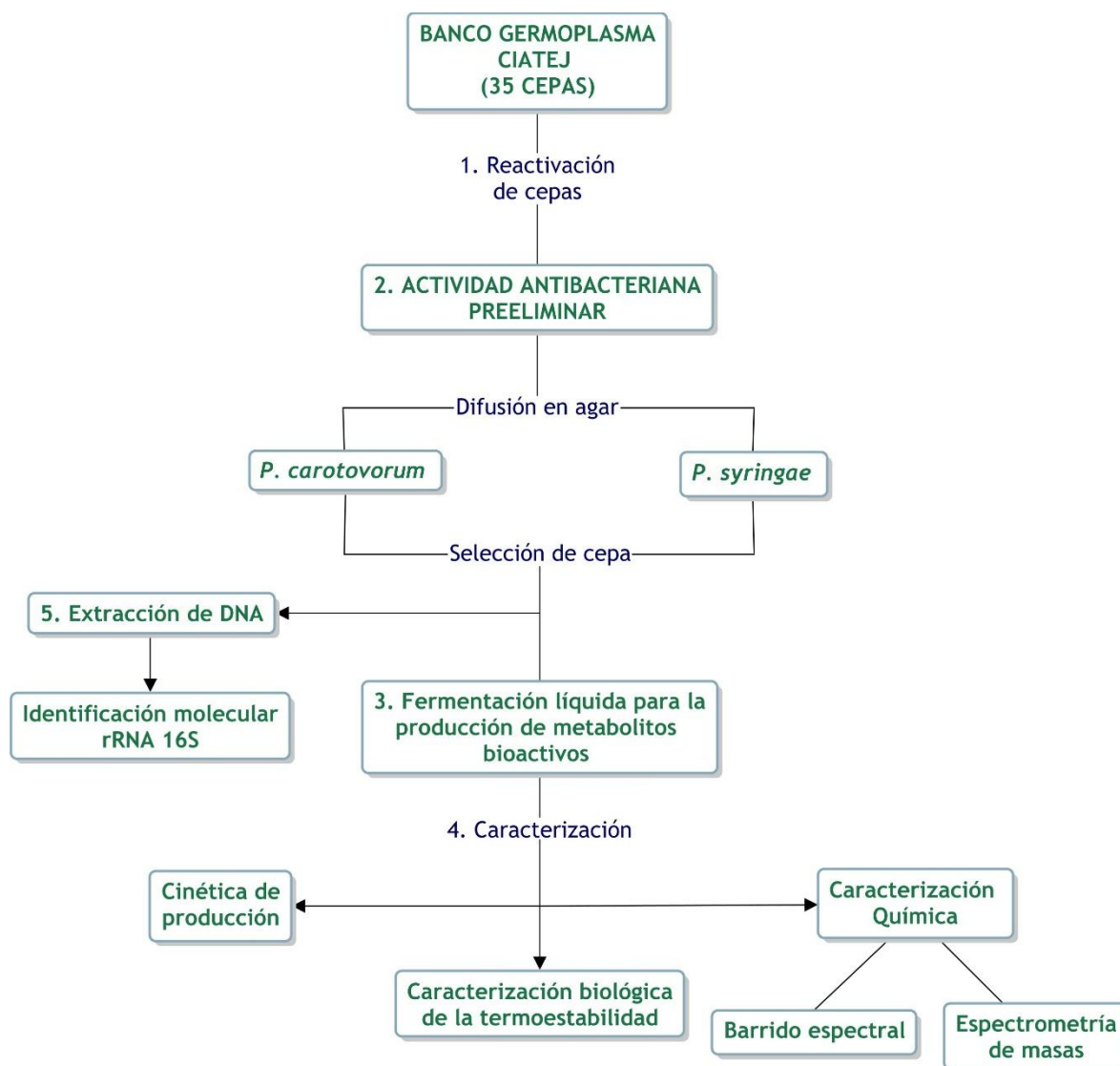


Figura 6. Diseño experimental para el desarrollo del proyecto de investigación.

REACTIVACIÓN DE ESTREPTOMICETOS CONSERVADOS EN CONGELACIÓN

Para la búsqueda de cepas con actividad antimicrobiana, se tomaron las esporas de 35 cepas de bacterias del banco de Germoplasma del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco (CIATEJ), conservadas a -20 °C en glicerol 20% (p/v). Estas cepas fueron seleccionadas porque previamente habían demostrado ser capaces de tolerar diferentes concentraciones de glifosato, que son concentraciones empleadas en los campos agrícolas.

El primer paso realizado consistió en descongelar las esporas a temperatura ambiente (25°C) y en condiciones de esterilidad, dispersar 10 µl de esporas por estría cruzada en cajas Petri con medio agar ISP 2 (Proyecto Internacional de

Streptomyces 2) y medio agar ISP 3 (Proyecto Internacional de *Streptomyces* 3). Finalmente, las cajas Petri se incubaron a 29 °C por 7 – 14 días. Se corroboró con la morfología macroscópica y microscópica de las cepas viables que correspondían al género *Streptomyces*.

Posteriormente, para conservar las esporas de las cepas de los estreptomicetos reactivados se agregó 1 ml de dH₂O estéril a la placa Petri con la cepa esporulando y con la ayuda de un asa Digrafsky se removieron las esporas. La suspensión de esporas se recuperó en un microtubo y se agregó glicerol estéril para alcanzar el 15% de concentración final. Los tubos se guardaron en congelación a -22°C hasta su uso. Todo el procedimiento se realizó en condiciones de esterilidad.

1. RESELECCIÓN DE ESTREPTOMICETOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA MEDIANTE EL MÉTODO DE DIFUSIÓN

Para evaluar la actividad antagónica de las bacterias *Streptomyces*, se inocularon 100 µl de las suspensiones bacterianas de *Pectobacterium carotovorum* (Pc) y *Pseudomonas syringae* (Ps) con una turbidez de 0.5 en la escala McFarland, preparadas a partir de cultivos de 18-24 horas creciendo en medio agar nutritivo (AN) y King B (AKB), respectivamente.

Posteriormente, a partir de cultivos de *Streptomyces* mantenidos en crecimiento en medio IPS 2 por 7 días, se prepararon discos de agar de 9 mm de diámetro tomados alrededor de las colonias y se colocaron cuidadosamente sobre las cajas Petri preparadas como se describió previamente. Finalmente, las cajas Petri se mantuvieron a 29°C por 24 horas para observar el desarrollo de halos de inhibición del crecimiento bacteriano, que fueron medidas con un vernier digital. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El procedimiento realizado se observa en la **Figura 7**.

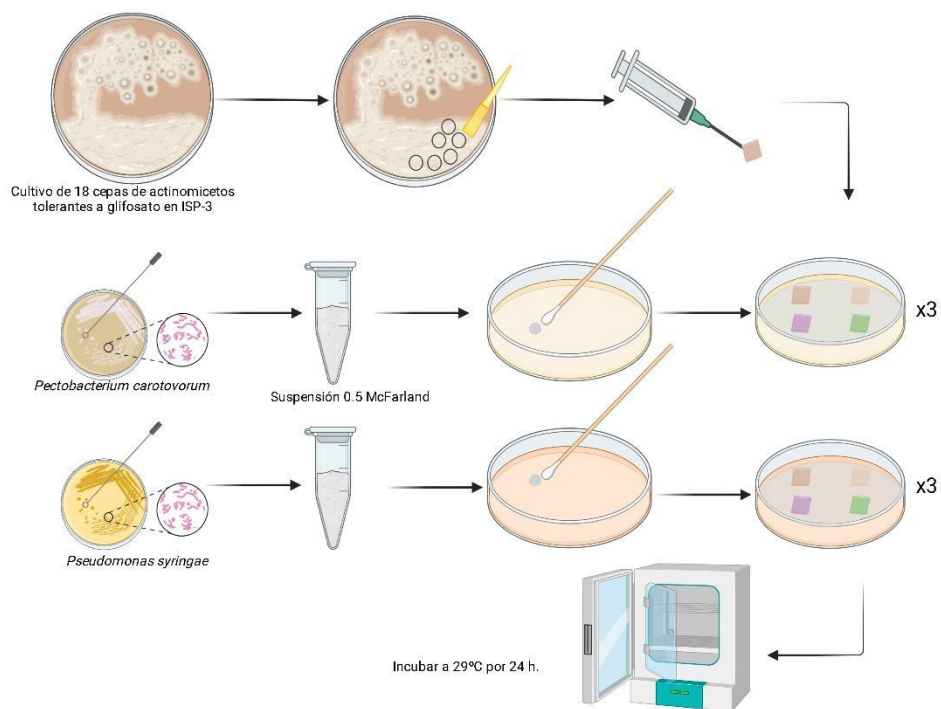


Figura 7. Inhibición del crecimiento bacteriano mediante el método de difusión en disco de agar. Cada disco de agar se tomó de una placa Petri con un cultivo en crecimiento de las cepas de *Streptomyces* y se transfirieron a una placa Petri inoculada con las bacterias *Pectobacterium carotovorum* y *Pseudomonas syringae*. Creado en <https://BioRender.com>

Se calculó el porcentaje de inhibición relativo con la **Fórmula 1**, el cual sirvió para seleccionar a la cepa productora de metabolitos bioactivos:

Fórmula 1. Porcentaje de inhibición (PI) relativo.

$$PI(\%) = \left(\frac{(DI - Dd)}{DI} \right) * 100$$

Donde:

DI: Diámetro del halo de inhibición (mm)

Dd: Diámetro del del disco de agar (mm)

2.1. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LOS METABOLITOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Se añadieron 80 μ l de la suspensión de esporas de *Streptomyces* sp. cepa G63 a matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían en su interior un resorte de acero inoxidable y 30 ml de los siguientes medios de cultivo: caldo nutritivo (CN), caldo papa dextrosa (PDB), medio líquido ISP2 y medio líquido ISP3. Posteriormente, los matraces se mantuvieron en agitación a 150 rpm/29°C por 7 días.

Después del periodo de incubación, los cultivos se transfirieron a tubos Falcón estériles y se centrifugaron a 6000 rpm/ 4°C por 10 minutos para separar las células. Finalmente, los sobrenadantes se colectaron y transfirieron a tubos Falcón estériles para obtener extractos libres de células (EBs).

El procedimiento experimental se observa en la **Figura 8**.

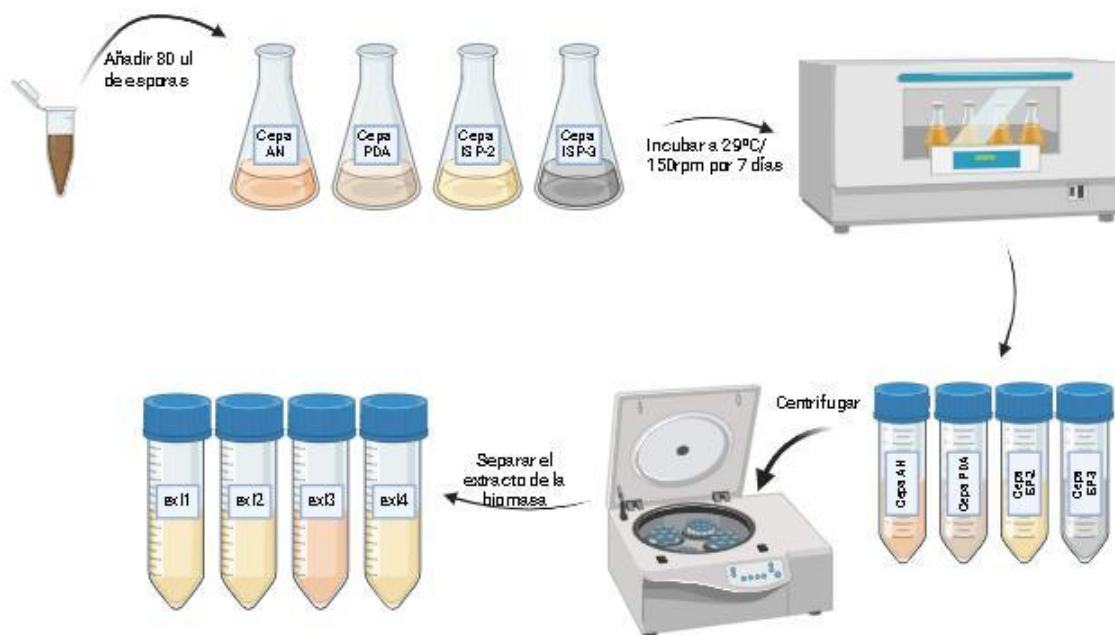


Figura 8. Proceso de fermentación líquida y obtención de extractos líquidos. Creado en <https://BioRender.com>

2. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EBs CONTRA *Pectobacterium carotovorum* Y *Pseudomonas syringae*

Los sobrenadantes libres de células previamente obtenidos se emplearon para evaluar la actividad antibacteriana y determinar el medio de cultivo con la mayor producción de los compuestos con actividad antibacteriana. Las placas Petri inoculadas con las bacterias se prepararon como se describió previamente, una vez que se absorbió la suspensión de bacterias se realizaron pozos de 9 mm de diámetro. En cada pozo se añadieron 50 µl de cada EB y se incubaron a 29°C por 24 horas. El ensayo para la inhibición de cada fitopatógeno se realizó por triplicado. El procedimiento experimental se realizó de acuerdo con lo mostrado en la **Figura 9**.

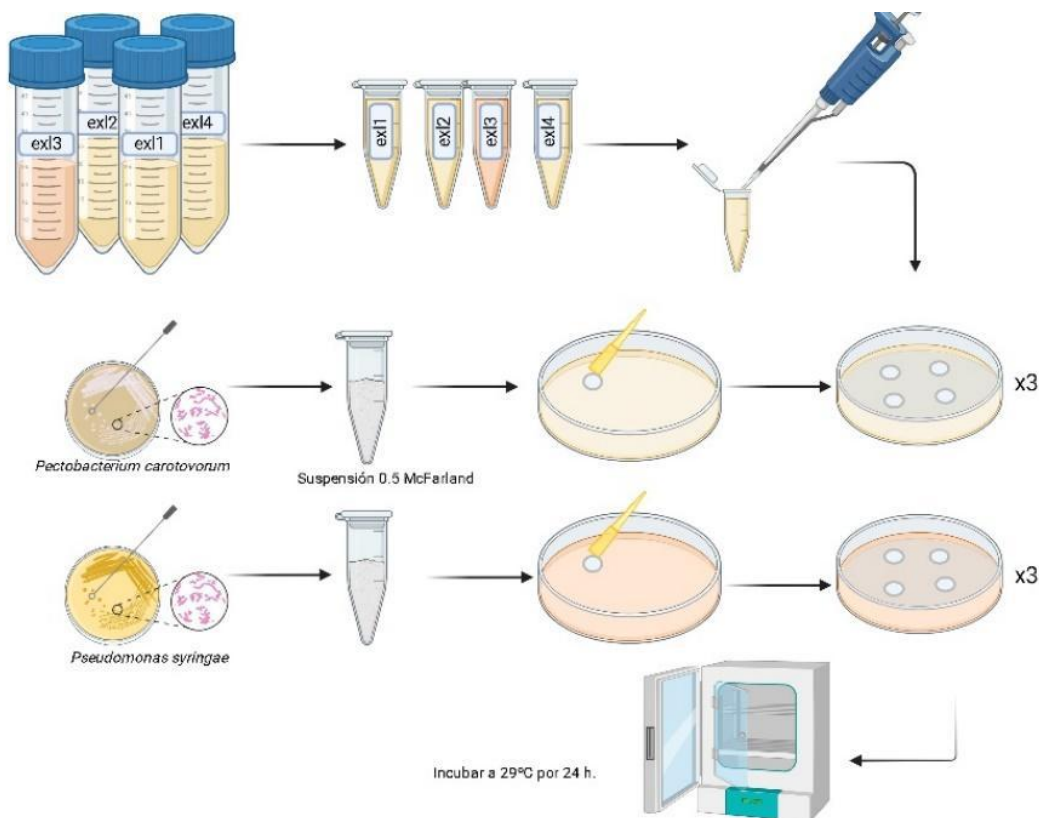


Figura 9. Ensayo de inhibición de los extractos de la cepa contra *Pectobacterium carotovorum* y *Pseudomonas syringae*. Creado en <https://BioRender.com>

Los halos de inhibición generados se midieron con un Vernier digital y se calculó el porcentaje de inhibición relativo con la fórmula 1.

3. CARACTERIZACIÓN DEL EB PRODUCIDO POR *Streptomyces* sp G63

CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE METABOLITOS BIOACTIVOS DE *Streptomyces* sp. G63

Para examinar la fase de crecimiento en la que comienza la producción de metabolitos secundarios inhibidores de bacterias, se realizó una curva de crecimiento que correlacionó el tiempo del cultivo en relación con la formación del halo de inhibición con cada bacteria fitopatógena

En dos matraces Erlenmeyer con 30 ml de medio de cultivo líquido ISP3 se inocularon 80 μ l de esporas de la cepa *Streptomyces* sp. G63, manteniendo un matraz con medio de cultivo estéril como control. Los matraces se incubaron en un agitador orbital a 150 rpm/ 29°C durante 7 días, recolectando muestras de 1.5 ml a diferentes tiempos. Cada muestra fue centrifugada a 13 000 rpm/ 4°C por 10 minutos, seguida de esterilización usando filtros estériles de 0.22 μ m. De manera paralela, se caracterizaron los sobrenadantes (SN) mediante un barrido espectral en un espectrofotómetro UV-Vis en un intervalo de longitudes de onda de 200 nm a 800 nm.

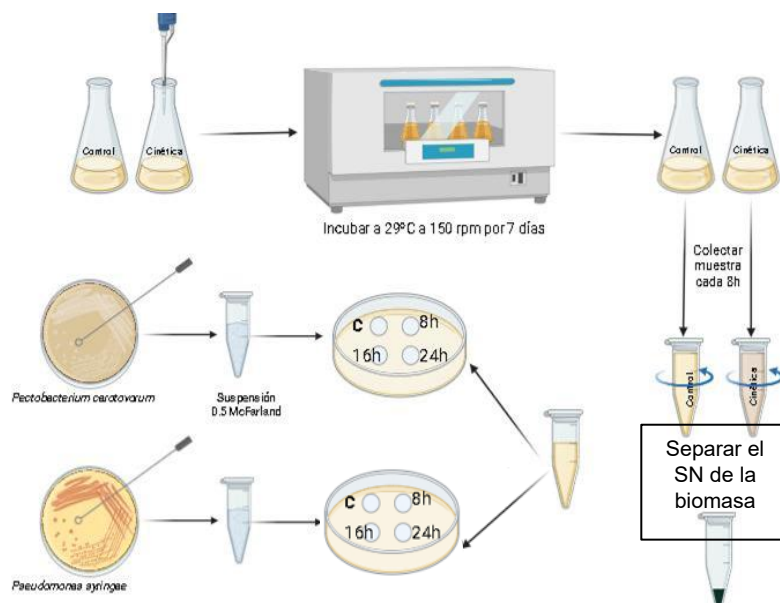


Figura 10. Evaluación del efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana. Creado en <https://BioRender.com>

El ensayo de cinética de producción de metabolitos se realizó por duplicado y con cada sobrenadante obtenido se determinó el PI de cada bacteria fitopatógena por triplicado mediante la técnica de difusión en pozos como se describió previamente (**Figura 10**). El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la fórmula 1.

EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DEL EXTRACTO LIBRE DE CELULAS (EB)

Se evaluó el efecto de temperaturas altas sobre la actividad inhibitoria del extracto libre de células (EB) para lo cual se empleó el extracto obtenido del medio ISP 3 en alícuotas depositadas en microtubos de 1.5 ml. Estos tubos se sumergieron en un baño de agua a 90°C exponiéndolos a diferentes tiempos: 0, 3, 5 y 10 minutos. El efecto de la temperatura sobre la actividad inhibitoria del EB se determinó mediante experimentos de difusión en placa Petri con ambas bacterias patógenas. El experimento se realizó por triplicado.

CARACTERIZACIÓN QUÍMICA

a) *CARACTERIZACIÓN DEL EB MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS*

La caracterización por espectrometría de masas permite conocer el patrón de fragmentación de una estructura química para su correspondiente análisis e interpretación. En este proyecto se utilizó con la finalidad de identificar compuestos químicos que inhiban el crecimiento bacteriano de los fitopatógenos.

Las condiciones que se aplicaron para el análisis son la energía de ionización de 70eV y una temperatura de 220 °C para la correcta sublimación de los compuestos ionizables.

Una vez que se obtuvieron los espectros de masas de los productos de fermentación líquida que presentaron mayor porcentaje de inhibición contra ambos fitopatógenos, se realizó un análisis comparativo con los correspondientes resultados espectrométricos del medio de cultivo líquido estéril y sin inóculo de *Streptomyces* y un compuesto de referencia que es la solución de estreptomycin 10 µg/µl de SigmaAldrich®.

Es necesario destacar que esta es una técnica de análisis instrumental destructiva, ya que tienen lugar procesos físicos y químicos originados por el bombardeo de átomos, por lo que la muestra utilizada no se recuperó. Sin embargo, es crucial resaltar que se ocupan para el análisis de masas cantidades muy pequeñas de muestra (1mg).

En el espectro de masas, la presencia e intensidad de las señales de determinados iones es función de la estructura química del compuesto en cuestión. Los iones son identificables a partir de su masa y abundancia isotópica. Con esta información es posible conocer, definir y concluir las posibles estructuras químicas responsables de la actividad antimicrobiana de los extractos o cultivos trabajados.

4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

a) PURIFICACIÓN DE DNA

Se inocularon 3 ml de medio caldo ISP1 con 30 μ l de esporas de la cepa G63, manteniéndola a 150 rpm/29°C por 72 horas. Las células en crecimiento se centrifugaron a 4700 rpm/4° por 10 minutos. El botón de células se resuspendió con 1 ml de tampón Tris-EDTA 10 mM:10mM en un vórtex y enseguida se repitió el procedimiento para quitar el exceso de medio de cultivo. Las células se resuspendieron en 300 μ l de lisozima (1 mg/ml) dejando incubar a 37°C/ hasta 20 minutos y posteriormente se centrifugaron las células a 13 000 rpm/ 2 minutos. La lisis celular y la purificación de ADN genómico se concluyó utilizando el GenElute Bacterial Genomic DNA kit (SigmaAldrich®) y el DNA genómico purificado se conservó en congelación a -18°C hasta su uso (Figura 12).

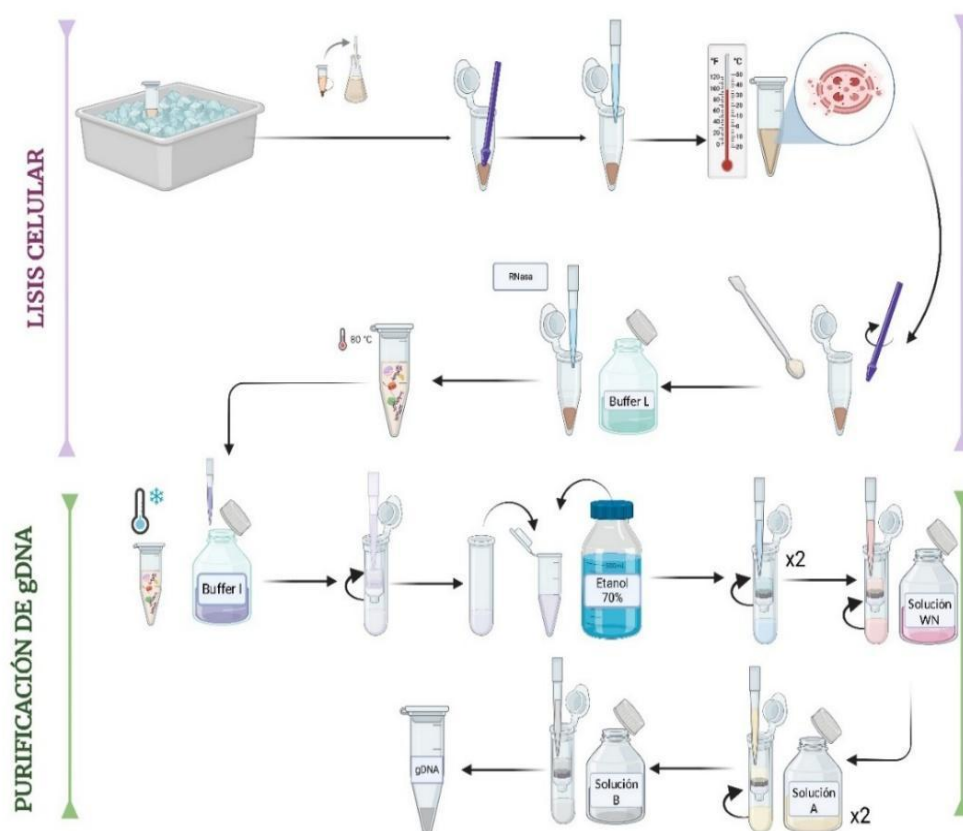


Figura 11. Protocolo de extracción de DNA genómico de bacterias *Streptomyces* tolerantes al herbicida glifosato. Creado en <https://BioRender.com>

b) IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE G63 MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN DEL GEN RIBOSOMAL rRNA 16S.

La identidad del aislado se determinó mediante el análisis de la secuencia parcial del gen ARNr 16S. Para la amplificación del gen 16S las condiciones de PCR se implementaron utilizando la Platinum Taq DNA polimerasa y los oligonucleótidos fD1 (5' CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') y rD1 (5' CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC 3') (Weisburg et al., 1991). El fragmento amplificado se verificó directamente mediante la determinación de la secuencia de nucleótidos de ambas cadenas en Macrogen (Seúl, Corea). Las secuencias se ensamblaron y recortaron utilizando CLC Main Workbench v.6 (QIAGEN®). Las secuencias obtenidas se analizaron por homología con el programa BLASTN Suite contra la base de datos Nucleotide de secuencias de ARNr 16S (bacterias y arqueas) del National Center for Biotechnology Information, *NCBI*, (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se seleccionaron las secuencias con un porcentaje de homología entre 94 y 98 % y se realizó un alineamiento múltiple de secuencias con ClustalΩ (v.2.1), configurado para la máxima precisión. Tras el alineamiento, se eliminaron las regiones ambiguas con Gblocks (v.0.91b). El análisis filogenético se realizó en Phylogeny.fr (<http://www.phylogeny.fr>). El árbol filogenético se reconstruyó con el programa MEGA versión 12 (Kumar S, Stecher G, Suleski M, Sanderford M, Sharma S, and Tamura K 2024).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizaron las pruebas estadísticas utilizando el software libre Past4.03, donde se utilizó la prueba ANOVA de una vía para analizar las diferencias en la inhibición bacteriana entre diferentes tratamientos contra fitopatógenos, asumiendo normalidad en los datos. Y para evaluar la variación en la producción de metabolitos bioactivos a lo largo del tiempo, se aplicó la prueba ANOVA de medidas repetidas, bajo los supuestos de normalidad y homogeneidad de variaciones a lo largo del tiempo, para determinar si existen cambios significativos en la producción del metabolito con respecto al tiempo.

VIII. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En la agricultura las comunidades del suelo están expuestas a mezclas complejas de contaminantes químicos, y sus interacciones y efectos acumulativos en las redes ecológicas del suelo si bien son muy estudiados, aún son poco conocidos. Por lo tanto, es indispensable buscar alternativas sostenibles a base de microorganismos que toleren las condiciones estresantes a las que se enfrentan. Usar los metabolitos de microorganismos funcionales de acción rápida podría ayudar a limitar los efectos invasivos de la manipulación del microbioma como el desequilibrio de la homeostasis microbiana que posteriormente podría alterar el equilibrio ecológico.

Los patógenos vegetales como *Pectobacterium carotovorum* y *Pseudomonas syringae*, son parte de los patógenos bacterianos oportunistas que afectan actualmente a los cultivos agrícolas causando la enfermedad de la podredumbre blanda y el tizón bacteriano respectivamente (Miller et al., 2022). Estas bacterias dependen de la capacidad de entrada, superación de la respuesta del hospedador y efectuar la enfermedad para infectar a las plantas.

Las bacterias *Streptomyces* son especies ubicuas en el suelo que utilizan su maquinaria metabólica para funciones como maximizar la absorción de nutrientes hasta la producción de compuestos que ayudan a la asociación con plantas en forma de promoción de su crecimiento y la supresión de enfermedades según los estudios de Khan et al. (2023) y Shepherdson et al. (2022).

1. REACTIVACIÓN DE LAS CEPAS DE *Streptomyces* TOLERANTES A GLIFOSATO

La presencia de glifosato y herbicidas a base de glifosato en diversos entornos como el suelo, el agua y las aguas residuales, donde las concentraciones de antibióticos son típicamente bajas, puede aumentar la presión selectiva donde se inhiben las bacterias sensibles a glifosato y a antibióticos y solo sobreviven y proliferan las cepas tolerantes (Zerrouki et al., 2024)

En este sentido, la función principal de las esporas de *Streptomyces* es salvaguardar la información genética durante condiciones desfavorables y, en consecuencia, difundirla en nuevos nichos (Bobek et al., 2017).

Las esporas tomadas de 30 cepas de actinomicetos del banco Germoplasma del CIATEJ fueron obtenidas del muestreo en un campo con estrés abiótico inducido por la aplicación recurrente de glifosato, de las cuales se obtuvieron un total de 18 cepas viables después de 14 días en crecimiento en agar medio ISP-3 (**Cuadro 2**), que fueron clasificadas como *Streptomyces* sp. debido a su morfología macroscópica con la presencia de pseudomicelio y microscópica con el hallazgo de

estructuras de micelio con pseudohifas delgadas enredadas, dando una apariencia peluda.

Cuadro 2. Crecimiento y selección de las cepas tolerantes a diferentes concentraciones de glifosato, el símbolo (+) cepa indica que la cepa fue viable, y el símbolo (-) cepa inviable indica que no lo fue.

Cepa	Viabilidad	Cepa	Viabilidad	Cepa	Viabilidad
G14	+	G46	+	G56	+
G26	-	G47	-	G59	+
G27	+	G48	-	G61	-
G29	+	G49	+	G62	+
G40	-	G50	-	G63	+
G41	+	G51	+	G64	-
G42	-	G52	-	G65	+
G43	+	G53	+	G67	-
G44	+	G54	-	G70	+
G45	+	G55	-	G71	+

2. BUSQUEDA DE CEPAS PRODUCTORAS DE METABOLITOS ANTIBACTERIANOS

Las cepas viables de *Streptomyces* sp., inhibieron el crecimiento de los patógenos vegetales, *Pectobacterium carotovorum* (Pc) y *Pseudomonas syringae* (Ps). El análisis estadístico ANOVA de un factor con $p=0.05$ concluyó que hay diferencias significativas en los diferentes tratamientos. Se reveló a quince de los aislamientos de las cepas de *Streptomyces* sp. que producen metabolitos antimicrobianos efectivos en la inhibición del crecimiento de Pc, siendo la cepa G27, G49, G53, G59 y G63 las que generaron un porcentaje de inhibición mayor que el resto, 73.61, 73.26, 72.82, 72.97 y 75.42 % respectivamente (**figura 13**). En la **figura 14**, cinco cepas inhibieron el crecimiento de Ps, las cepas G45, G46 y G56 inhibieron a ambos patógenos en un porcentaje menor al 45%, la cepa G29 inhibió a ambos patógenos en proporción desigual, >65% contra Pc y >45% contra Ps. Por otro lado la cepa G63 presentó el porcentaje de inhibición más destacable con 81.8% contra Ps. Como resultado y teniendo en cuenta como criterios de selección el mayor porcentaje de inhibición (PI) y la inhibición del crecimiento bacteriano para ambos fitopatógenos vegetales, se seleccionó a la cepa de *Streptomyces* sp. G63 para las evaluaciones posteriores.

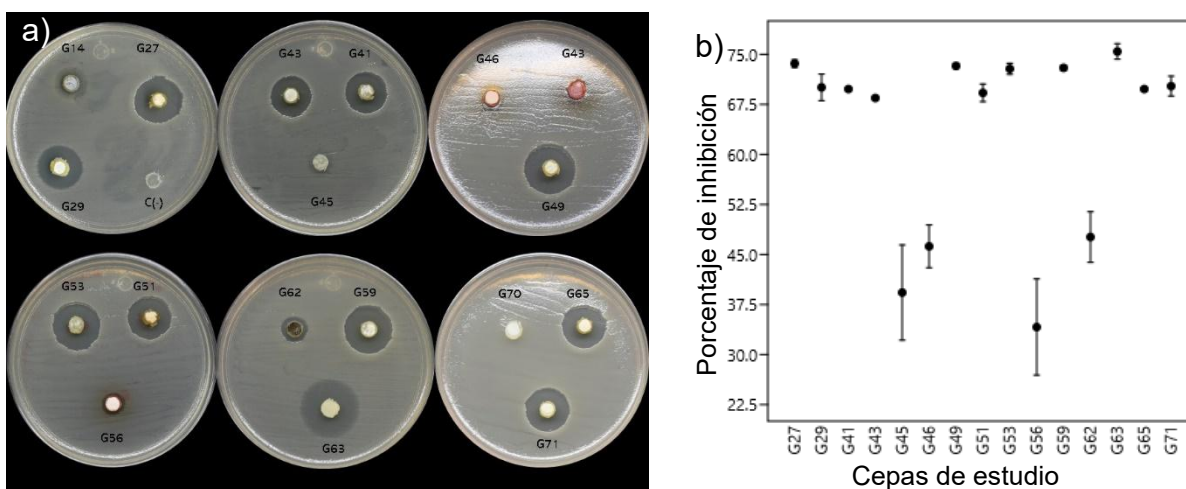


Figura 12. Inhibición del crecimiento de *Pectobacterium carotovorum* por *Streptomyces* spp. a) Formación de halos de inhibición mediante discos de agar con micelio de las diferentes cepas de *Streptomyces* viables. b) Porcentaje de Inhibición de cada cepa de *Streptomyces* sp. El ANOVA a $p=0.05$ muestra diferencias estadísticas significativas.

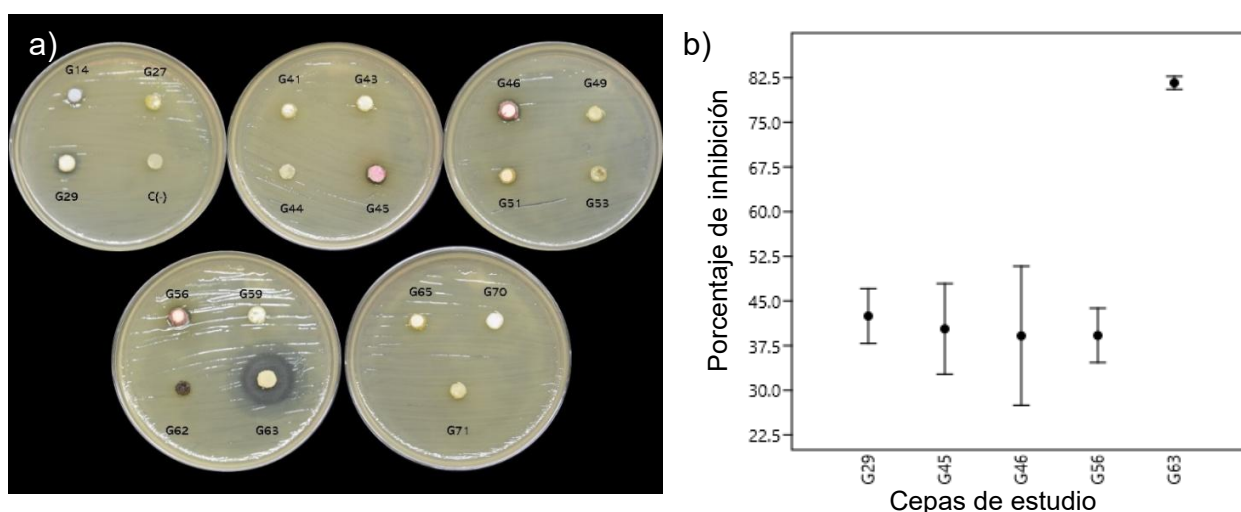


Figura 13. Inhibición del crecimiento de *Pseudomonas syringae*, por *Streptomyces* sp., a) Formación de halos de inhibición mediante discos de agar con micelio de las diferentes cepas de *Streptomyces* viable, b) Porcentaje de inhibición de cada cepa de *Streptomyces* sp. El ANOVA a $p=0.05$ muestra diferencias estadísticamente significativas.

Los metabolitos producidos por la cepa G63 en medio ISP-3 se compararon con antibióticos de uso común en agricultura contra patógenos vegetales (gentamicina 10 mg/ml y estreptomycin 20 mg/ml) como referencia a la inhibición del crecimiento de los fitopatógenos de interés, **figura 15 y 16**. Los metabolitos de la cepa G63 mostraron un mayor porcentaje de inhibición ($\bar{x}=70.94\%$) contra *Pectobacterium carotovorum* que los tres antibióticos de referencia (amikacina 67.17%, gentamicina

68.48% y estreptomina 66.41%). Sin embargo, el antibiótico de referencia amikacina (30 mg/ml) generó porcentajes de inhibición superiores contra *Pseudomonas syringae* ($\bar{x}=76.06\%$), este antibiótico semisintético no es utilizado en la agricultura y su uso solo está indicado para infecciones en humanos graves, es decir, contra bacterias farmacorresistentes, por lo que su introducción en agricultura podría desencadenar la aparición de genes de resistencia transferibles a través de la cadena alimentaria. Por otro lado, la concentración usada de los antibióticos de referencia es mayor a la usada en promedio en agricultura: estreptomina 0.96 g/L (ANASAC, n.d.) y gentamicina 0.46 g/L (SummitAgro, n.d.), ya que la concentración depende del cultivo y el microorganismo al que va dirigido.

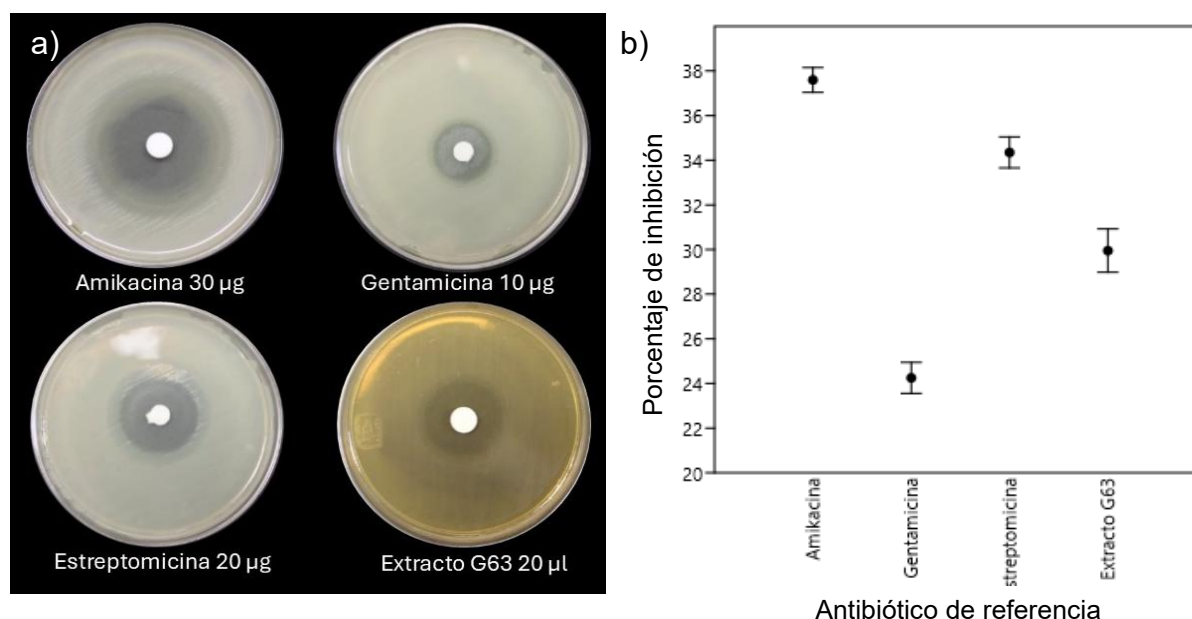


Figura 14. Tratamiento de *Pseudomonas syringae* con antibióticos conocidos y el extracto G63. A) Halos de inhibición generados en cada uno de los tratamientos, b) Distribución de los porcentajes de inhibición (%) producidos por cada tratamiento. El estadístico ANOVA de un factor a $p=0.05$ muestra diferencias estadísticamente significativas.

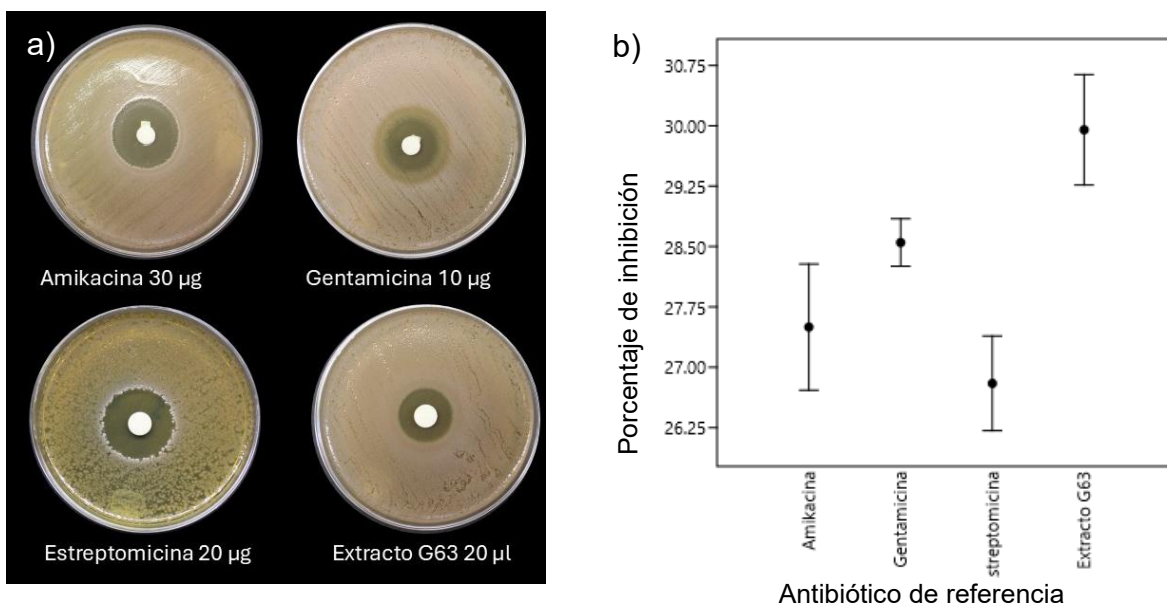


Figura 15. Tratamiento de *Pectobacterium carotovorum* con antibióticos conocidos y el extracto G63. A) Halos de inhibición generados en cada uno de los tratamientos, b) Distribución de los porcentajes de inhibición (%) producidos por cada tratamiento. El estadístico ANOVA de un factor a $p=0.05$ muestra diferencias estadísticamente significativas.

3. EFECTO DEL MEDIO DE CULTIVO EN LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ACTIVOS DE LA CEPA G63

En el ensayo se determinó que el medio de cultivo ISP-3 es en el que se favorece la producción de metabolitos secundarios por parte de la cepa de *Streptomyces* sp. G63 contra las bacterias fitopatógenas de interés, ya que se obtuvieron mayores PI en el tratamiento contra ambos fitopatógenos, 71.18% *P. syringae* y 76.52% *P. carotovorum*. En la **figura 17**, se destaca que la cepa G63 produce metabolitos bioactivos que inhiben el crecimiento bacteriano de Ps en todos los medios de cultivo probados, sin embargo, los mayores porcentajes de inhibición fueron generados por el crecimiento de la cepa en el medio ISP-2 e ISP-3 (68.93% y 71.18% respectivamente). Por otro lado, la **figura 18** muestra que los medios de cultivo PDA, ISP-2 e ISP-3 son adecuados para la producción de metabolitos bioactivos contra el Pc.

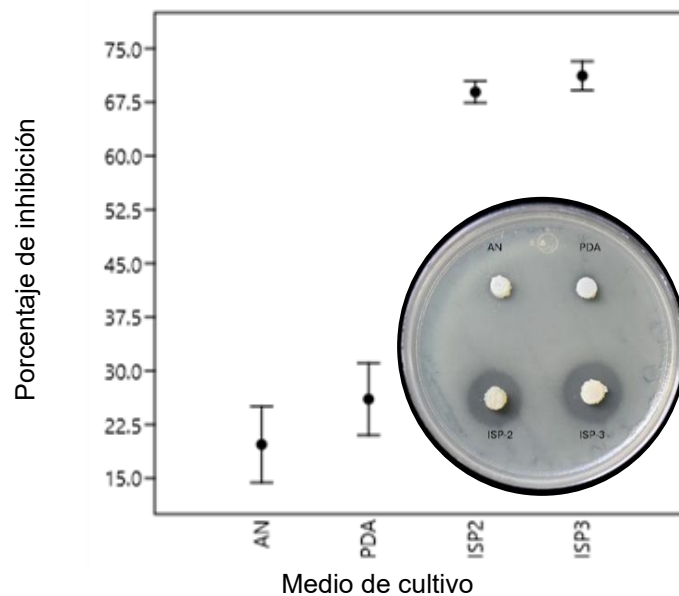


Figura 16. Los metabolitos de *Streptomyces* sp G63 difundidos en los medios de cultivo, agar nutritivo, papa- dextrosa, ISP-2 e ISP-3 fueron los tratamientos contra el fitopatógeno *P. syringae*. El estadístico ANOVA de un factor, con $p=0.05$ demuestra que hay una diferencia significativa en la inhibición con los diferentes tratamientos y el gráfico muestra que los medios de cultivo ISP-2 e ISP-3 son los que favorecen en mayor medida la producción de metabolitos bioactivos contra *P. syringae*.

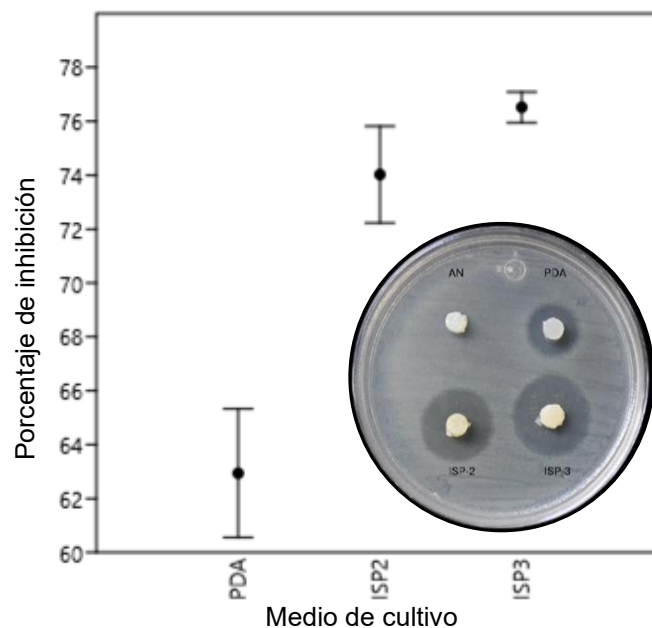


Figura 17. Los metabolitos de *Streptomyces* G63 difundidos en los medios de cultivo, agar nutritivo, papa- dextrosa, ISP-2 e ISP-3 fueron los tratamientos contra el fitopatógeno *P. carotovorum*. El estadístico ANOVA de un factor con $p=0.05$ demuestra que hay una diferencia significativa en la inhibición con los diferentes tratamientos. El gráfico muestra que el medio de cultivo ISP-2 e ISP-3 son los que favorecen en mayor medida la producción de metabolitos bioactivos contra *P. carotovorum*.

En la **figura 19**, se presenta en A) dos productos de fermentación que contienen metabolitos que inhiben el crecimiento de *P. carotovorum*, ISP-2 con un PI de 60.72% e ISP-3 con 78.53%, y en B) se muestra solo el producto de fermentación en medio líquido ISP-3 con un PI de 70.75%, es eficaz en el tratamiento contra *P. syringae*. Por lo tanto, se determinó la eficiencia del producto de fermentación de *Streptomyces* sp. G63 en medio líquido ISP-3, favoreciendo la producción y difusión de metabolitos secundarios bioactivos al ambiente acuoso para ser usado contra los fitopatógenos de interés.

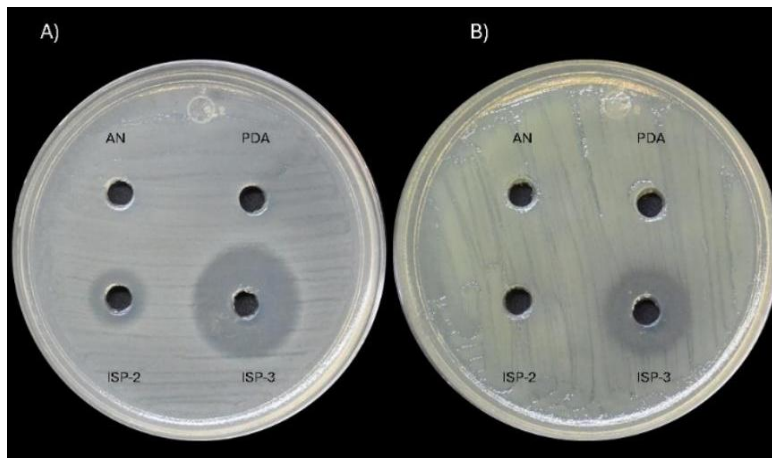


Figura 18. Evaluación de los productos de fermentación líquida de la cepa de *Streptomyces* sp. G63 en cuatro diferentes medios de cultivo líquido. A) corresponde a la inhibición del crecimiento de *Pectobacterium carotovorum*, y en B) la inhibición del crecimiento de *Pseudomonas syringae*.

En el **cuadro 3** se resumen los resultados de la selección del medio adecuado para la producción de metabolitos secundarios bioactivos producidos por *Streptomyces* sp. G63 contra los fitopatógenos de estudio (**figura 12-18**), donde se observa que la producción de metabolitos bioactivos es dependiente del medio de cultivo, lo que afecta su espectro de acción y la efectividad contra los fitopatógenos.

En agar nutritivo (AN) se producen compuestos antimicrobianos contra Ps, pero no contra Pc. En agar papa-dextrosa se producen compuestos contra Pc mayoritariamente. En agar ISP-2 se generan compuestos que inhiben de manera similar a ambos patógenos vegetales. Destacando que los compuestos producidos en los medios de cultivo anteriores no se producen o no son estables en medio líquido, limitando la observación de un efecto biológico.

Agregando a lo anterior, el medio ISP-3 resulto ser más efectivo para la producción de metabolitos bioactivos sin alterar su respuesta contra ambos fitopatógenos en condiciones de cultivo sólido y líquido.

Cuadro 3. Evaluación de los compuestos de *Streptomyces* sp. G63 que se difunden al medio ISP-3 con respecto a antibióticos de referencia.

Nombre de los fitopatógenos	Porcentaje de inhibición (%)										
	AN	PDA	ISP2	ISP3	CN	PDB	CISP-2	CISP-3	AMK	GEN	STP
<i>Pectobacterium carotovorum</i>	-	62.94	74.03	76.52	-	-	60.73	78.54	67.27	68.48	66.41
<i>Pseudomonas syringae</i>	19.73	26.05	68.93	71.19	-	-	-	70.76	76.06	62.88	73.80

AMK= amikacina, GEN= gentamicina, STP= estreptomina
 (-)= sin actividad, = la inhibición de la muestra excede al del antibióticos de referencia, = la inhibición de la muestra es similar a la de los antibióticos de referencia

Es importante destacar que la fuente de carbono en el medio de cultivo representa una señal reguladora que activa o reprime las vías de biosíntesis de antibióticos, así como en qué medida se hace. La evidencia reporta que en primer lugar la glucosa, seguida del glicerol (**figura 20**), como fuente de carbono es priorizada para el metabolismo primario y reprime la producción de antibióticos induciendo el mecanismo de “represión catabólica por carbono”, (CCR, por sus siglas en inglés) (Sánchez et al., 2010; Barka et al., 2016). De este modo el medio de cultivo nutritivo, papa-dextrosa e ISP-2 simulan un ambiente rico en nutrientes solubles que contiene como fuente de carbono a la dextrosa (glucosa), la cual induce la CCR y a medida que se agotan los nutrientes activan la vía de señalización de la N-acetilglucosamina (GlcNAc) derivada de la pared celular como señal de estrés nutricional y da lugar al inicio del metabolismo secundario, en particular, para la producción de antibióticos. Por lo que a pesar de que la glucosa reprime la biosíntesis de antibióticos, a medida que se agota, el estreptomiceto utiliza los recursos disponibles para generar una respuesta de defensa ante el posible ataque de otros microorganismos.

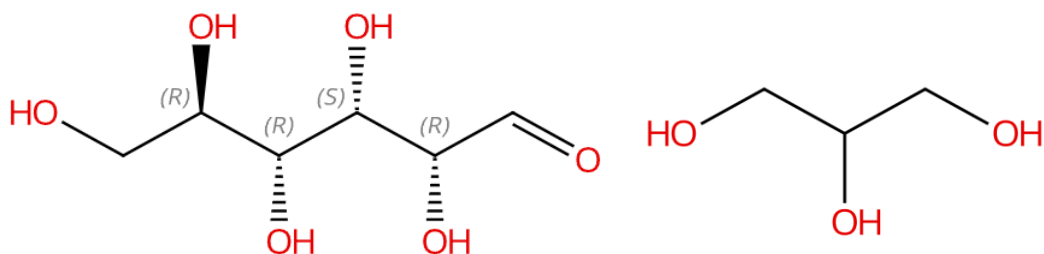


Figura 19. Estructuras químicas de a) dextrosa y b) glicerol.

Por otro lado, se ha descrito que las fuentes de carbono complejas favorecen el crecimiento sostenido y el inicio del metabolismo secundario, debido a su metabolismo quimioheterótrofo que permite hidrolizar polisacáridos complejos y macromoléculas naturales (Barka et al., 2016).

El medio ISP-3 se compone de avena y de acuerdo con los componentes nutricionales de la avena, **cuadro 4**, el mayor componente nutricional proviene de los carbohidratos aportados por el almidón, que mediante el tratamiento térmico por hervido para la solubilización del agar y la esterilización por vapor a alta temperatura (autoclave) del medio de cultivo tanto sólido como líquido, rompe los gránulos de avena y aumenta la capacidad de unión y absorción de agua, lo cual modifica las cadenas moleculares del almidón, haciendo que las cadenas cortas de amilosa (**figura 21**) proliferen en una estructura más organizada mejorando la gelatinización y la susceptibilidad a la hidrólisis enzimática (Rostamabadi et al., 2022). Por lo tanto, el tratamiento hidrotérmico de la avena es necesario para la conversión de nutrientes necesarios para el desarrollo de *Streptomyces* sp. G63 por enzimas, por ejemplo, amilasas, proteasas, lipasas, etc (Jangra et al., 2025).

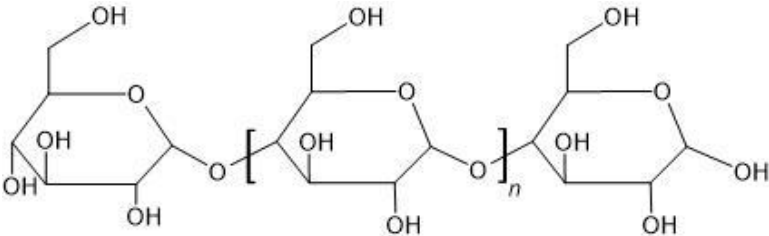


Figura 20. Estructura química de las cadenas de amilosa.

Cuadro 4. Componentes nutricionales de la avena en peso seco. Recuperado de Rasane et al. (2013).

Componente de la avena	Disponibilidad en la avena
Almidón	60%
Proteínas	Total: 11-17% 80% globulinas 15% prolaminas 5-6% glutelinas 1-12% albumina
Lípidos	5-9%
Fibra dietética	2.3-8.5% β-glucano
Fitoquímicos	α -tocotrienoles y α-tocoferoles
Minerales traza	0.54% calcio 0.047% hierro
Vitaminas	0.001% riboflavina 0.032% niacina 0.001% triptófano

Dicho de otra manera, la avena no contiene glucosa libre, sino que ésta se encuentra en forma amilosa, así como en forma de betaglucanos (β -glucanos) que son moléculas de glucosa unidas por enlaces glucosídicos ($1 \rightarrow 3$) y ($1 \rightarrow 4$), principalmente enlaces ($1 \rightarrow 4$) y son reconocidos por ser fibras solubles, **figura 21**, que aportan una fuente de carbono adecuada para las bacterias, los prebióticos (None Vaishnavi & None Mamta, 2024). Cabe destacar que la proteína de la avena tiene un perfil rico en ciertos aminoácidos esenciales como la glutamina, la lisina y la treonina, y es más baja en prolina en comparación con otros granos de cereales.

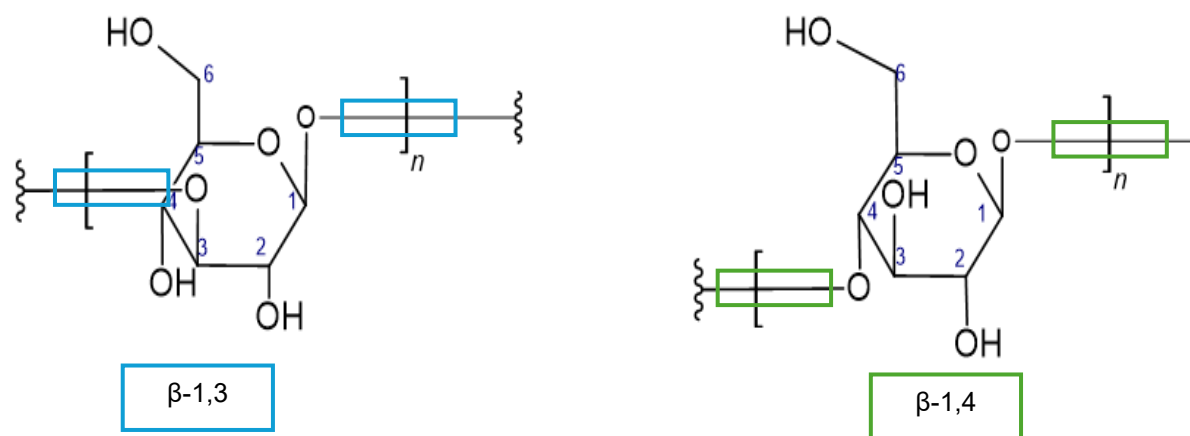


Figura 21. Estructura química de los betaglucanos, donde se destaca la naturaleza de los enlaces glucosídicos.

Además, se genera un efecto sinérgico contra los patógenos vegetales dado por los compuestos bioactivos producto de la fermentación y compuestos orgánicos volátiles (VOC, por sus siglas en inglés) producidos por la cepa G63, que son moléculas que forman parte del *quorum sensing*, así como antibióticos y fungicidas.

4. CARACTERIZACIÓN

4.1. RESULTADOS DE LA ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS VS TIEMPO Y BARRIDO ESPECTRAL

Tras realizar la cinética de producción de metabolitos se confirmó que los antibióticos se producen durante la fase tardía del crecimiento (Alam et al., 2022) a través de diferentes pasos de diversas vías enzimáticas.

Se determinó que existe una diferencia significativa en la producción de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria, siendo entre las 24 y 40 horas de fermentación cuando da comienzo la producción de metabolitos secundarios bioactivos contra los fitopatógenos de interés (ANOVA de medias repetidas $p=0.05$).

Simultáneamente, en la cinética de producción de metabolitos secundarios se encontró que en los tiempos correspondientes al inicio y término del metabolismo secundario se establecen picos máximos con longitud de onda de 335 a 344 nm. Considerando una distribución normal y al realizar el estadístico ANOVA de un factor con $p=0.05$ se demuestra que hay una diferencia significativa en la producción de metabolitos secundarios del matraz A y el matraz B, pudiendo así demostrar que a las 94 horas de incubación se obtiene la longitud máxima de absorción, correlacionado con una producción máxima de metabolitos antimicrobianos. Los datos se resumen en el **cuadro 5**.

Cuadro 5. Evaluación de la producción de metabolitos secundarios bioactivos contra *P. carotovorum* y *P. syringae*.

Tiempo (h)	Porcentaje de inhibición (%)		λ máxima (200-800 nm)
	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	
C (-)	0	0	220
16	0	0	229
24	0	0	306
40	81.40097	66.96098	335
48	82.46965	69.13375	338
64	82.85572	71.40876	340
88	83.36407	72.44589	343
94	83.51238	73.3615	344
160	82.81908	71.23073	343
168	83.11905	71.14445	341

A medida que los componentes funcionales de la avena son consumidos por el estreptomiceto, entre las 24 y 40 horas tras el inicio de la fermentación sumergida, da inicio el metabolismo secundario que genera compuestos que no son necesarios para el desarrollo y multiplicación, pero les proporcionan una ventaja competitiva en comparación con otros microorganismos, debido principalmente a que estos metabolitos ayudan en su protección y limitan la competencia por nutrientes, además de que les permiten la comunicación activa (*quorum sensing*) con otras especies (Alam et al., 2022).

En este sentido y a medida que se acumulan los compuestos bioactivos, el máximo de actividad inhibitoria contra los fitopatógenos se encuentra a las 94 horas tras el inicio del crecimiento bacteriano, además de que mediante el análisis espectrofotométrico de la mezcla de compuestos producidos por el metabolismo de *Streptomyces* sp. G63 en un medio acuoso se reveló una banda de absorción

distintiva en la región cercana al UV-visible, con una longitud de onda máxima de absorción ($\lambda_{m\acute{a}x}$) de 344 nm.

Se infiere que el compuesto que aporta mayoritariamente a obtener la longitud de absorción máxima de 344 nm se puede atribuir a compuestos con grupos químicos cromóforos como el ácido indol-3-acético reportado como un promotor de crecimiento vegetal (PCV) y ciertos antibióticos como las tetraciclinas producidos por diferentes cepas de *Streptomyces*.

4.2. EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA ESTABILIDAD DEL EB

Tras la evaluación de la inhibición bacteriana contra los fitopatógenos de interés del extracto obtenidos después del tratamiento térmico se determinó que los metabolitos secundarios bioactivos mantienen su actividad inhibitoria, por lo que, las especies químicas con actividad antibacteriana son estables a temperatura de 90°C, véase **figura 23**.

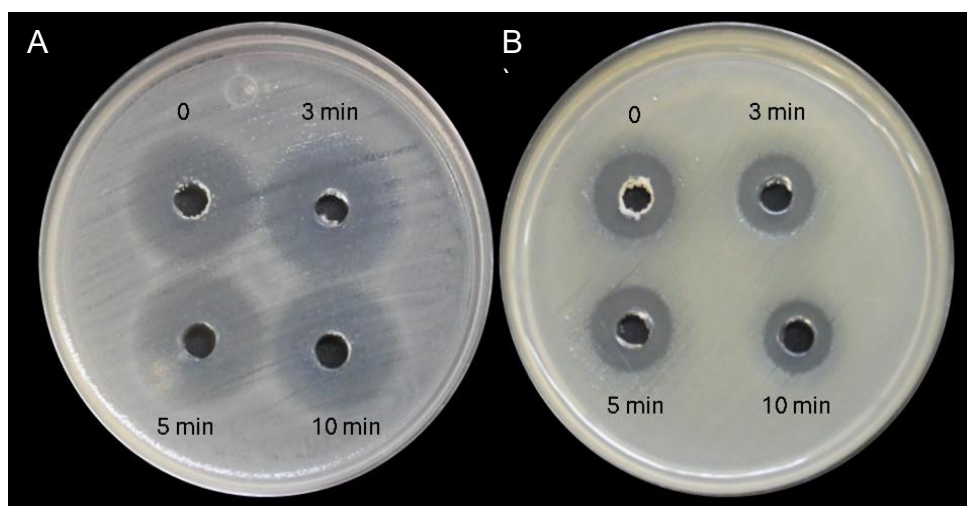


Figura 22. El extracto obtenido tras la fermentación líquida en medio ISP-3 se sometió a una temperatura de 90°C durante 0, 2, 5 y 10 minutos. Considerando una distribución normal y al realizar el estadístico ANOVA de un factor con $p=0.05$, A) no hay una diferencia significativa en la inhibición con los diferentes tratamientos contra Pc y B) demuestra que hay una diferencia significativa en la inhibición con los diferentes tratamientos contra Ps.

Las tasas de degradación en matriz acuosa sugieren que a partir de los 100°C los antibióticos tienden a degradarse en el siguiente orden: β -lactámicos = tetraciclinas (más termolábiles) > lincomicina > anfenicoles > sulfonamidas > oxfendazol > levamisol (más termoestable) basados en métodos de cromatografía líquida y pruebas de actividad microbiológica (Tian et al., 2017).

Finalmente, al analizar la estabilidad térmica del extracto obtenido a 90°C, se reveló que el extracto pierde efectividad contra *P. syringae* pero no contra *P. carotovorum* después de la exposición de más de 5 minutos. Tal resultado sugiere que la inhibición contra *P. syringae* es resultado de la sinergia entre al menos dos compuestos bioactivos, de los cuales uno no es termoestable a 90°C perdiendo su estructura química y, por ende, su actividad inhibitoria.

4.3. ANÁLISIS DEL EXTRACTO BIOACTIVO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS

4.3.1. ANÁLISIS POR IMPACTO ELECTRÓNICO

La estreptomycinina se eligió como antibiótico de referencia para este ensayo, ya que, tras compararse con el extracto libre de células (EB) proveniente de una fermentación de 7 días en medio ISP-3, demostró generar porcentajes de inhibición análogos a los de dicho extracto (cuadro 3).

La técnica de ionización de baja resolución y el modo de ionización conocido como impacto electrónico, IE, es utilizado para llevar a cabo la ionización y fragmentación de la muestra, permitiendo conocer los pesos moleculares de las especies iónicas generadas.

El análisis instrumental por espectrometría de masas reveló la presencia de señales con relación masa/carga (m/z) atribuibles a uno de los compuestos bioactivos en el EB, que es la estreptomycinina. La asignación es soportada respecto al análisis comparativo del patrón de fragmentación obtenido para la estreptomycinina SigmaAldrich® (**figura 24**) y para el EB (**figura 25**), donde se presenta la misma señal distintiva del fragmento iónico más estable conocida como pico base con un valor de 244 m/z , aunado a las señales de los fragmentos iónicos con m/z de 40, 64, 185 y 303, los cuales son característicos del patrón de fragmentación de la estreptomycinina. Además, se logran observar fragmentos no identificables que se registran con valores de m/z de 85, 144, 149, 159, 257, 285 y 370. Estas señales sugieren la presencia de otros compuestos presentes en la muestra, un análisis instrumental cromatográfico se propone para solventar la identificación.

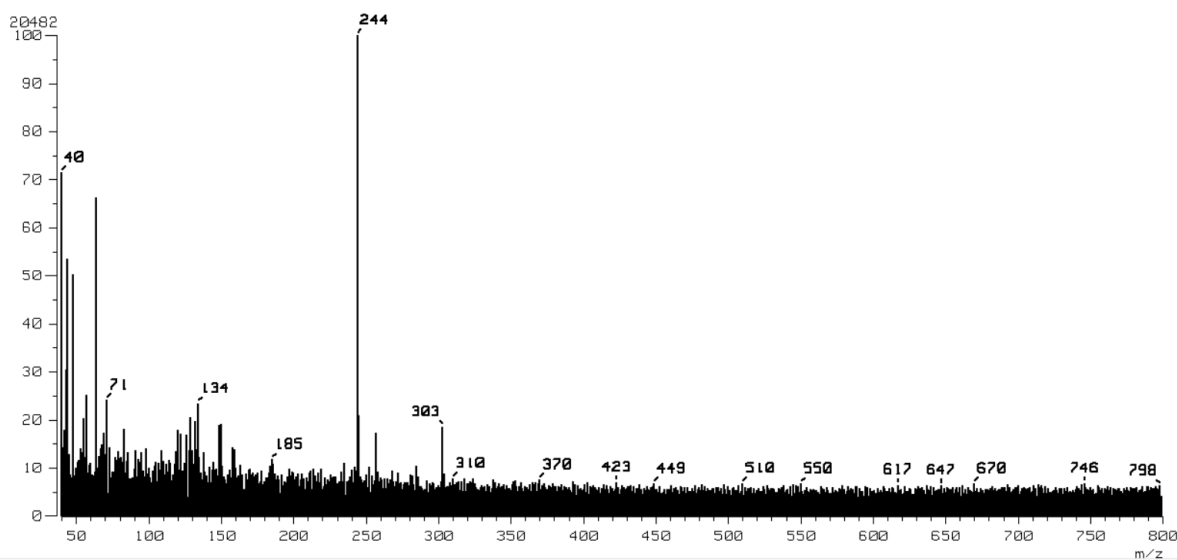


Figura 23. EM-IE del antibiótico estreptomicina Sigma Aldrich. En el patrón de fragmentación (71, 134, 185, 244 y 303 m/z) se presenta como señal distintiva el pico base con un valor de 244 m/z, procedente de la fragmentación de la molécula completa con fórmula condensada $C_{21}H_{39}O_{12}N_7$.

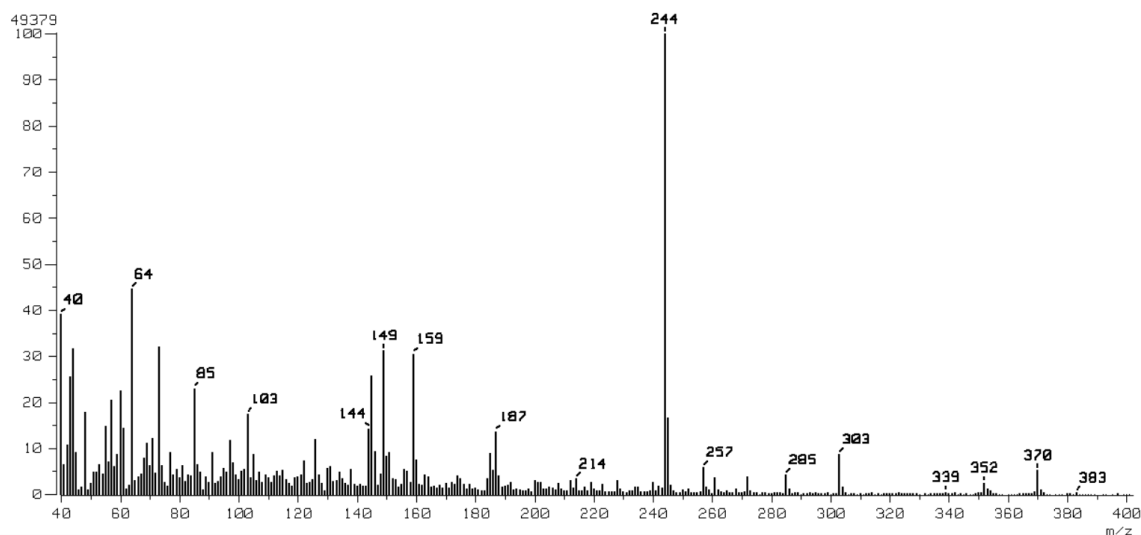


Figura 24. Patrón de fragmentación de las especies químicas ionizables por el método de ionización de impacto electrónico del extracto 4 (Espectro de masas-Impacto electrónico EM-IE). Se observa el pico base en un valor de m/z de 244, que corresponde a la especie ionizada más estable y atribuible a una de las señales más significativas de la fragmentación de estreptomicina. (Además se observan las señales complementarias de estreptomicina y señales de otros compuestos a identificar, con valor de 40, 64, 85, 103, 104, 145, 149, 159, 187, 303 y 370 m/z).

I4.4. IDENTIFICACIÓN DE LA ESTREPTOMICINA COMO EL COMPUESTO PRODUCIDO POR LA CEPA G63

Con la finalidad de interpretar los espectros de masas, se propuso una vía de fragmentación para ubicar los posibles fragmentos iónicos con su fórmula

condensada y valor de m/z que se originan de la ionización de estreptomicina (figura 26) y del ácido indol-3-acético (figura 26).

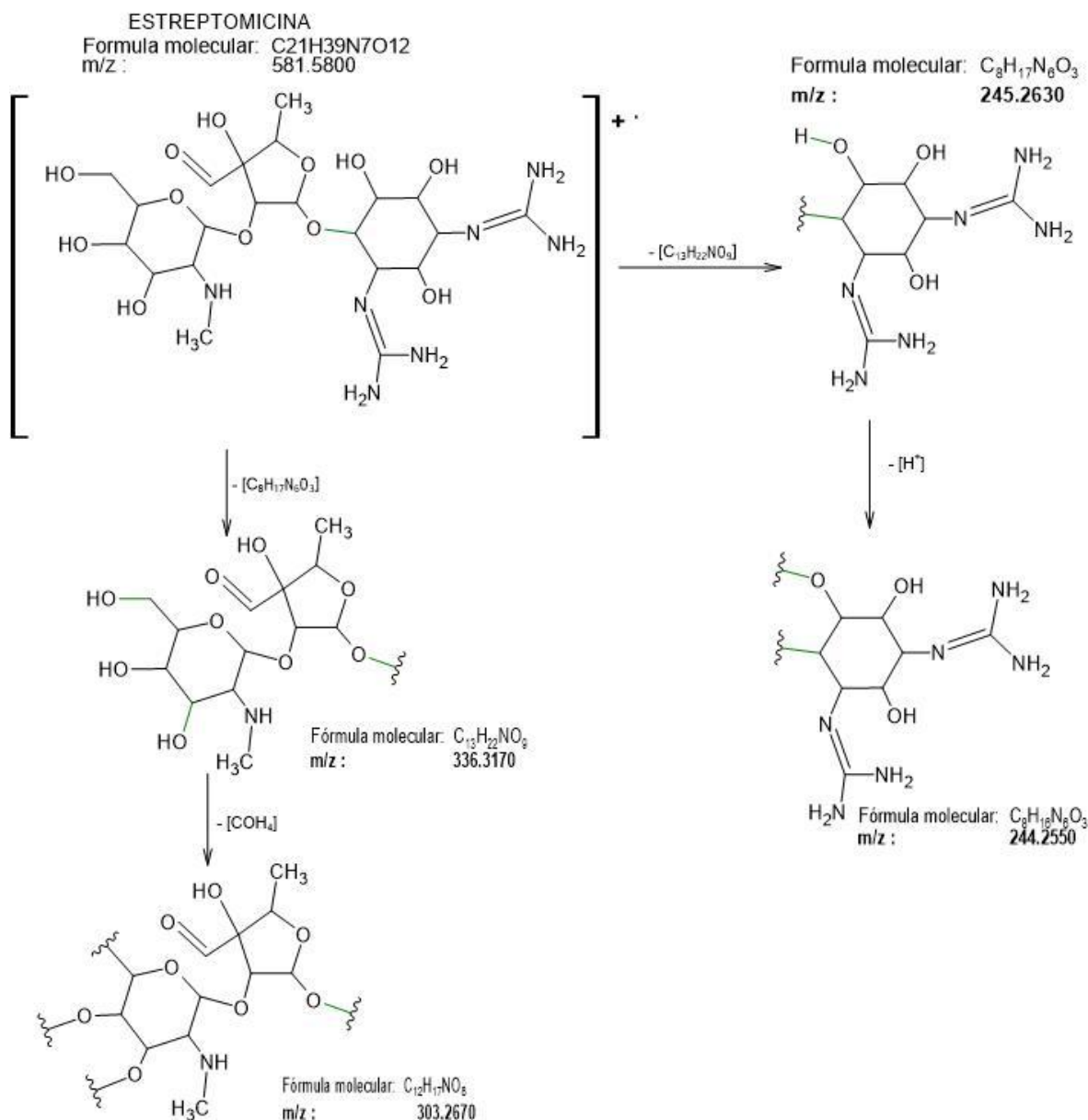


Figura 25. Vía de fragmentación iónica propuesta para la molécula de estreptomicina que presenta las especies químicas energéticamente más estables respecto al tiempo.

Por otro lado, en la **figura 27** se presentan los fragmentos iónicos con m/z de 130 y 44 que sugieren la presencia de ácido indol-3-acético (AIA) en el EB, según el registro espectral del National Institute of Standards and Technology (NIST) y el del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japan).

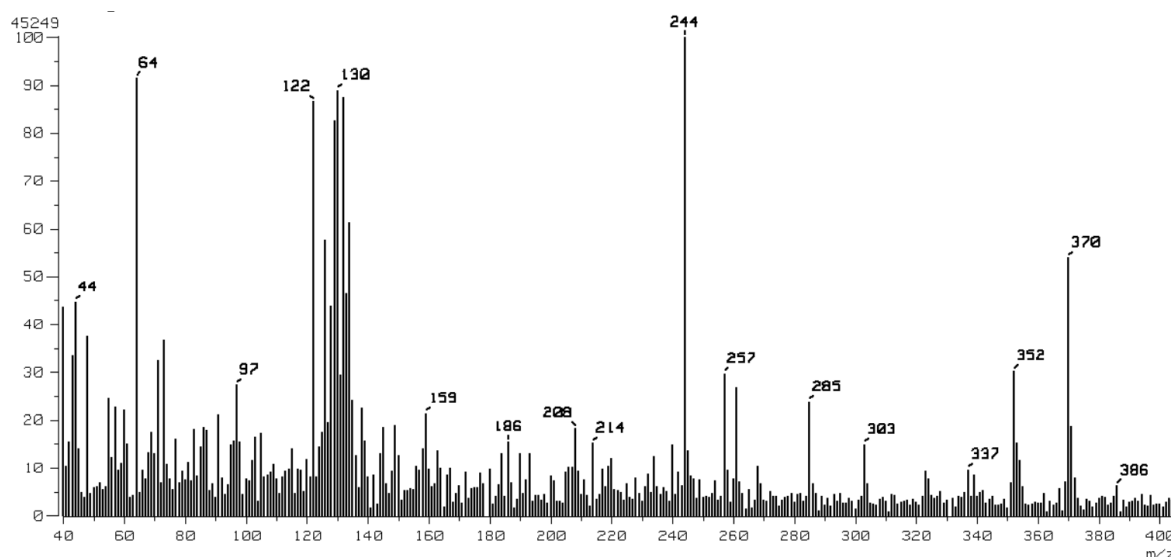


Figura 26. EM-IE del extracto 4 (EB). En el patrón de fragmentación a medida que los compuestos presentes en la muestra se subliman, se presenta como señal distintiva el pico base con un valor de 244 m/z, procedente de la especie ionizada más estable de la estreptomicina. Así mismo se presentan los fragmentos iónicos con m/z de 130 y 44, señales características del ácido indol-3-acético (Indoleacetic Acid, 2025), y otros fragmentos iónicos a identificar, con valor de 97, 122, 208, 214, 257, 285 m/z.

La auxina conocida como ácido indol-3-acético (AIA) es una fitohormona que influye en la división celular, elongación, diferenciación y desarrollo del fruto, así como en la expansión de las paredes celulares de las raíces de las plantas, afectando la arquitectura de la raíz, la absorción de nutrientes y la resistencia a varios estreses abióticos como la sequía, la salinidad y la toxicidad de metales pesados, mejorando la resiliencia de las plantas (Etesami & Glick, 2024). Se ha detectado AIA en diferentes cepas de *Streptomyces* sp. (Dias et al., 2017; Myo et al., 2019) que promueven el crecimiento vegetal, acompañados de VOC, mencionando la importancia de las cepas de *Streptomyces* como elementos de la rizosfera, formando la asociación actinorriza.

Considerando que el medio de cultivo es adecuado para la síntesis de AIA ya que contiene triptófano, el cual es el aminoácido precursor de las vías más comunes de síntesis de AIA de acuerdo con Etesami and Glick (2024), y al observar la presencia de más de una especie química ionizable, se encontró el patrón de fragmentación del AIA que se muestra en la **figura 28**. El patrón de fragmentación indica que el fragmento iónico más estable corresponde a una m/z de 130 y su naturaleza química que demuestra en la **figura 29**, dicho fragmento se encuentra en el espectro de masas presentado en la **figura 26**.

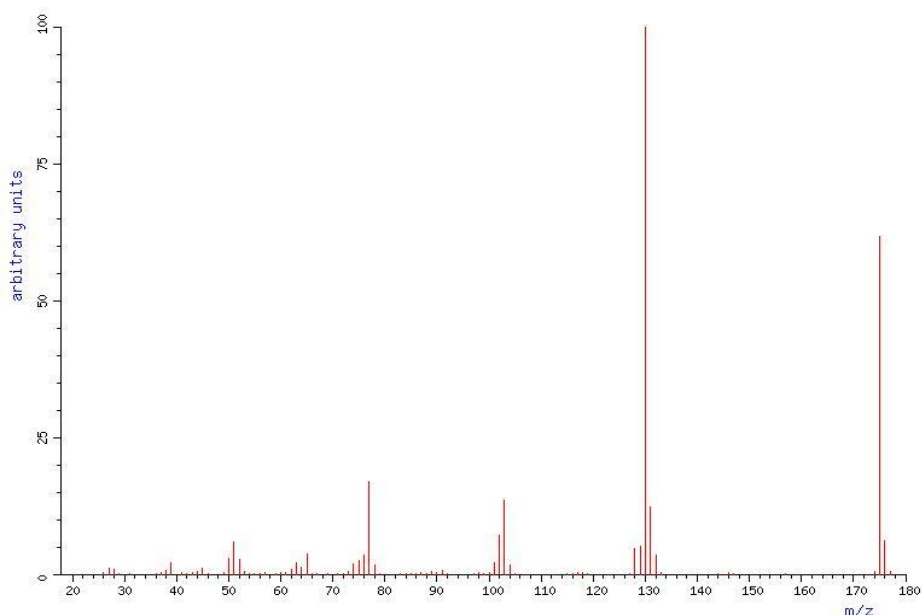


Figura 27. Patrón de fragmentación producido por la técnica de espectrometría de masas con la técnica de ionización electrónica a 120°C y 70 eV, del ácido indol-3-acético. Los datos del "Integrated Spectral Data Base System of Organic Compounds" se obtuvieron del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Japan) ID WMSNW9602 (87-51-4 Mass Spectrum | CAS SciFinder, n.d.).

ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO

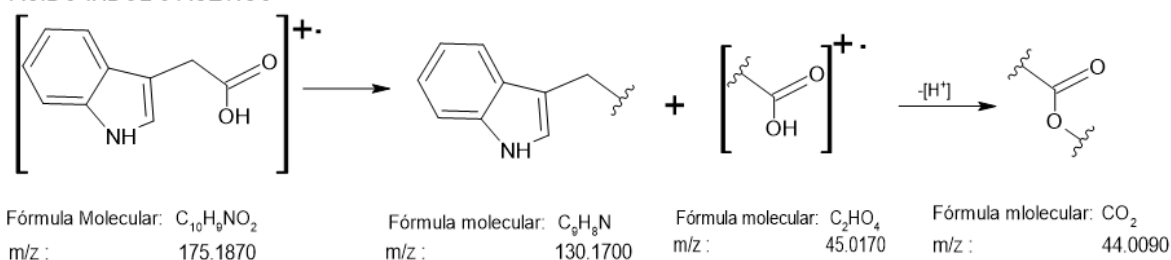


Figura 28. Propuesta de la fragmentación de la molécula de ácido indol-3-acético tras el impacto electrónico, donde la serie de fragmentaciones químicamente más favorecidas son presentadas junto con su fórmula química y relación masa-carga (m/z).

Con la finalidad de enriquecer y complementar la información que respalda la presencia de estreptomycin y anfotericina en las muestras analizadas por espectrometría de masas (MS-EI), se realizó un análisis cromatográfico de líquidos en un equipo acoplado a masas (HPLC-QToF-MS) con la intención de separar los diversos compuestos presentes en las muestras obtenidas y lograr el espectro de masas de las muestras de interés que a continuación se describen.

Los análisis realizados mostraron un cromatograma de iones totales generados que se observa en el espectro de la **figura 30** donde se tiene la presencia de alrededor de 14 compuestos que se observan a diferentes tiempos de retención. De la colección de iones totales se realizó la extracción del ion de interés, dando como resultado el cromatograma mostrado en la **figura 31**, que presenta un cúmulo de señales que son indicativo de la presencia del ion molecular de interés, por ello se elige uno de los picos más intensos para obtener el espectro de masas, **figura 32**, que presenta la masa exacta del ion molecular correspondiente a estreptomycin $[M+H]^+ [C_{21}H_{40}N_7O_{12}]^+$, masa teórica= 582.27349, masa experimental=582.2720.

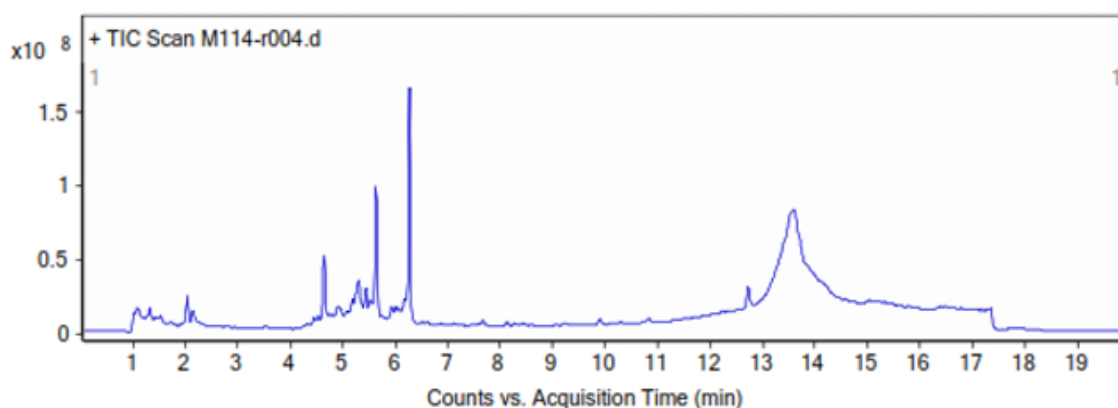


Figura 29. Cromatograma total de iones (TIC, por sus siglas en inglés) obtenido de la muestra que contiene los productos de fermentación.

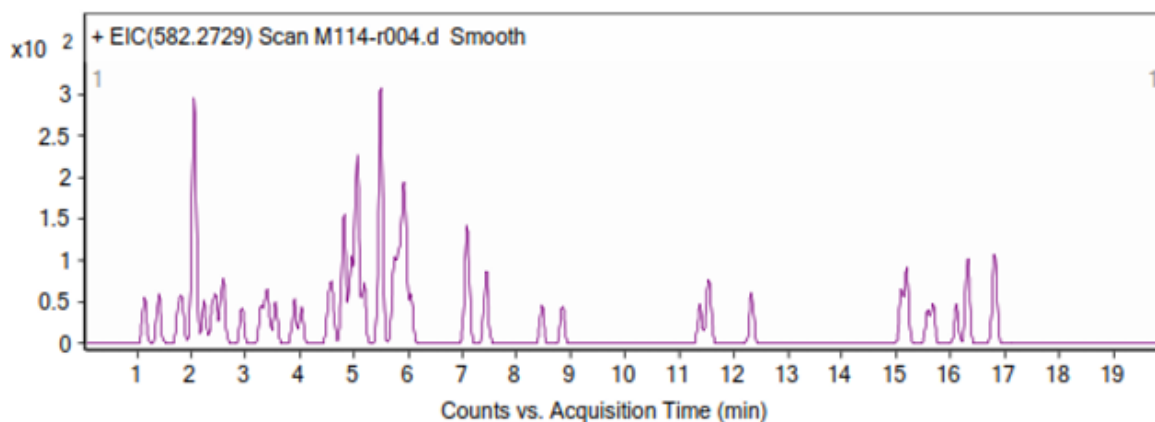


Figura 30. Cromatograma del ion extraído con masa de 582.2729, a partir del cromatograma total de iones (TIC).

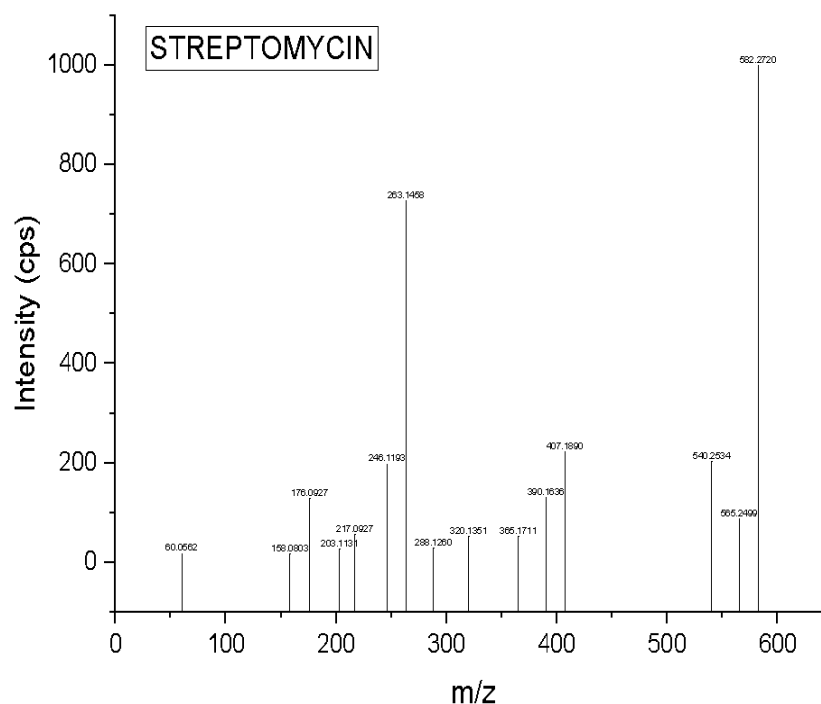


Figura 31. Espectro de masas obtenido del pico más intenso del cromatograma del ion extraído.

Del cromatograma total de iones (figura 30) se obtuvo el cromatograma del ion extraído correspondiente a anfotericina (figura 33), del cual se eligió una de las señales más intensas para generar el espectro de masas correspondiente (figura 34), el cual presentó la masa exacta del ion molecular correspondiente a anfotericina $[M+H]^+$ $[C_{47}H_{73}NO_{17}]^+$, masa teórica= 924.49568, masa experimental=924.4341.

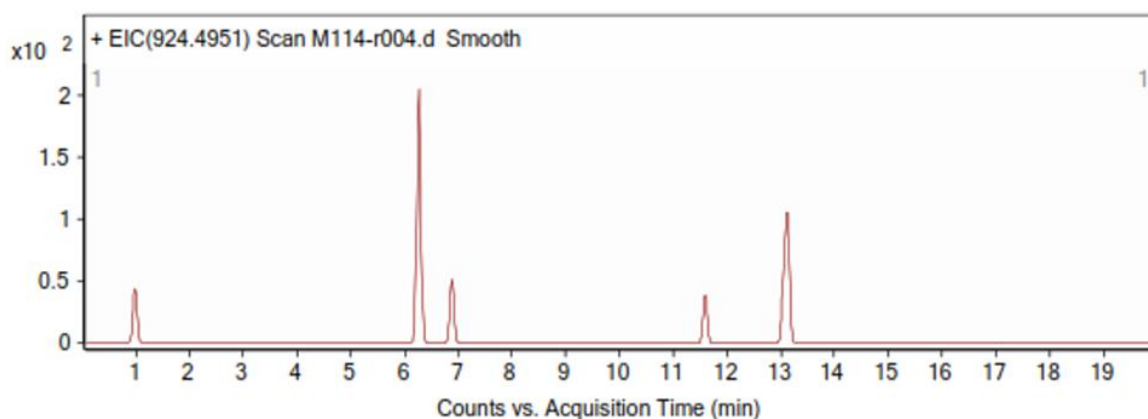


Figura 32. Cromatograma del ion con masa de 924.4951 correspondiente a la anfotericina B, extraído del cromatograma total.

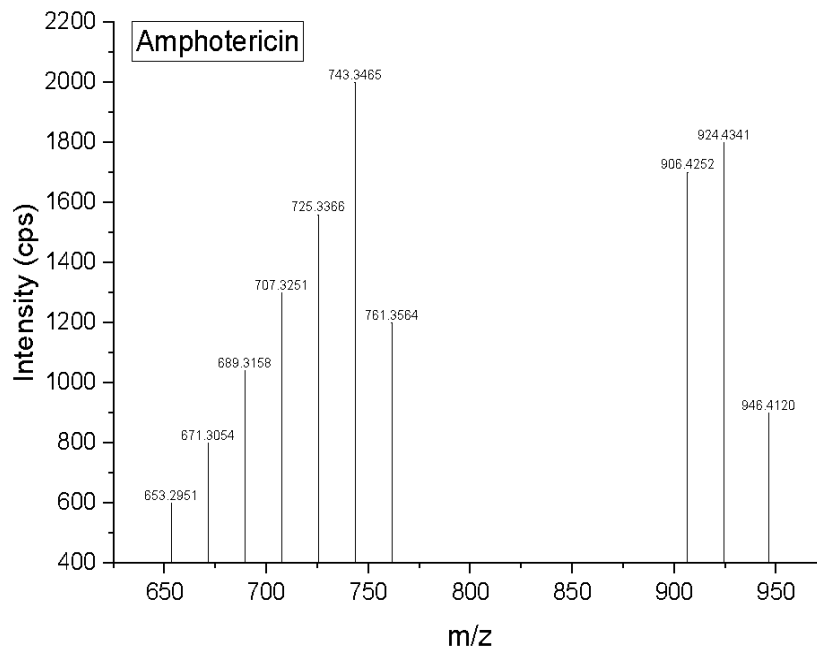


Figura 33. Espectro de masas del ion molecular, m/z de 924.4341, correspondiente a la anfotericina.

En conclusión, de los estudios realizados por espectrometría de masas y cromatografía de líquidos acoplado a masas se evidencia la presencia de los compuestos: estreptomicina, anfotericina B y ácido indol-3-acético.

La asociación de la producción de estreptomicina y anfotericina B por la cepa de *Streptomyces* sp. G63 es soportada por el análisis instrumental, sin embargo, es probable que dentro del producto de fermentación se obtenga una estructura química modificada y térmicamente estable de la estreptomicina, debido a que los estudios avalan que el sulfato de estreptomicina comercial es estable a 37°C y a partir de 65°C pierde el 50% de efectividad (Kassem, 2025). Por otro lado, se puede inferir el efecto sinérgico de los antibióticos producidos por la cepa debido a que la anfotericina B no sufre cambios químicos ni pierde estabilidad en medio acuoso a 137 °C, sino que prevalece y a 447 °C se descompone completamente y se volatiliza (Łubkowski et al., 1989).

5. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE LAS CEPAS REACTIVADAS

En total se obtuvieron 18 cepas de *Streptomyces* sp. viables, de las cuales se extrajo satisfactoriamente DNA genómico con el protocolo de extracción modificado del Plant/fungi DNA isolation kit descrito previamente, figura 34.

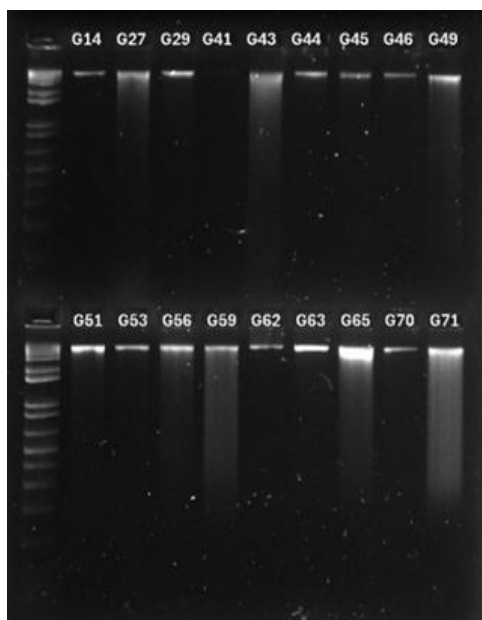


Figura 34. Electroforesis de gDNA unido al tinte Sybr safe en gel de agarosa al 1.5%. Se extrajo exitosamente gDNA de las 18 cepas viables seleccionadas inicialmente. Especialmente el gDNA de la cepa de *Streptomyces* sp. G63 se obtuvo integro para el procesamiento siguiente.

A partir de la secuencia parcial del gen de ARNr 16S (~1430 nucleótidos) del aislado de *Streptomyces* sp. G63 (**figura 35**), se recibieron y analizaron los datos en formato de texto y PDF de la secuenciación por el método de Sanger.

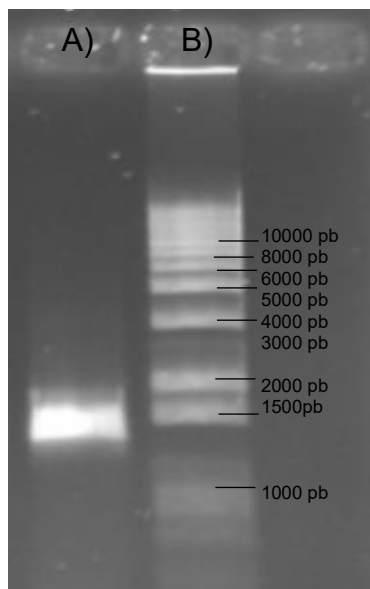


Figura 35. Fragmento amplificado por PCR del gen ribosomal rRNA 16S de *Streptomyces* sp. G63 A) amplicon de aproximadamente 1430 pb, y B) marcador de peso molecular de 1kb.

Se determinó el uso exclusivo de la secuencia ACT13_1100R.ab1 correspondiente a la secuencia obtenida a partir del cebador reverse para realizar el análisis filogenético. La decisión se sustenta a partir de la evaluación de la calidad de los electroferogramas, donde en la **figura 36** se observan picos mal espaciados, picos dobles y con mala resolución a través de todo el electroferograma. Por otro lado, la **figura 37** muestra que la secuencia obtenida a partir del cebador reverse contiene considerablemente menos errores debido a que se muestran picos espaciados uniformemente y se pueden eliminar manualmente los fragmentos iniciales y finales en los que la resolución no es buena.

Figura 36. Electroferograma obtenido a partir del cebador forward. Se observan diferentes errores en las señales que interfieren con la obtención de una secuencia consenso.

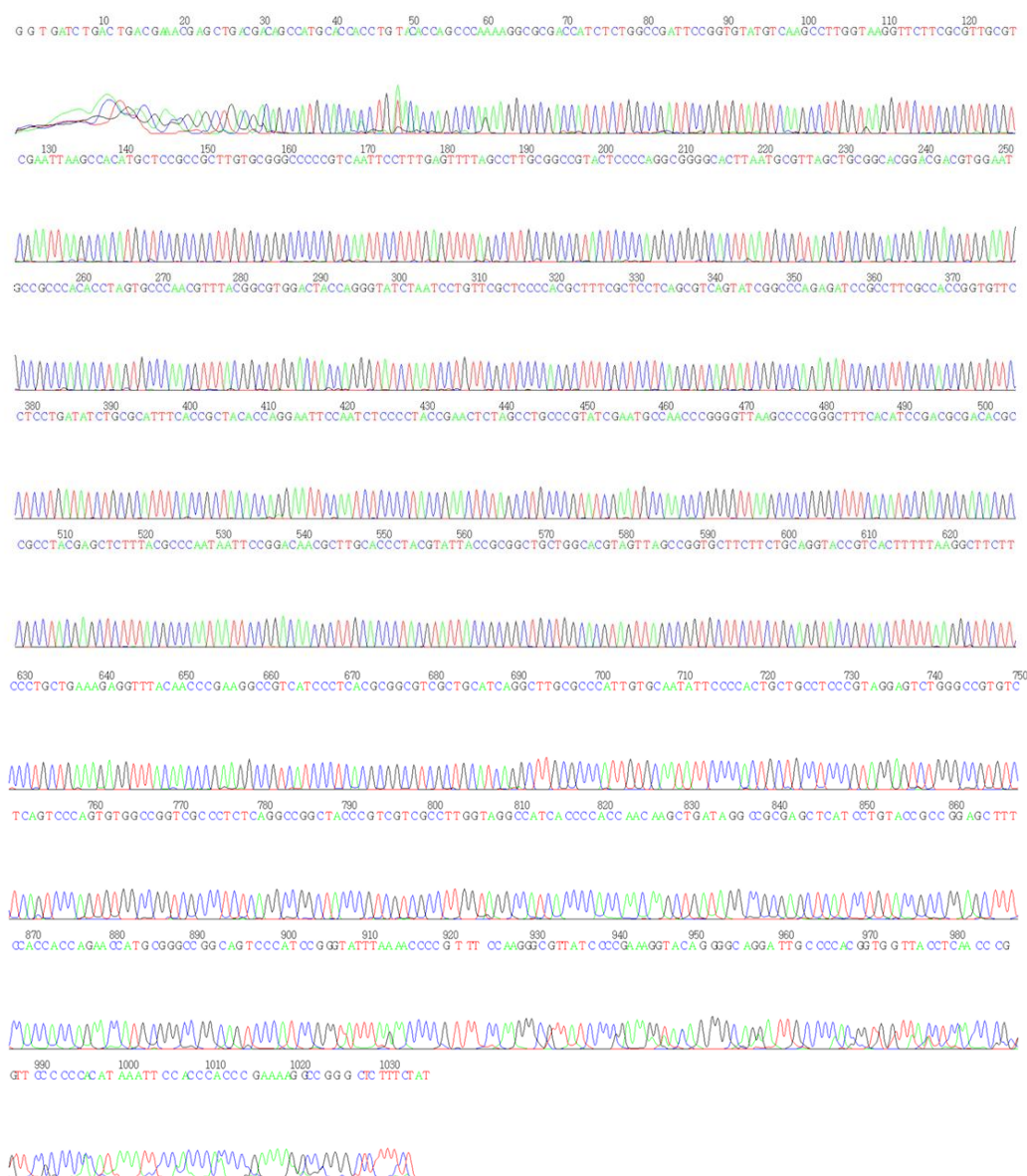


Figura 37. Electroferograma obtenido a partir de la secuencia dada por el cebador reverse. Se observa que a partir del nucleótido 60 hasta el nucleótido 930 se obtiene una resolución en los picos de calidad para la obtención de la secuencia nucleotídica del gen de ARNr 16S.

Por lo tanto, la secuencia parcial del gen de ARNr 16S aislada de la cepa G63 fue refinada ACT13_1100R.ab1 y analizada por homología en BLAST, donde mostró una similitud 98.03% con *Streptomyces mangrovi* strain HA11110 (NR_137262.1) y de 97.78% con *Streptomyces fenghuangensis* strain GIMN4.003 (NR_117502.1), con un porcentaje de gaps menor a 2%.

Se seleccionaron arbitrariamente 18 secuencias de cepas con similitud a la secuencia de ACT13_1100R.ab1 para el alineamiento en CLUSTAL OMEGA, que requirió de convertir la secuencia ACT13_1100R.ab1 en su reverso complementario en Sequence Manipulation Suite (Stothard P., 2000). La alineación dio como resultado la matriz de porcentaje de identidad mostrado en la **figura 38**, la cual indica cual es la similitud entre cada secuencia analizada, entre las cuales la cepa de interés tiene un porcentaje de identidad máximo de 98.39% con *Streptomyces mangrovi* strain HA11110 (NR_137262.1) y mínimo 89.13% con *Streptomyces abyssalis* strain YIM M 10400 (NR_109175.1).

Matriz de Porcentaje de Identidad - creado por Clustal2.1

1: NR_044534.1	100.00	98.31	96.67	94.97	96.24	96.47	96.58	96.58	96.47	96.12	95.39	95.53	95.64	95.64	91.04	93.93	97.13	97.26	97.13
2: NR_112843.1	98.31	100.00	98.57	95.23	96.69	97.15	97.04	97.04	96.92	96.81	96.58	95.79	95.90	95.90	90.40	94.98	98.35	98.35	98.35
3: NR_109175.1	96.67	98.57	100.00	93.62	96.12	96.47	96.35	96.35	96.24	95.90	94.61	94.29	94.40	94.40	89.13	93.37	96.63	96.89	96.63
4: NR_132613.1	94.97	95.23	93.62	100.00	94.67	95.01	95.24	95.24	95.12	94.56	94.31	93.31	93.42	93.42	90.49	93.71	96.13	95.89	96.26
5: NR_115771.1	96.24	96.69	96.12	94.67	100.00	97.64	97.86	97.86	97.75	97.18	97.75	96.27	96.38	96.38	92.34	96.01	98.86	98.61	98.86
6: NR_145593.1	96.47	97.15	96.47	95.01	97.64	100.00	99.77	99.77	99.66	98.87	98.54	96.15	96.27	96.27	91.78	96.35	98.10	98.35	98.10
7: NR_117958.1	96.58	97.04	96.35	95.24	97.86	99.77	100.00	100.00	99.89	98.76	98.42	96.27	96.38	96.38	91.89	96.47	98.35	98.35	98.35
8: NR_041141.1	96.58	97.04	96.35	95.24	97.86	99.77	100.00	100.00	99.89	98.76	98.42	96.27	96.38	96.38	91.89	96.47	98.35	98.35	98.35
9: NR_043723.1	96.47	96.92	96.24	95.12	97.75	99.66	99.89	99.89	100.00	98.65	98.31	96.15	96.27	96.27	91.78	96.35	98.22	98.23	98.22
10: NR_112328.1	96.12	96.81	95.90	94.56	97.18	98.87	98.76	98.76	98.65	100.00	99.10	95.93	96.84	96.84	91.78	96.58	97.84	97.97	97.84
11: NR_112419.1	95.39	96.58	94.61	94.31	97.75	98.54	98.42	98.42	98.31	99.10	100.00	95.68	95.79	95.79	91.72	96.87	97.89	97.77	97.89
12: NR_148293.1	95.53	95.79	94.29	93.31	96.27	96.15	96.27	96.27	96.15	95.93	95.68	100.00	99.45	99.45	94.86	94.75	98.01	98.14	98.01
13: NR_109644.1	95.64	95.90	94.40	93.42	96.38	96.27	96.38	96.38	96.27	96.04	95.79	99.45	100.00	99.56	94.86	94.86	98.01	98.14	98.01
14: NR_043838.1	95.64	95.90	94.40	93.42	96.38	96.27	96.38	96.38	96.27	96.04	95.79	99.45	99.56	100.00	94.86	94.86	98.01	98.14	98.01
15: H251110-011_101_ACT13_1100R.ab1	91.04	90.40	89.13	90.49	92.34	91.78	91.89	91.89	91.78	91.78	91.72	94.86	94.86	94.86	100.00	92.60	98.26	98.39	98.26
16: NR_118279.1	93.93	94.98	93.37	93.71	96.01	96.35	96.47	96.47	96.35	96.58	96.87	94.75	94.86	94.86	92.60	100.00	98.26	98.02	98.26
17: NR_044013.1	97.13	98.35	96.63	96.13	98.86	98.10	98.35	98.35	98.22	97.84	97.89	98.01	98.01	98.01	98.26	98.26	100.00	99.50	99.75
18: NR_137262.1	97.26	98.35	96.89	95.89	98.61	98.35	98.35	98.35	98.23	97.97	97.77	98.14	98.14	98.14	98.39	98.02	99.50	100.00	99.75
19: NR_117502.1	97.13	98.35	96.63	96.26	98.86	98.10	98.35	98.35	98.22	97.84	97.89	98.01	98.01	98.01	98.26	98.26	99.75	99.75	100.00

Figura 38. Matriz de porcentaje de identidad, obtenido de ClustalOmega.

El estudio de las relaciones evolutivas entre las diferentes secuencias del gen rRNA 16S alineadas dio lugar al árbol filogenético de la cepa de *Streptomyces* sp. G63 (**figura 39**).

Las diferencias entre los porcentajes de similitud dados por BLASTN, ClustalOmega y el árbol filogenético dado por Phylogeny.fr se debe a que, este último programa elimina regiones ambiguas y mal alineadas con Gbloks y usa el método máxima verosimilitud para construir el árbol filogenético.

Así, finalmente se concluye que la cepa de *Streptomyces* sp. G63 puede ser una cepa no reportada hasta el momento debido a que el porcentaje de identidad no es mayor a 99% con cepas registradas en el portal del NCBI y la cual es parte de un mismo nodo junto con las cepas *Streptomyces xiaopingdaonensis* strain DUT 180 (NR_148293.1), *Streptomyces halophytocola* strain KLBMP 1284 (NR_109644.1) y *Streptomyces sulphureus* strain NRRL B-1627 (NR_043838.1), que han sido aisladas principalmente de sedimentos marinos con alta salinidad. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para asegurar la hipótesis sugerida.

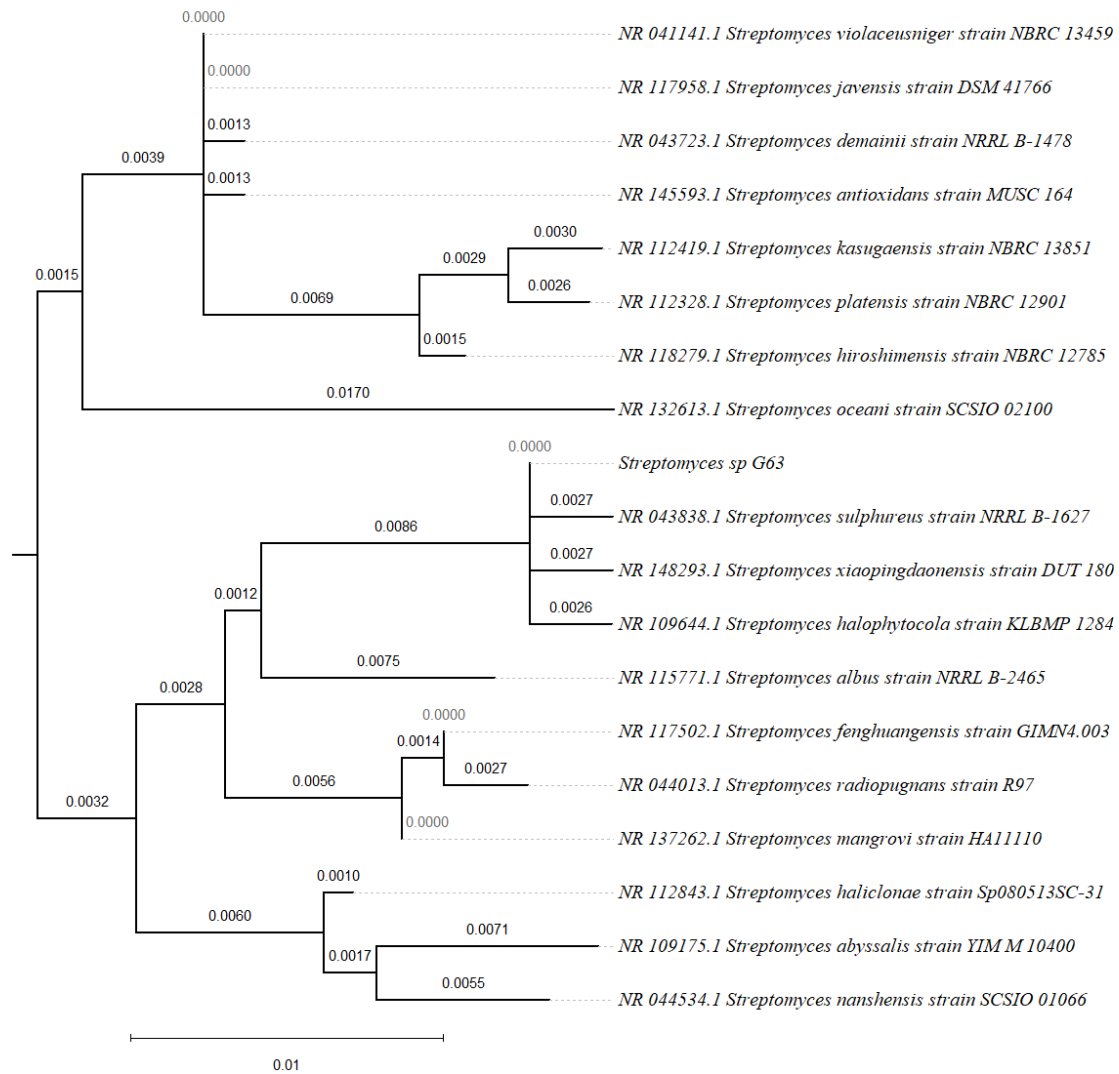


Figura 39. Árbol filogenético de la cepa *Streptomyces* sp. G63 obtenido de Phylogeny.fr y reconstruido en MEGA versión 12.

IX. CONCLUSIÓN

La cepa G63 fue seleccionada como la más prometedora a partir de un conjunto inicial de cepas del género *Streptomyces* sp. De las 15 cepas que mostraron inhibición contra *Pectobacterium carotovorum* y las 5 cepas que inhibieron a *Pseudomonas syringae*, la cepa de ***Streptomyces* sp. G63** se destacó por generar el mayor porcentaje de inhibición contra ambos patógenos vegetales.

Asimismo, los experimentos permitieron identificar que el medio de cultivo ISP-3 favorece la producción de metabolitos secundarios debido a que proporciona como fuente de carbono a moléculas complejas (amilosa y β -glucanos) que permiten el crecimiento y el metabolismo secundario de la bacteria.

En conjunto con lo anterior, se estimó que *Streptomyces* sp. G63 secreta **compuestos bioactivos** entre las 24 y 40 horas tras el inicio de su incubación, como producto de su metabolismo secundario. De estos compuestos, se identificaron mediante técnicas instrumentales (espectrofotometría UV-Vis, MS-IE, HPLC-QToF-MS) a las moléculas bioactivas: **estreptomicina** y **anfotericina B**. A través de SM-EI se determinó la presencia de estreptomicina, por otro lado, HPLC-QToF-MS permitió la identificación de estreptomicina y anfotericina B a partir de la separación, selección y detección de iones con el peso molecular correspondiente a cada molécula dentro del extracto obtenido.

Se sugiere la sinergia de los compuestos bioactivos para producir el efecto inhibidor que perdura después del tratamiento con calor a 90 °C, entre los cuales se pudo identificar en la literatura la termo-estabilidad en el siguiente orden: anfotericina B > estreptomicina y un análogo de la estreptomicina del cual no se dedujo la estructura química con estabilidad térmica intermedia.

Además, los ensayos permitieron detectar la presencia de la molécula bioactiva **ácido indol-3-acético**, la cual podría sintetizarse a partir del triptófano proveniente del medio de cultivo a base de avena y es reportado como un promotor de crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés) y un mensajero químico para establecer la comunicación entre plantas y microorganismos simbióticos y patógenos.

Finalmente, la nueva cepa *Streptomyces* sp. G63, perteneciente al nodo de cepas de *Streptomyces* halo tolerantes, aislada a partir de suelos contaminados con glifosato es productora de los antibióticos estreptomicina y anfotericina B, además de combatir el estrés abiótico con la producción de ácido indol-3-acético.

X. PERSPECTIVAS

Los *Streptomyces* que han ganado popularidad por su capacidad para degradar pesticidas químicos dañinos debido a su capacidad metabólica, lo que lleva a su uso en biorremediación (Bensouici et al., 2025; Jangra et al., 2025).

Como perspectiva futura, se plantea el análisis del perfil metabolómico de las cepas de *Streptomyces* sp. extremófilos resistentes a altas concentraciones de glifosato con el objetivo de dilucidar las rutas biosintéticas involucradas en la producción de metabolitos de interés agrícola con potencial antimicrobiano y promotor de crecimiento vegetal. Para ello se contempla el empleo de técnicas analíticas avanzadas, tales como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), que permitan la caracterización estructural precisa de dichos compuestos. Asimismo, se contempla que investigaciones futuras exploren el potencial de aplicabilidad en el sector agrícola mediante pruebas en plantas a nivel laboratorio y campo.

Por otro lado, queda abierta la posibilidad de que trabajos futuros exploren la actividad biorremediadora a partir de la degradación de glifosato principalmente mediante la síntesis de enzimas que rompen el enlace carbono -fosforo (C-P), es decir, C-P liasas. Tal como diversos autores se han dado a la tarea de analizar las vías metabólicas por las que esto puede ser posible (Martín & Liras, 2021; Rossi et al., 2021; Klátyik et al., 2023).

XI. ANEXOS

Preparación de Agar Nutritivo (AN)

1. Disolver 23g de medio deshidratado en un litro de agua destilada.
2. Mezclar y calentar a ebullición durante 1-2 minutos hasta disolver.
3. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

COMPONENTES DEL AN

PEPTONA	5.0 g/L
EXTRACTO DE CARNE	3.0 g/L
AGAR	15.0 g/L

Preparación de Agar papa-dextrosa (PDA)

1. Disolver 39g de medio deshidratado en un litro de agua destilada.
2. Mezclar y calentar a ebullición durante 1-2 minutos hasta disolver.
3. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

COMPONENTES DEL PDA

INFUSIÓN DE PAPA	4.0 g/L
DEXTROSA	20.0 g/L
AGAR	15.0 g/L

Preparación del medio del International Streptomyces Projet número 2 (ISP-2)

1. Pesar cada componente del medio.
2. Disolver los componentes del medio deshidratado en un litro de agua destilada.
3. Mezclar y calentar a ebullición durante 1-2 minutos hasta disolver.
4. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

COMPONENTES DEL ISP-2

EXTRACTO DE LEVADURA	4.0 g/L
EXTRACTO DE MALTA	10.0 g/L
DEXTROSA	4.0 g/L
AGAR	20.0 g/L

Preparación del medio del International Streptomyces Projet número 3 (ISP-3)

1. Pesar cada componente del medio.
2. Disolver los componentes del medio deshidratado en un litro de agua destilada.
3. Mezclar y calentar a ebullición durante 1-2 minutos hasta disolver.
4. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

COMPONENTES DEL ISP-3

AVENA BLANCA MOLIDA	20.0 g/L
AGAR	18.0 g/L

Preparación de Agar King B (AKB)

1. Disolver 38g de medio deshidratado en un litro de agua destilada.
2. Añadir 10 ml de glicerol.
3. Mezclar y calentar a ebullición durante 1-2 minutos hasta disolver.
4. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

COMPONENTES DEL AKB

PEPTONA	20.0 g/L
SULFATO DE MAGNESIO	1.5 g/L
HIDROGENOFOSFATO DIPOTASICO	1.5 g/L
AGAR	15.0 g/L

Preparación de buffer de corrimiento TBE 1X

1. Preparar 100 ml de solución de hidróxido de sodio NaOH, 10 M. Se disuelven 40 g de NaOH en 50 ml de dH₂O y se afora a 100 ml con dH₂O.
2. Preparar 100 ml de solución de ácido etilendiaminotetraacético EDTA 0.5M, pH=8.0. Se disuelven 18.61 g de sal disódica de EDTA en 80 ml de dH₂O ajustando el pH a 8.0 con NaOH 10M, cuando se haya disuelto completamente aforar a 100 ml con dH₂O.

PREPARACIÓN DE TBE 5X

TRIZMA BASE	54 g
ÁCIDO BÓRICO	27.5 g
EDTA 0.5 M, pH =8.0	20 ml

3. Finalmente se prepara buffer TBE 1X diluyendo 100 ml de buffer TBE 5X en 400 ml de dH₂O.

Preparación del gel de agarosa al 1.5%

4. Para preparar 30 ml de gel de agarosa al 1.5% se pesan 0.45 g de agarosa y se añaden a 30 ml de TBE 1x.
5. Calentar en microondas por aproximadamente 40 segundos hasta la disolución completa de la agarosa.
6. Esperar a que la temperatura disminuya poco y verter el gel líquido sobre el soporte del gel con los peines situados en la ranura deseada (superior y/o central).
7. Esperar a que el gel clarifique y solidifique completamente.

Preparación de una electroforesis.

1. Sumergir el gel en el tampón dentro de la cámara de electroforesis en la dirección correcta y retire el peine cuidando de no estropear los pozos.

2. Colocar la muestra en los pocillos en el orden deseado mezclados con un volumen adecuado de buffer de carga.
3. Cerrar la tapa de seguridad de la cámara y conectar los cables a la fuente de corriente.
4. Una vez que se haya completado la electroforesis, retirar el gel y el soporte de la cámara de electroforesis.
5. Teñir el gel con una solución de Sybr safe (1 μ l/ 10 ml de TBE 1X) durante 10-15 minutos.
6. Visualizar el gDNA en un fotodocumentador UV-vis.

Resultados del ensayo de actividad biológica contra los fitopatógenos de los extractos obtenidos de la cinética de producción de compuestos bioactivos



Figura 40. Evaluación de la producción de metabolitos secundarios bioactivos contra *Pectobacterium carotovorum* en diferentes tiempos.



Figura 41. Evaluación de la producción de metabolitos secundarios bioactivos contra *Pseudomonas syringae* en diferentes tiempos.

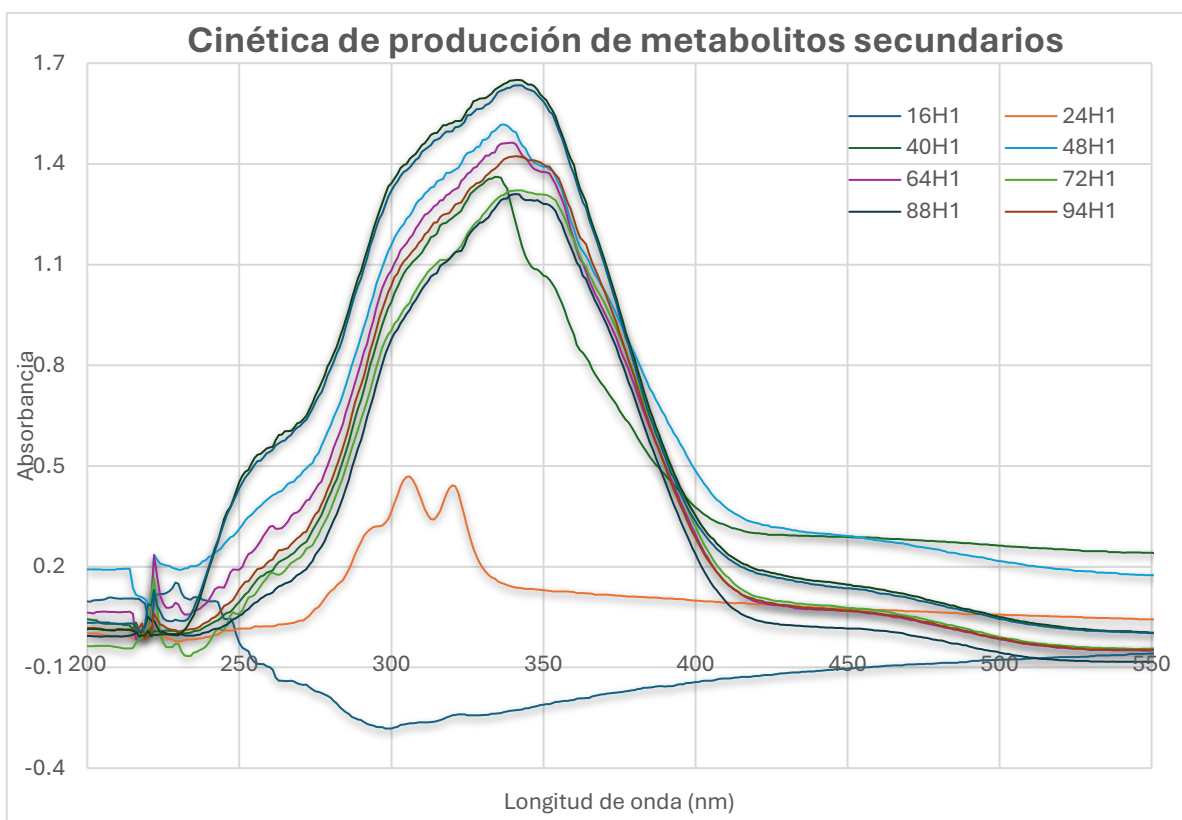


Figura 42. Evaluación de la producción de metabolitos secundarios en diferentes tiempos de toma de muestra, por espectrofotometría UV-Vis. Se muestra que a las 24 horas inicia la producción de compuestos químicos que contienen grupos cromóforos diferenciables en dos picos que posteriormente resultan en una mayor absorbancia haciéndolos indiferenciables unos de otros.

DEFINICIONES

Agroquímico: Se entiende como cualquier sustancia o mezcla de sustancias naturales o sintéticas utilizado para prevenir, eliminar y/o controlar cualquier plaga, enfermedad o maleza en la actividad agrícola.

Auxina: una clase de compuestos que influyen en el desarrollo vegetal como hormonas que estimulan el crecimiento de las plantas y están involucradas en varios procesos fisiológicos dentro de las plantas.

Biocontrol: se refiere al uso de compuestos biológicos, a menudo derivados de la fermentación microbiana, como alternativa a los pesticidas químicos, proporcionando beneficios como menores riesgos para la salud humana, mínima contaminación ecológica y menor desarrollo de resistencia a los insectos.

Componente funcional: compuestos y nutrientes específicos que se encuentran en el grano de avena y que contribuyen a sus beneficios para la salud y propiedades funcionales.

Compuestos bioactivos: sustancias que reaccionan biológicamente y estimulan una respuesta en el tejido vivo, lo que indica su actividad biológica. Estos compuestos pueden extraerse y purificarse para diversas aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas, y son reconocidos por sus posibles beneficios para mejorar el bienestar humano.

Fitopatógeno: Un patógeno se define como un microorganismo infeccioso que puede causar patología o la muerte del huésped, en este caso, especies vegetales.

Metabolitos secundarios: compuestos no esenciales producidos por organismos que confieren una ventaja selectiva, que abarca funciones como el antagonismo tóxico, la señalización, la diferenciación celular o la adaptación a nichos nutricionales.

Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal: PGPR por sus siglas en inglés, son un grupo de bacterias del suelo de vida libre que mejoran directa o indirectamente el crecimiento de las plantas.

XII. BIBLIOGRAFÍA

87-51-4 *Mass Spectrum* | CAS *SciFinder*. (n.d.).
<https://scifinder.bibliotecabuap.elogim.com/searchDetail/substancesSpectra/68bf83b7be178142e14a5d2d/spectraDetail>

Alam, K., Mazumder, A., Sikdar, S., Zhao, Y., Hao, J., Song, C., Wang, Y., Sarkar, R., Islam, S., Zhang, Y., & Li, A. (2022). Streptomyces: The biofactory of secondary metabolites. *Frontiers in Microbiology*, 13.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.968053>

Almasoudi, N. M., Al-Qurashi, A. D., Elsayed, M. I., & Abo-Elyousr, K. a. M. (2024). Native bacterial bioagents for management of potato soft rot disease caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 34(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-024-00794-4>

Anandan, K., & Vittal, R. R. (2025). Quorum quenching strategies of endophytic *Bacillus thuringiensis* KMCL07 against Soft Rot Pathogen *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. *Microbial Pathogenesis*, 200, 107356.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107356>

ANASAC. (n.d.). STREPTO PLUS FUNGICIDA-BACTERICIDA POLVO MOJABLE (WP). In *Servicio Agrícola y Ganadero*. Recuperado de:
https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/resol._renov-_traspaso_tit._strepto_plus_anasac_chile_s.a._etiqueta.pdf

Barka, E. A., Parul Vatsa, Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Christophe Clément, Yder Ouhdouch, & Wezel, van. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(1), 1–43. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00019-15>

Bensouici, K., Oulmi, L., Boudemagh, A., & Kitouni, M. (2025). The capacity of Actinobacteria isolated from arid ecosystems in the bioremediation of soils polluted by λ -cyhalothrin-pesticide. *Notulae Scientia Biologicae*, 17(1), 12035.
<https://doi.org/10.55779/nsb17112035>

Beyari, E. A. (2024). Alternatives to chemical pesticides: the role of microbial biocontrol agents in phytopathogen management: a comprehensive review. *Journal of Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s42161-024-01808-8>

Bobek J, Šmídová K and Čihák M (2017) A Waking Review: Old and Novel Insights into the Spore Germination in Streptomyces. *Front. Microbiol.* 8:2205. doi:10.3389/fmicb.2017.02205

Cassanelli, S., Bellameche, F., Caradonia, F., Cortiello, M., Fuentealba, S. P., & Giovanardi, D. (2024). Foliar application of Streptomyces sp. DLS2013 induces

transcriptional changes on tomato plants and confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 132(1). <https://doi.org/10.1007/s41348-024-01027-4>

Chandrashekar, B. S., PrasannaKumar, M. K., Parivallal, P. B., Pramesh, D., Banakar, S. N., Patil, S. S., & Mahesh, H. B. (2022). Host range and virulence diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* strain RDKLR infecting radish in India, and development of a LAMP-based diagnostics. *Journal of Applied Microbiology*, 132(6), 4400–4412. <https://doi.org/10.1111/jam.15553>

Charkowski, A. O. (2009). Decaying signals: will understanding bacterial–plant communications lead to control of soft rot? *Current Opinion in Biotechnology*, 20(2), 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2009.01.005>

Chater, K. F., & Chandra, G. (2006). The evolution of development in *Streptomyces* analysed by genome comparisons. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(5), 651–672. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00033.x>

Chaudhary, V., Kumar, M., Chauhan, C., Sirohi, U., Srivastav, A. L., & Rani, L. (2024). Strategies for mitigation of pesticides from the environment through alternative approaches: A review of recent developments and future prospects. *Journal of Environmental Management*, 354, 120326. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120326>

Choudoir, M., Rossabi, S., Gebert, M., Helmig, D., & Fierer, N. (2019). A phylogenetic and functional perspective on volatile organic compound production by Actinobacteria. *mSystems*, 4(2). <https://doi.org/10.1128/msystems.00295-18>

Córdova, P., Rivera-González, J. P., Rojas-Martínez, V., Fiore, N., Bastías, R., Zamorano, A., Vera, F., Barreto, J., Díaz, B., Ilabaca-Díaz, C., Bertaccini, A., & Higuera, G. (2023). Phytopathogenic *Pseudomonas syringae* as a Threat to Agriculture: Perspectives of a Promising Biological Control Using Bacteriophages and Microorganisms. *Horticulturae*, 9(6), 712. <https://doi.org/10.3390/horticulturae9060712>

Davidsson, P. R., Kariola, T., Niemi, O., & Palva, E. T. (2013). Pathogenicity of and plant immunity to soft rot pectobacteria. *Frontiers in Plant Science*, 4. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00191>

Dereeper A., Guignon V., Blanc G., Audic S., Buffet S., Chevenet F., Dufayard J.F., Guindon S., Lefort V., Lescot M., Claverie J.M., Gascuel O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 2008 Jul 1;36(Web Server issue):W465-9. Epub 2008 Apr 19. (PubMed)

Dias, M. P., Bastos, M. S., Xavier, V. B., Cassel, E., Astarita, L. V., & Santarém, E. R. (2017). Plant growth and resistance promoted by *Streptomyces* spp. in tomato.

Doolotkeldieva, T., Bobusheva, S., & Suleymankisi, A. (2016). Biological Control of *Erwinia carotovora* ssp. *Carotovora* by *Streptomyces* Species. *Advances in Microbiology*, 06(02), 104–114. <https://doi.org/10.4236/aim.2016.62011>

Elhalag, K. M., Hassan, M. G., Hamed, A. A., Elawady, M. E., Hassan, A., & Maaty, S. a. a. E. (2025). Antibacterial efficacy of *Streptomyces rochei* metabolites against key bacterial diseases of potato. *Indian Phytopathology*. <https://doi.org/10.1007/s42360-025-00884-9>

Evangelista-Martínez, Z. (2013). Isolation and characterization of soil *Streptomyces* species as potential biological control agents against fungal plant pathogens. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(5), 1639–1647. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1568-x>

Evangelista-Martínez, Z. (2022). INHIBITORY ACTIVITY OF THERMO-RESISTANT METABOLITES PRODUCED BY *Streptomyces* SP. CACIS-1.16CA AGAINST HUMAN AND PLANT PATHOGENIC BACTERIA. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 12(3), e3329. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.3329>

Evangelista-Martínez, Z., Ek-Cen, A., Torres-Calzada, C. et al. (2022). Potencial de la cepa AGS-58 de *Streptomyces* sp. en el control de *Colletotrichum siamense*, causante de antracnosis, en frutos de mango poscosecha. *J Plant Pathol* 104, 553–563 <https://doi.org/10.1007/s42161-022-01104-3>

Fernández-Peña, M. de L., Pérez-Vázquez, A., Castañeda-Chávez, M. del R., Díaz-Rivera, P., Ortega-Jiménez, E., & López-Romero, G. (2023). Impacts of Glyphosate (Roundup®) on the Environment and on Human Health. *Agrociencia*, 57(4), 836–859. <https://doi.bibliotecabuap.elogim.com/10.47163/agrociencia.v57i4.2844>

Gangola, S., Joshi, S., Bhandari, G., Pant, G., Sharma, A., Perveen, K., Bukhari, N. A., & Rani, R. (2023). Exploring microbial diversity responses in agricultural fields: a comparative analysis under pesticide stress and non-stress conditions. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1271129>

González Ortega, E., & Fuentes Ponce, M. H. (2022). Dinámica del glifosato en el suelo y sus efectos en la microbiota. *Revista Internacional De Contaminación Ambiental*, 38, 127–144. <https://doi.org/10.20937/RICA.54197>

González-Moscoso, M., Meza-Figueroa, D., Martínez-Villegas, N. V., & Pedroza-Montero, M. R. (2023). GLYPHOSATE IMPACT on human health and the environment: Sustainable alternatives to replace it in Mexico. *Chemosphere*, 340, 139810. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139810>

Grenz, K., Chia, K., Turley, E. K., Tyszka, A. S., Atkinson, R. E., Reeves, J., Vickers, M., Rejzek, M., Walker, J. F., & Carella, P. (2024). A necrotizing toxin enables *Pseudomonas syringae* infection across evolutionarily divergent plants. *Cell Host & Microbe*. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.11.014>

Griffin, S. L., Chekan, J. R., Lira, J. M., Robinson, A. E., Yerkes, C. N., Siehl, D. L., Wright, T. R., Nair, S. K., & Cicchillo, R. M. (2021). Characterization of a Glyphosate-Tolerant Enzyme from *Streptomyces svecius*: A Distinct Class of 5-Enolpyruvylshikimate-3-phosphate Synthases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(17), 5096–5104. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c00439>

Guerrero, A. P. A., Pineda, M. E. B., & Vargas, N. C. A. (2021). *Pectobacterium carotovorum*: agente fitopatógeno causante de la pudrición blanda en la papa (*Solanum tuberosum*). *Ciencia Y Tecnología Agropecuaria*, 22(2). https://doi.org/10.21930/rcta.vol22_num2_art:1710

Harir, M., Bendif, H., Bellahcene, M., & Fortas and Rebecca Pogni, Z. (2018). *Streptomyces* Secondary Metabolites. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.79890

Hossain, T. J. (2024). Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 14(2), 97–115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>

Indoleacetic acid. (2025). Nist.gov. <https://doi.org/10.18434/T4D303>

Jangra, B., Dwibedi, V., Kaur, G., & Bhadrecha, P. (2025). Decoding genomic potential of *Streptomyces* spp. for sustainable environment and industries. *South African Journal of Botany*, 184, 480–494. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2025.06.022>

Johal, G. S., & Huber, D. M. (2009). Glyphosate effects on diseases of plants. *European Journal of Agronomy*, 31(3), 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2009.04.004>

Kassem. (2025). Effect of certain additives on stability of streptomycin sulphate. *Die Pharmazie*, 38(2). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6856667/>

Khan, S., Srivastava, S., Karnwal, A., & Malik, T. (2023). *Streptomyces* as a promising biological control agents for plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1285543>

Klátyik, S., Simon, G., Oláh, M., Mesnage, R., Antoniou, M. N., Zaller, J. G., & Székács, A. (2023). Terrestrial ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010–2023. *Environmental Sciences Europe*, 35(1). <https://doi.org/10.1186/s12302-023-00758-9>

Kumar S, Stecher G, Suleski M, Sanderford M, Sharma S, and Tamura K (2024) Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution* 41:1-9.

Lewin, G. R., Carlos, C., Chevrette, M. G., Horn, H. A., McDonald, B. R., Stankey, R. J., Fox, B. G., & Currie, C. R. (2016). Evolution and Ecology of Actinobacteria and their Bioenergy Applications. *Annual Review of Microbiology*, 70(1), 235–254. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095748>

Liu, H., Hao, C., Zhang, Z., Xu, Y., Jiao, X., Zhang, H., & Wen, J. (2025). Biocontrol potential of *Streptomyces lateritius* ZY37 against *Phytophthora* root rot in soybean and optimization of fermentation conditions. *Journal of Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxaf175>

Łubkowski, J., Błazejowski, J., Czerwinski, A., & Borowski, E. (1989). Thermal behaviour and stability of amphotericin B. *Thermochimica Acta*, 155, 29–37. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(89\)87133-3](https://doi.org/10.1016/0040-6031(89)87133-3)

Martín, J. F., & Liras, P. (2021). Molecular Mechanisms of Phosphate Sensing, Transport and Signalling in *Streptomyces* and Related Actinobacteria. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1129. <https://doi.org/10.3390/ijms22031129>

Maenaka, R., Tani, S., Hikichi, Y., & Kai, K. (2020). Actinomycins inhibit the production of the siderophore pyoverdines in the plant pathogen *Pseudomonas cichorii* SPC9018. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 84(10), 1975–1985. <https://doi.org/10.1080/09168451.2020.1785839>

Meenakshi, S., Hiremath, J., Meenakshi, M., & Shivaveerakumar, S. (2024). Actinomycetes: Isolation, Cultivation and its Active Biomolecules. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 18(1), 118–143. <https://doi.org/10.22207/jpam.18.1.48>

Mejía-Sánchez, D., Aranda-Ocampo, S., Nava-Díaz, C., Teliz-Ortiz, D., Livera-Muñoz, M., De La Torre-Almaráz, R., & Ramírez-Alarcón, S. (2018). *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* Causes Soft Rot and Death of *Neobuxbaumia tetetzo* in Zapotitlan Salinas Valley, Puebla, Mexico. *Plant Disease*, 103(3), 398–403. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-18-0370-re>

Miller, S. A., Ferreira, J. P., & LeJeune, J. T. (2022). Antimicrobial use and Resistance in plant agriculture: A One health perspective. *Agriculture*, 12(2), 289. <https://doi.org/10.3390/agriculture12020289>

Myo, E. M., Ge, B., Ma, J., Cui, H., Liu, B., Shi, L., Jiang, M., & Zhang, K. (2019). Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces fradiae* NKZ-259 and its formulation to enhance plant growth. *BMC Microbiology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1528-1>

Nguyen, L. T. T., Park, A. R., Van Le, V., Hwang, I., & Kim, J. (2024). Exploration of a multifunctional biocontrol agent *Streptomyces* sp. JCK-8055 for the management of apple fire blight. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1). <https://doi.org/10.1007/s00253-023-12874-w>

Nikolaidis, M., Hesketh, A., Frangou, N., Mossialos, D., van de Peer, Y., Oliver, S. G., & Amoutzias, G. D. (2023). A panoramic view of the genomic landscape of the genus *Streptomyces*. *Microbial Genomics*, 9(6), 001028. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001028>

None Vaishnavi, & None Mamta. (2024). *Oats*. 81–106. https://doi.org/10.1007/978-981-97-2542-7_4

Oulghazi, S., Ed-Dra, A., Ali, F., Sarfraz, S. (2025). *Pectobacterium*. En: Amaresan, N., Kumar, K. (eds.). *Compendio de Microbios Fitopatógenos en Agroecología*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-031-81999-5_6

Palberg, D., Kaszecki, E., Dhanjal, C., Kisiąła, A., Morrison, E. N., Stock, N., & Emery, R. J. N. (2024). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on phyllospheric *Methylobacterium*. *BMC Plant Biology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-024-04818-x>

Rasane, P., Jha, A., Sabikhi, L., Kumar, A., & Unnikrishnan, V. S. (2013). Nutritional advantages of oats and opportunities for its processing as value added foods - a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(2), 662–675. <https://doi.org/10.1007/s13197-013-1072-1>

Rashid, T. S., Awla, H. K., & Sharifi, R. (2025). Biocontrol potential of metabolites from *Streptomyces* sp., non-toxic *Aspergillus fumigatus*, and their co-cultures against tomato anthracnose. *Biochemical Systematics and Ecology*, 123, 105067. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2025.105067>

Ríos Herrera, E. N., García-Munguía, A. M., Hernández-Bautista, O., & García-Munguía, C. A. (2021). Actividad antimicrobiana de extractos de *Zingiber officinale* y *Maclura pomifera* sobre *Pseudomona syringae*. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 12(2), 247–262. <https://doi.org/10.29312/remexca.v12i2.2446>

Rivera, A. P. T., Murgas, R. E. C., Ríos, A. E. M., & Merini, L. J. (2019). Efecto del glifosato sobre la microbiota, calidad del suelo y cultivo de frijol biofortificado en el departamento del Cesar, Colombia. *Revista Argentina De Microbiología*, 52(1), 61–71. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.01.006>

Rossi, F., Carles, L., Donnadieu, F., Batisson, I., & Artigas, J. (2021). Glyphosate-degrading behavior of five bacterial strains isolated from stream biofilms. *Journal of Hazardous Materials*, 42et0, 126651. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126651>

- Rostamabadi, H., Karaca, A. C., Deng, L., Colussi, R., Narita, I. M. P., Kaur, K., Aaliya, B., Sunooj, K. V., & Falsafi, S. R. (2022). Oat starch - How physical and chemical modifications affect the physicochemical attributes and digestibility? *Carbohydrate Polymers*, 296, 119931. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119931>
- Santra, H. K., & Banerjee, D. (2025). Actinobacteria's role in plant defense and their effectiveness as biocontrol agents against plant pathogens. In *Sustainability Sciences in Asia and Africa* (pp. 63–101). https://doi.org/10.1007/978-981-96-6569-3_3
- Seleim, M., & Bereika, M. (2023). Streptomyces spp. as biocontrol agents against Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum-induced soft rot in potato. *Archives of Agriculture Sciences Journal/Archives of Agriculture Sciences Journal*, 6(3), 59–72. <https://doi.org/10.21608/aasj.2023.339603>
- Silva-Sanzana, C., Gangas, M. V., Zavala, D., & Blanco-Herrera, F. (2022). A Recipe for Success: Three Key Strategies Used by Aphids and Pseudomonas syringae to Colonize the Phyllosphere. *Microbial Ecology*, 85(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s00248-022-01965-2>
- Singh, V. (2022). Microbial Bioactive Components: Sources, Applications, and Sustainability. 103–117. https://doi.org/10.1007/978-981-19-2366-1_7
- SummitAgro. (n.d.). Agry-Gent Plus 5000. In *Agroinsumosgz*. Retrieved August 23, 2025, from <https://www.agroinsumosgz.com/assets/ficha-tec-agrygent-5000.pdf>
- Stothard P (2000) The Sequence Manipulation Suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* 28:1102-1104.
- Thakur, R., & Yadav, S. (2023). Thermotolerant and halotolerant Streptomyces sp. isolated from Ajuga parviflora having biocontrol activity against Pseudomonas syringae and Xanthomonas campestris acts as a sustainable bioadditive in growth promotion of Cicer arietinum. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 127, 102059. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102059>
- Tian, L., Khalil, S., & Bayen, S. (2017). Effect of thermal treatments on the degradation of antibiotic residues in food. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(17), 3760–3770. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1164119>
- Xin, X., Kvitko, B., & He, S. Y. (2018). Pseudomonas syringae: what it takes to be a pathogen. *Nature Reviews Microbiology*, 16(5), 316–328. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.17>

Zhan, H., Feng, Y., Fan, X., & Chen, S. (2018). Recent advances in glyphosate biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(12), 5033–5043. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9035-0>

Zerrouki, H., Hamieh, A., Hadjadj, L., Rolain, J., & Baron, S. A. (2024). The effect of combinations of a glyphosate-based herbicide with various clinically used antibiotics on phenotypic traits of Gram-negative species from the ESKAPEE group. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68968-6>

Zobiolo, L., Kremer, R., Oliveira, R., & Constantin, J. (2010). Glyphosate affects micro-organisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1), 118–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04864.x>