



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE AGROECOLOGÍA
MAESTRÍA EN MANEJO SOSTENIBLE DE
AGROECOSISTEMAS

**Metabolitos secundarios producidos por
enterobacterias de suelo y su actividad contra
Fusarium oxysporum y *Phytophthora capcidi***

Tesis presentada como requisito para obtener el título de: Maestría

PRESENTA

DANIELA QUINTERO MORALES

COMITÉ TUTORAL:

DR. OMAR ROMERO ARENAS

DR. AGUSTÍN ARAGÓN GARCÍA

DRA. EDITH CHÁVEZ BRAVO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ ANTONIO RIVERA TAPIA

Puebla, Pue. Noviembre. 2016

A mi amigo,
A mi alumna,
A mi guerrero
Y a mí colibrí.

AGRADECIMIENTOS

Primero quiero agradecer al CONACYT, por la concesión de mi beca y al Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla que han permitido la realización de mis estudios de postgrado en la Universidad.

A mi tutor, Dr. José Antonio Rivera Tapia un gracias sincero por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación, gracias por el tiempo dedicado a este proyecto y por la enseñanza de que la ciencia, la prueba y el error no son trabajo cuando la experimentamos con pasión.

Así mismo agradezco a mis sinodales, Dr. Omar Romero, por sus consejos, apoyo y motivación al trabajo que se realizó, al Dr. Agustín Aragón por la experiencia en el campo compartida y a la Dra. Edith Chávez por su apertura y apoyo. A todos, mil gracias por permitirme ser parte de este grupo de investigación.

A mi asesora externa, Dra. Rayito por sus palabras de motivación, buenas vibras, acompañamiento en los experimentos, y en momentos claves de mi carrera. Gracias.

A mis amig@s y alumn@s por acompañarme en esta experiencia, por interesarse sobre lo que hago, buscarme en mis horarios disponibles, por sus palabras de aliento y reflexiones, por mostrarme que están ahí como una familia para mí. Los quiero.

Agradezco a mi familia por el apoyo que me han brindado, los abrazos, las conversaciones de motivación, risas, confianza, por compartir sus experiencias y estar felices por las buenas cosas que me han sucedido.

Gracias Roy por estar ahí presente, por compartir conmigo esas grandes virtudes que tienes, la paciencia, tu filosofía y apoyo incondicional, gracias por todo tu cariño.

Gracias Mamá por estar a mi lado en todo este camino, por tus palabras de comprensión, por tu alegría que iluminan mis días, por mostrarme y exigirme fortaleza y recordarme de quien soy hija. Gracias.

Gracias Papá por tu confianza, por apoyar mis decisiones, por inyectarme de espiritualidad en cada llamada.

Gracias a los dos por creer en mí y brindarme la mejor herencia los valores y buenos recuerdos, los amo.

Gracias, por ser mi ángel, por manifestarte cuando más lo he necesitado, por creer en mí, por enseñarme con un golpe fuerte que los sueños son para ser vividos. Gracias por estar conmigo y en mí por siempre. Gracias Tía.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS

ABSTRACT

RESUMEN

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	2
2.1	Tipos de suelos	2
2.2	Características físicas del suelo	3
2.3	Características químicas del suelo	4
2.4	Biología del suelo	4
2.5	Bacterias	4
2.6	Enfermedades de cultivos	6
2.7	Control biológico	6
2.8	Bacterias como control biológico (control microbiano).....	8
2.9	Metabolitos secundarios	8
2.10	Formación de biopelículas	9
2.12	Perfiles proteicos.....	11
3.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
4.	JUSTIFICACIÓN.....	12
5.	OBJETIVOS	14
5.1	General.....	14
5.2	Específicos	14
6.	HIPÓTESIS.....	14
7.	METODOLOGÍA.....	15
7.1	Toma de muestra	15
7.2	Aislamiento e identificación	16
7.3	Producción y extracción de metabolitos secundarios.....	17
7.4	Actividad antifúngica de metabolitos secundarios	17
7.5	Actividad antifúngica de aislamientos bacterianos.....	17
7.6	Determinación de perfiles proteicos.....	18

7.7	Cuantificación de biopelícula	19
7.8	Prueba ADNasa	19
7.9	Análisis Estadístico.....	19
8.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	19
8.1	Selección de cepas bacterianas e identificación	19
8.2	Actividad antifúngica de metabolitos secundarios contra <i>Fusarium oxysporum</i>	21
8.3	Actividad antifúngica de metabolitos secundarios contra <i>Phytophthora capcidi</i>	24
8.4	Actividad antifúngica de aislamientos bacterianos contra <i>Fusarium oxysporum</i>	28
8.5	Actividad antifúngica de aislamientos bacterianos contra <i>Phytophthora capcidi</i>	31
8.6	Determinación de perfiles proteicos.....	34
8.7	Cuantificación de biopelículas y fase planctónica	38
8.8	Actividad ADNasa	41
9.	CONCLUSIONES	43
10.	BIBLIOGRAFÍA	44

ABSTRACT

During the 60s, the properties of different soils that suppressed certain plant diseases (suppressive soils) began to be analyzed. The consequent reduction in the symptoms of these diseases was due to, among other causes, the presence of microorganisms with particular characteristics. A great variety of non-pathogenic microorganisms that affected the biology of other plant pathogenic microorganisms then started to be described, thus being capable of using these microorganisms as biological controls of plant diseases, naming them bio-control agents. The objective of this study was to determine the antifungal activity of bacteria extracted from different samples of soil against *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capcidi*, the quantification of biofilm by the bacterial isolates and the determination of protein profiles of the secondary metabolites.

Soil samples were taken from the localities of Acajete, la Malinche, San Bartolomé Hueyapan, Coatepec and Tetela de Ocampo in Puebla-Mexico, during the period of august 2014 to march 2015. Samples of soil of 500 grams were taken in each of these locations, specimens were isolated and identified by microbiological methods and chromogenic media. Microbiological cultures (treatments) were done in potato dextrose agar (BAM Media M127), fungi and bacteria grew at room temperature (~23°C) for a period of 7 days, with daily measurements of the growth diameter of *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capcidi*. Furthermore the bacterial isolates were assessed for its ability to form biofilms by quantifying its planktonic and adhesion phases, and by the use of electrophoresis the protein profiles of the secondary metabolites were found.

The genera identified were *Enterococcus* sp., (38%), *Pseudomonas* sp., (34%), *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., (18%), *Escherichia* sp., (7%), and *Stenotrophomonas* sp., (3%). The specimens were isolated, cultured, and assessed against both fungi. The genus displaying the best inhibitory action against *Fusarium oxysporum* was *Pseudomonas* sp., with 40%, followed by *Enterococcus* sp., with a 35%. *Phytophthora capcidi* showed more resistance against the microbiological cultures, with *Pseudomonas* sp., achieving a 30% inhibition in average.

Formation of biofilm in L-glutamic acid was better in concentrations between 3.5 and 30 mM, favoring the growth of *Pseudomonas* sp. The formation of biofilm and the release of antifungal metabolites, allows the consideration of *Pseudomonas* sp., as a candidate for its use as a biological control. Electrophoresis displayed proteins with molecular weights of the different genus in a range of 15 to 260 kDa, being the most frequent with molecular weights between 50 to 70 kDa.

Keywords: Antifungal, biofilms, protein profiles, *Phytophthora capcidi*, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas* sp., *Enterococcus* sp., biological control, soil.

RESUMEN

Durante los años 60, las propiedades de los diferentes suelos con capacidad de suprimir ciertas enfermedades de las plantas (suelos supresores) comenzaron a ser analizados, esta característica era debida a la presencia de microorganismos con características particulares. Una gran variedad de microorganismos no patógenos que afectan la biología de otros microorganismos patógenos de plantas comenzaron a ser descritos, siendo así capaz de usar estos como control biológico. El objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica de bacterias extraídas de suelo frente a *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capcidi*, la cuantificación de biopelícula y además la determinación del perfil proteico de los metabolitos secundarios.

Se tomaron muestras de suelo de las localidades de Acajete, la Malinche, San Bartolomé Hueyapan, Coatepec y Tetela de Ocampo en el Estado de Puebla-México, durante el periodo de agosto de 2014 y marzo de 2015. Los especímenes fueron aislados e identificados, los cultivos microbiológicos (tratamientos) se sembraron en medio papa dextrosa (BAM Medios M127), hongos y bacterias crecieron a temperatura ambiente (~ 23°C), midiéndose diariamente el diámetro de crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capcidi*. Además se evaluó la capacidad de formación de biopelículas y, por medio de la técnica de electroforesis se encontraron los perfiles proteicos de los metabolitos secundarios.

Los géneros identificados fueron *Enterococcus* sp., (38%), *Pseudomonas* sp., (34%), *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp (18%), *Escherichia* sp., (7%), y *Stenotrophomonas* sp., (3%). Estos géneros fueron confrontados contra *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capcidi*. El género que mostró mejor acción inhibitoria frente a *Fusarium oxysporum* fue *Pseudomonas* sp., con 40%, seguido por *Enterococcus* sp., con 35%. *Phytophthora capcidi* mostró mayor resistencia contra los cultivos microbiológicos, logrando el género de *Pseudomonas* sp., una inhibición de 30% en promedio.

La formación de biopelícula fue favorecida en concentraciones entre 3,5 y 30 mM de ácido L-glutámico, siendo los géneros *Enterococcus* sp., y *Pseudomonas* sp., los de mayor densidad óptica. La formación de biopelículas y la liberación de metabolitos antifúngicos, permite considerar a *Pseudomonas* sp., como un buen candidato para control biológico. La técnica de electroforesis mostró las proteínas de los diferentes géneros con pesos moleculares en un rango de 15 a 260 kDa, siendo los más frecuentes los pesos moleculares entre 50 a 70 kDa.

Palabras clave: Antifúngica, biopelículas, perfiles de proteínas, *Phytophthora capcidi*, *Fusarium oxysporum*, *Pseudomonas* sp, *Enterococcus* sp, el control biológico, suelo.

1. INTRODUCCIÓN

La demanda global de alimentos ha cambiado en los últimos 62 años al triplicarse la población mundial de 2500 millones en 1950 a 7000 millones en el 2012, este problema aumentará ya que se proyecta un aumento del 38% de la población mundial para el 2050 (Satorre, 2003).

En la agricultura moderna, se ha soslayado la sostenibilidad de la productividad agrícola y el uso de agroquímicos ha permitido obtener incrementos substanciales. Sin embargo, con la producción de monocultivos y la contaminación por uso indiscriminado de agroquímicos se ha reducido la biodiversidad de los agroecosistemas, causando la inestabilidad de los mismos, la cual se manifiesta en una mayor incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos (Zavaleta, 1994).

Desde los años cuarenta, el uso de plaguicidas ha aumentado de una manera continua, llegando a cinco millones de toneladas en 1995 a escala mundial. Se ha establecido que sólo un 0.1% de la cantidad de plaguicidas aplicados llega a la plaga, mientras que el restante circula por el ambiente, contaminando el suelo, agua y la biota (Carvalho *et al.*, 1998).

El control de enfermedades fúngicas se basa principalmente en el uso de pesticidas y no se recomienda el uso de estos debido a los altos costos y la baja ineficiencia de control (Handelsman *et al.*, 1996; Haas *et al.*, 2005).

El uso poco racional de los plaguicidas con acción específica ha llevado a la generación de patógenos resistentes, un ejemplo claro lo constituyen los benzimidazoles, fungicidas que actúan sobre la tubulina. También se han encontrado hongos con mutaciones puntuales que modifican en un aminoácido la secuencia de la tubulina convirtiéndose en resistentes al fungicida. Como lo reporta Vincent (1992) donde demuestran la alta frecuencia de aparición de asilamientos de *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, resistentes al tiabenazol, aislando alrededor de 300 cepas provenientes de distintas regiones de las cuales cerca del 60% resultaron resistentes.

El control biológico de las enfermedades utilizando microorganismos (fungicidas microbianos) es una alternativa importante para el control químico de enfermedades de manera eficiente y sin o con pocos efectos nocivos a los seres humanos, animales o al ambiente. Existen en un total 14 fungicidas microbianos registrados que presentan fuerte capacidad antibiótica y antifúngica, conteniendo principalmente *Bacillus* spp (Kloepper *et al.*, 2004; Agrios, 2005; Ongena *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2010; Sansinenea y Ortiz, 2011).

2. ANTECEDENTES

El suelo es resultado de la transformación en el transcurso del tiempo, de un material geológico por la influencia de diversos procesos físicos, químicos y biológicos (Casas, 2012). En este espacio interactúan elementos de la atmósfera e hidrosfera, de la litosfera y de la biosfera, realizándose intercambios de materiales y energía entre lo biótico y abiótico, produciéndose una enorme complejidad (Jaramillo *et al.*, 1994).

2.1 Tipos de suelos

Debido a su ubicación geográfica, a su topografía y a sus climas, los suelos de México son complejos, se encuentran al menos 15 tipos. Por su extensión destacan tres de ellos: regosol, litosol y xerosol (Tabla 1).

El regosol es el de mayor extensión y puede definirse como la capa de material suelto que cubre la roca; sustenta cualquier tipo de vegetación, dependiendo del clima; sin embargo, su uso es principalmente forestal y ganadero, aunque puede ser utilizado en proyectos agrícolas y de vida silvestre. Además abarca la mayoría de los suelos del territorio y también se localiza en lomeríos y planos, así como en dunas y playas (Schettino, 2010).

El segundo en abundancia es el litosol, se encuentran en todos los climas y puede sustentar cualquier tipo de vegetación, en todas las sierras de México, barrancas, lomeríos y en algunos terrenos planos. El uso de estos suelos depende principalmente de la vegetación que los cubre, en bosques y selvas su uso es forestal; cuando hay matorrales o pastizales se puede llevar a cabo un pastoreo limitado y en algunos otros casos se destinan a la agricultura. Su fertilidad natural y la susceptibilidad a la erosión son muy variables dependiendo de otros factores ambientales (INEGI, 2004).

El xerosol es el tercero de ellos y se caracteriza por ser un suelo de zona seca o árida; la vegetación natural que sustenta son matorrales y pastizales; el uso pecuario es el más importante, aunque, si existe riego, se obtienen buenos rendimientos agrícolas. Su ubicación está restringida a las zonas áridas y semiáridas del centro y norte del país (Schettino, 2010).

Tabla 1. Tipos de suelo en México y sus características

Tipo	Características
Regosol	Suelos poco desarrollados, constituidos por material suelto semejante a la roca.
Litosol	Suelos muy delgados, cuyo espesor es menor de 10 cm; descansa sobre un estrato duro y continuo, tal como roca, tepetate o caliche.
Xerosol	Suelos áridos que contienen materia orgánica; la capa superficial es clara, debajo de ésta puede haber acumulación de minerales arcillosos y/ o sales, como carbonatos y sulfatos.
Yermosol	Suelo semejante a los xerosoles; difieren en el contenido de materia orgánica en su parte superficial.
Cambisol	Suelo de color claro, con desarrollo débil, presenta cambios en su consistencia debido a su exposición a la intemperie.
Vertisol	Suelos muy arcillosos, con grietas anchas y profundas cuando están secos; si se encuentran húmedos son pegajosos; su drenaje es deficiente.
Feozem	Suelo con superficie oscura, de consistencia suave, rica en materia orgánica y nutrientes.
Rendzina	Suelos poco profundos (10-15cm) que sobreyacen directamente a material carbonatado (ejemplo de roca caliza).
Otros	Luvisol, acrisol, andosol, solonchak, gleysol, castantildeozem, planosol.

Fuente: Tomado de INEGI, 2004.

2.2 Características físicas del suelo

Las principales características físicas del suelo son profundidad libre (espesor del conjunto de horizontes del perfil del suelo que las raíces pueden explorar sin ningún tipo de limitación), color (permiten conocer la composición y procesos que hay en el suelo), elementos gruesos (fragmentos de roca o de mineral aparente mayor de 2 mm), textura (proporción relativa de cada una de las partículas), estructura, porosidad (relación que existe entre el volumen total de huecos y el volumen total de suelo) y capacidad de retención de agua (Casas, 2012).

2.3 Características químicas del suelo

La química de suelos puede considerarse como una parte elemental de las ciencias del suelo, con base en la información sobre la composición, las propiedades y las reacciones químicas que ocurren en los suelos, se pueden aclarar problemas relacionados con la fertilidad y la nutrición vegetal; los resultados de los análisis químicos permiten generar una base para la planificación del desarrollo agrícola, ganadero y forestal (Hans y Bornemisza, 1994).

Dentro de sus características se consideran: elementos nutritivos (componentes químicos que limitan el desarrollo de la biodiversidad), complejo de intercambio catiónico (los cationes cambiables influyen en la estructura, la actividad biológica, el régimen hídrico y gaseoso, la reacción, los procesos genéticos del suelo y en su formación), el pH (corresponde a la concentración de iones hidrógeno y de iones hidroxilos, el pH ideal es de 6.5 a 7.2, determinando la actividad microbiana en la descomposición de la materia orgánica), conductividad eléctrica (es un potencial que estima la variabilidad espacial del contenido de arcilla y humedad del suelo) (Simón *et al.*, 2013).

2.4 Biología del suelo

El suelo es un medio donde se encuentra una gran actividad biológica y los organismos presentes incluyen virus, bacterias, actinomicetes, hongos, algas, protozoos, nemátodos, lombrices, ácaros y colémbolos, entre otros. Todos los organismos mencionados son importantes para construir el ambiente suelo y para realizar importantes transformaciones en el mantenimiento de la interacción vegetal y animal (Fassbender, 1982; Wild, 1992).

2.5 Bacterias

Son organismos unicelulares de tamaño de 0.5 y 5 μm , que se pueden reproducir de forma independiente, siendo los organismos más numerosos del suelo, a menudo exceden 10^7 a 10^8 por g de suelo. Las variaciones morfológicas varían entre cocos, bacilos y espirilos, con bacilos cortos dominando en la mayoría de las poblaciones del suelo (Marcelo, 2004).

La compleja trama de la vida microbiana que se desarrolla en los suelos se sustenta en dos grandes elementos, la materia orgánica y la biomasa microbiana, esta última transforma los aportes orgánicos que llegan al suelo, manteniendo la conservación y la productividad del suelo, junto con las

propiedades físicas, químicas y biológicas del sistema edáfico (Varnero, 2006). Estos organismos son importantes en los procesos de descomposición de la materia orgánica y en el reciclaje de energía y de nutrientes como N, P, S, Fe y Mn.

Algunas bacterias son capaces de utilizar el nitrógeno atmosférico, fijándolo en la planta y así contribuyendo a su nutrición. Dentro del grupo de las bacterias también se presentan especies que producen antibióticos y toxinas para otros organismos del suelo, así como patógenos de animales y vegetales (Tabla 2) (Varnero, 2006).

Tabla 2. Bacterias de importancia en el suelo

Grupos de Bacterias	Género	Importancia
Bacterias degradadoras	<i>Pseudomonas</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Flavobacterium</i> <i>Micrococcus</i>	Degradación de materias orgánicas como carbohidratos, proteínas. Producción de gas metano en anaerobiosis.
Bacterias nitrificantes	<i>Nitrobacteri</i> <i>Nitrosomonas</i>	Oxidan compuestos de N inorgánico como NH ₃ .
Bacterias desnitrificantes	<i>Bacillus Pseudomonas</i>	Reducen nitrato y nitrito a N gaseoso (N ₂) u óxido nitroso.
Bacterias fijadoras de N ₂	<i>Azotobacter</i> , <i>Clostridium</i> <i>Rhizobium</i>	Capaces de fijar N ₂ atmosférico en forma libre o en simbiosis con leguminosas hasta NH ₃ .
Bacterias sulfuro	<i>Thiobacillus</i>	Oxida sulfuro y hierro.
Bacterias filamentosas de hierro	<i>Spherotillus Leptothris</i>	Formadoras de lodos, oxidan hierro.

2.6 Enfermedades de cultivos

Tanto en ecosistemas agrícolas como en ecosistemas naturales las plantas son afectadas por enfermedades que reducen su productividad, su fecundidad y su sobrevivencia. En sistemas agrícolas estas reducciones a menudo se traducen en pérdidas económicas para los agricultores, precios más elevados para los consumidores y en no pocos casos han resultado en ruina y hambrunas en regiones enteras (Arauz, 1998).

Una de las definiciones más utilizadas para el término de enfermedad en la planta es la propuesta por Bateman (1978), quien cita que una enfermedad es “una alteración fisiológica dañina a la planta, causada por la irritación continua por un agente extraño”. Un organismo capaz de causar una enfermedad se denomina organismo patógeno, y uno que afecta específicamente a las plantas se denomina fitopatógeno. La mayoría de los fitopatógenos son microorganismos, entre ellos los más comunes son hongos, virus, bacterias y nematodos (Arauz, 1998).

Los hongos son organismos eucarióticos y pueden ser unicelulares y multicelulares, describiéndose cerca de 103 órdenes, 484 familias, 5000 géneros y hasta 100 mil especies, esta cifra representa sólo una fracción de la verdadera diversidad de estos organismos (Hawksworth *et al.*, 1995). Las especies de hongos se clasifican en: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Glomeromycota*, *Basidiomycota* y *Acomycota* (Jaramillo, 2002).

Los hongos aislados fácilmente del suelo pertenecen a los géneros: *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Tanto los hongos como las bacterias depende de carbono preformado para su nutrición, ellos responden rápidamente cuando los sustratos son agregados a los suelos, especialmente cuando contienen azúcares solubles. Los hongos parecen ser dominantes en la degradación de la celulosa, hemicelulosas y lignina que a su vez predominan en suelos ácidos debido que al acidificarse un suelo, las bacterias suelen disminuir su número y los hongos proliferan al tener una competencia menor por los sustratos (Marcelo, 2004).

2.7 Control biológico

El control biológico fue concebido a inicios del siglo XIX (Badii *et al.*, 2000), cuando algunos naturistas de diferentes países reseñaron el importante papel de los organismos entomófagos en la naturaleza. Con el empleo de la lucha o control biológico se intenta restablecer el perturbado

equilibrio ecológico, mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos, para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales (Badii *et al.*, 2006).

En 1987 la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos de Norte América definió al control biológico, según Erwin y Ribeiro (1996) como “El uso de organismos naturales o modificados, genes o productos de genes para reducir el efecto de organismos indeseables (plagas) y favorecer organismos deseables como cultivos, árboles, animales e insectos y microorganismos benéficos”. Gabriel y Cook (1990), mencionaron que el control biológico debe incluir organismos (hiperparásitos y antagonistas) naturales o genéticamente modificados, así como hospederos resistentes. En general las definiciones de control biológico, cuanto más recientes más enfatizan el enfoque reduccionista, respecto al enfoque holístico (Bautista *et al.*, 2008).

Un organismo indeseable puede eliminarse localmente o, lo que resulta mejor, su población puede reducirse a una escala que no cause daño económico. La erradicación completa de plagas resulta ambiciosa y en la mayoría de los casos trae problemas ecológicos. El control biológico busca reducir las poblaciones de la plaga a una proporción que no cause daño económico y, permite una cantidad poblacional de la plaga que garantiza la supervivencia del agente controlador (Audesirk, 2014).

Esta práctica de control se trata de una técnica milenaria que utilizaron culturas como la China en el siglo III, y fue a partir de finales del siglo XIX cuando el control biológico de plagas despertó un gran interés debido al éxito que se consiguió con la introducción de la mariquita *Rodolia cardinales* para el control de la cochinilla acanalada *Icerya purchasi* (Audesirk, 2014).

El control biológico en fitopatología ha buscado la introducción y establecimiento generalmente de solo un aislamiento de determinada cepa antagónica que, en grandes cantidades, es introducido en el suelo contra uno o varios fitopatógenos con origen en el suelo (Papavizas, 1981; Berger *et al.*, 1996; Larena *et al.*, 2002; Jacobsen *et al.*, 2004). Sin embargo, debido a la homeostasis del suelo no es frecuente lograr el establecimiento del antagonista (Gindrat, 1979) y el control biológico con este enfoque no ha resultado exitoso.

El control biológico de plagas dejó de practicarse con la generalización de la lucha química como medida de control de plagas, enfermedades y malezas, hasta que por diversos problemas que ocasionó el uso intensivo de pesticidas, ganó de nuevo terreno como alternativa en el manejo de la salud vegetal (Audesirk, 2014).

2.8 Bacterias como control biológico (control microbiano)

El control biológico microbiano es una estrategia de manejo integrado de plagas (MIP) mediante el cual la actividad de una especie bacteriana reduce la población de otros organismos, estos pueden ser insectos u hongos (Flint *et al.*, 1998).

Todos los microorganismos establecen relaciones con diversos organismos que puedan causar enfermedades o la muerte, el control microbiano o microbiológico utiliza los microorganismos para controlar enfermedades. Estos microorganismos pertenecen a los siguientes grupos: bacterias, virus, hongos y protozoarios (Clara, 2008).

La exploración de la diversidad microbiana, la producción de gran cantidad de metabolitos secundarios y el desarrollo de biopelículas ha llevado a considerar a las bacterias como una fuente importante de productos biológicos con propiedades antibacterianas, antifúngicas, antitumorales, antiparasitarios, herbicidas e insecticidas, entre otros (Vining, 1990).

Más de 90 especies de bacterias se han aislados de insectos, plantas y suelos, pero unas pocas se han estudiado intensivamente, de tal manera la bacteria entomopatógena más conocida y desarrollada hasta ahora es *Bacillus thuriensis* (Audesirk, 2014).

El control microbiano presenta las siguientes ventajas: la especificidad (las bacterias en general son muy específicas en su infección del huésped, algunas solo atacan una especie de huésped que facilita el control de plagas), multiplicación y dispersión natural (la multiplicación de bacterias es favorecida por la naturaleza, normalmente crecen en gran variedad de sustratos y permanecen en el área de liberación o presencia para infectar otros nuevos huéspedes), efectos secundarios (algunas veces no matan a su huésped, pero alteran su biología y consecuentemente su tasa de reproducción), toxicidad (en general no afectan al ambiente, no son tóxicos para la salud humana y de otros animales), y economía (la producción de bioplaguicidas puede ser en países de desarrollo, una alternativa económica para los productores pequeños) [Helmuth, 2000].

2.9 Metabolitos secundarios

La actividad metabólica microbiana no tiene siempre como consecuencia la proliferación celular. Si se considera la actividad metabólica de un cultivo microbiano a lo largo de toda la curva de crecimiento se diferencian aquellos procesos metabólicos asociados al crecimiento de la biomasa total

(metabolismo primario) de aquellos que tienen lugar en la fase estacionaria, donde se forman productos que no son esenciales para el crecimiento del organismo (metabolismo secundario). Como resultado del metabolismo secundario se producen diferentes tipos de compuestos bajo la denominación de metabolitos secundarios (Helmuth, 2001).

Los metabolitos secundarios de acuerdo con Demian, 1996; Madigan et al., 1998; Helmuth, 2001 se definen por las siguientes características: a) son productos naturales que tienen una distribución taxonómica restringida, b) se forman una vez que el crecimiento se ha detenido, c) suelen sintetizarse como una mezcla de compuestos químicamente relacionados, d) generalmente son sintetizados como compuestos químicos con diversidad estructural por ejemplo: alcaloides, flavonoides, benzoquinonas, glucósidos, tetracilclinas, cumarinas, aminoazúcares, macrólidos, salicilatos, etc., e) están en relación a diferentes etapas del desarrollo (esporulación y acumulación de productos de reserva), f) la producción de elementos que contribuyen a la colonización de espacio y nutrientes (antibióticos y toxinas), y g) son productos de complejas rutas biosintéticas. En la década de 1940, las investigaciones del metabolismo secundario se centraron particularmente sobre la producción de sustancias tóxicas para microorganismos patógenos (antibióticos) y en la década de 1960 en la producción de sustancias con especiales efectos sobre animales y vegetales (toxinas y promotores de crecimiento) [Helmuth, 2001].

2.10 Formación de biopelículas

La biopelícula es una población de células adheridas irreversiblemente en distintas superficies bióticas o abióticas, estos se encuentran unidos mediante una matriz de sustancias exopoliméricas que ellas mismas producen, como mecanismo de supervivencia y de protección; estas sustancias pueden ser proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos (Costerton, 1999). Han sido ampliamente documentadas para algunas especies bacterianas incluyendo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Vibrio cholerae* (O'Toole et al., 1998; Pratt et al., 1998; Watnick et al., 1999).

Las biopelículas promueven las interacciones metabólicas de antagonismo, mutualismo, competencia interespecífica y relaciones comensales. Estas matrices incrementan la resistencia a antibióticos y antimicrobianos (Spoering and Lewis, 2001; Parsek and Fuqua, 2004; Kirisits et al., 2005; Lindsay and Von Holy, 2006; Mangallappalli-Illathu and Korber, 2006; Sutherland et al., 2007; Boles y Horswill, 2008).

También cuando se liberan células de la biopelícula, éstas pueden viajar y depositarse en nuevos nichos de colonización manteniendo las mismas características de una biopelícula adherida a una superficie (Watnick *et al.*, 2000).

En el área de las ciencias médicas la perspectiva de las biopelículas es orientada a su erradicación, puesto que genera un medio contaminado (biofouling). Un gran número de infecciones en el humano son causadas por biopelículas incluyendo la caries dental, la enfermedad periodontal, otitis media, infecciones músculo- esqueléticas, infección del tracto biliar, endocarditis bacteriana y neumonía en pacientes con fibrosis quística (Costerton *et al.*, 1999), sin embargo tiene el poder de desarrollarse en diferentes superficies y puede plantearse desde una perspectiva positiva en el control de plagas. *Bacillus subtilis* ATCC6633 en medios ideales mostró la formación de biopelículas además de sintetizar metabolitos de naturaleza proteínica y otros con capacidad surfactante, posicionando a esta bacteria en una situación competitivamente ventajosa (Sarti *et al.*, 2013).

Las biopelículas en el campo industrial están implica en la biorremediación de aguas residuales con sistemas de cultivo microbiano que puedan degradar materiales orgánicos (Garrido *et al.*, 1996).

2.11 Actividad ADNasa

La actividad ADNasa hace referencia al proceso en el cual la enzima desoxirribonucleasa (dímero de pirimidina) genera una muesca o corte simple sobre la cadena dañada, produciendo dos extremos uno hidroxilo y uno fosfato (Braun *et al.*, 1976; Riazuddin *et al.*, 1977). *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno oportunista que ocupa una amplia variedad de nichos ambientales, su ADN extracelular es omnipresente en varios entornos siendo una rica fuente de carbono, nitrógeno y fosfato. *P. aeruginosa* es capaz de utilizar el ADN como una fuente de nutrientes; en condiciones de limitación de fosfato se une a la expresión de un gen que codifica una desoxirribonucleasa extracelular, que se requiere para la degradación del ADN y la utilización de éste como fuente de Carbono, Nitrógeno y Fosfato, siendo así una implicación importante para la virulencia y la formación de biopelículas (Mulcahy *et al.*, 2010).

2.12 Perfiles proteicos

Las bacterias han mostrado tener una gran capacidad de adaptación al ambiente, mediante la evolución de sus proteínas, permitiéndoles habitar en distintos ambientes (Pappas *et al.*, 2006), la determinación de las funciones de una proteína, así como de los mecanismos desencadenados para llevar a cabo tales funciones, implica años de experimentación así como una fuerte inversión económica, es por eso, que el empleo de programas de predicción y de comparación para el análisis de estructuras primarias, secundarias y terciarias de las proteínas, brinda la posibilidad de conocer sus funciones más probables al compararlas con otras biomoléculas proteicas cuyas funciones han sido descritas con gran detalle, lo que permite orientar con gran precisión los protocolos de experimentación antes y después de su realización para comprender con mayor visión los mecanismos por medio de los cuales una biomolécula puede realizar actividades ya sean catalíticas, de transporte, mensajeras y del reconocimiento del medio (Claverie *et al.*, 2003 y Nelson *et al.*, 2004).

Los insectos normalmente contienen un gran número de bacterias, la mayoría son saprofitas y comensales, y algunas son simbióticas. Relativamente pocas especies bacterianas han sido descritas como patógenas de insectos, sin embargo estas han recibido gran atención debido a su potencial para el control de plagas en la agricultura y el control de vectores en enfermedades (Van *et al.*, 2004).

Las bacterias entomopatógenas más conocidas y utilizadas son las formadoras de esporas de la familia *Bacillaceae*, en especial algunas especies del género *Bacillus* (Priest, 2000 y Nicholls-Estrada, 2008). Coincidiendo con la esporulación, estas bacterias son capaces de formar inclusiones cristalinas paraesporales, que muchas veces son las que contienen una o más proteínas insecticidas. Estas proteínas son tóxicas para los insectos por ingestión, cuya acción generalmente es sobre las células del epitelio del intestino medio (De Maagd *et al.*, 2003).

Bacillus pumilus en estado de esporulación expresa proteínas en un rango de 25 y 75 kDa, siendo esta una de las especies más utilizadas en la industria química, con propiedades antifúngicas y con escaso estudio, pero con potencialidad insecticida (Saranya *et al.*, 2014).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México, el conocimiento que se tiene de los hongos patógenos de la raíz es principalmente sobre su biología de los daños que causan en plantas de importancia agronómica y sus formas de control, principalmente biológicas (fungicidas). El mayor número de trabajos de investigación se ha realizado sobre los géneros *Phytophthora*, *Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Pythium* y *Phymatotrichum*, debido al amplio rango de plantas hospedantes que atacan, a su distribución cosmopolita y a los elevados daños económicos que provocan en cultivos de importancia económica.

Debido a que estos patógenos de plantas condicionan una reducción de rendimiento en los campos de cultivos del 20% en todo el mundo (Pimentel y Lehman, 1993), se ha generado una demanda de fungicidas en la agricultura. El principal método de manejo de plagas y enfermedades de los cultivos ha sido el control químico; pero, problemas tanto de contaminación ambiental, que han impactado negativamente en la biodiversidad de los agroecosistemas, como de seguridad y salud pública inherentes a la fabricación y uso inadecuado de los agroquímicos, ha conducido a la búsqueda y desarrollo de alternativas ecológicas, como lo es el uso de metabolitos de origen bacteriano para el control de algunas enfermedades en cultivos agrícolas.

4. JUSTIFICACIÓN

Los insecticidas y fungicidas químicos presentan ciertos inconvenientes como: la selección de nuevas resistencias en las poblaciones de plagas, el resurgimiento de las poblaciones tratadas, residuos, riesgos y complicaciones legales, combate de enemigos naturales, aumento de costo, equipo, mano de obra y material. Así mismo se ha incrementado la demanda de productos libres de los mismos por los consumidores impulsando así el desarrollo de nuevas tecnologías más amigables con el ambiente, como el control biológico (Badii *et al.*, 2006).

Entre los grupos bacterianos más estudiados en el control biológico están las especies del género *Bacillus* que colonizan agua, aire y suelos. *Bacillus subtilis* no es patogénico o toxicogénico para humanos, animales o plantas, y produce moléculas bioactivas que tienen una fuerte capacidad antifúngica (Ongena *et al.*, 2005). Otra especie es *Bacillus megaterium* la cual ha mostrado control en pimienta infestada de *Phytophthora capsici* (Akgül y Mirik, 2008).

Hasta el momento solo se conocen 3 especies de *Bacillus* con posibilidad de ejercer control sobre insectos, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus sphaericus*, y *Bacillus popilliae*. Estas especies presentan

algunas subespecies y muchas razas que durante su proceso de esporulación producen cristales proteicos con efecto insecticida y/o algunas toxinas con el mismo efecto (metabolitos secundarios). Estas bacterias han sido encontradas colonizando insectos de los órdenes Díptera, Orthoptera, Hymenoptera y Coleoptera (Badii *et al.*, 2006).

Las biopelículas son comunidades de células microbianas embebidas en una matriz de exopolímeros que ellas mismas producen, como mecanismo de supervivencia y protección (Branda *et al.*, 2005). Según las condiciones de cultivo, algunos miembros de *Bacillus* producen biopelículas, que pueden adherirse sobre una gran variedad de superficies bióticas y abióticas (Rudrappa *et al.*, 2008; Monds y O'Toole, 2009) produciendo así enzimas con capacidad plaguicida, bactericida y anti fúngicas (Rahman y Ano, 2007).

En España existen hasta 28 preparados comerciales de bacterias entomopatógenas y su acción depende de la cepa elegida para cada tipo de plaga, destacando: *Bacillus thuringiensis aizawai* y *Bacillus thuringiensis kurstaki* contra lepidópteros, *Bacillus thuringiensis irraelensis* contra dípteros y *Bacillus thuringiensis tenebrionis* contra coleópteros. *B. thuringiensis* representa nula toxicidad para animales superiores y resulta totalmente inocuo para abejas y abejorros (Badii *et al.*, 2006).

En México, los plaguicidas microbianos están siendo introducidos con éxito en el control de plagas de cultivos como café, caña de azúcar, frijol y maíz. Estos productos son elaborados a base de bacterias, hongos, virus o nematodos entomopatógenos. Sin embargo, pocos agentes entomopatógenos se han desarrollado como agentes de biocontrol efectivo, uno de ellos es la bacteria *B. thuringiensis* para el control del gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* abarcando cerca del 74% del mercado, los hongos 10%, los virus 5% y otros el 11%. Los bioplaguicidas anteriores han demostrado que al ser utilizados en forma adecuada en el control biológico de plagas favorecen la práctica de una agricultura sustentable, con menor dependencia de insecticidas químicos (Nava *et al.*, 2012).

5. OBJETIVOS

5.1 General

Evaluar la capacidad antagonista de los metabolitos secundarios producidos por enterobacterias aisladas de suelo contra *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capcidi*.

5.2 Específicos

Aislamiento e identificación de la carga bacteriana de las muestras de suelos.

Obtención de metabolitos secundarios de los diferentes aislamientos bacterianos.

Evaluar la capacidad antifúngica de los metabolitos secundarios y cultivos bacterianos.

Determinación del perfil proteico de los metabolitos secundarios.

Determinar la capacidad de formar biopelículas por parte de los aislamientos bacterianos.

Evaluación de actividad ADNasa de los aislamientos obtenidos.

6. HIPÓTESIS

Los metabolitos secundarios producidos por bacterias aisladas del suelo tendrán actividad antagonista frente a *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capcidi*.

7. METODOLOGÍA



7.1 Toma de muestra

Se realizaron muestreos durante los meses de Agosto 2014 a Marzo 2015 en Acajete (19°10'20.70"N, 97°54'22.35"O), la Malinche (19°13'45.25"N, 98° 2'53.61"O), San Bartolomé Hueyapan (19° 1'33.44"N, 97°55'55.30"O) y Tetela de Ocampo (19°48'57.51"N, 97°48'22.32"O) (Figura 1). Se muestrearon 500 g de suelo en cada una de las localidades, transportándose en bolsas plásticas estériles a temperatura ambiente al laboratorio. Se pesaron 2.5 g de cada una de las diferentes muestras, diluyéndose en 25 mL de caldo nutritivo y con un agitador orbital se homogenizaron por 24 horas a 120 rpm.



Figura 1. Zonas de muestreo en estado de Puebla y Tlaxcala.

7.2 Aislamiento e identificación

Se realizaron diluciones 10^{-5} seriadas de cada muestra en caldo nutritivo incubándose a 37°C durante 24 horas (CLSI, 2012). Se sembraron $50\ \mu\text{L}$ en agar nutritivo e incubaron a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, todas las colonias que crecieron en el medio y que presentaron diferencias macroscópicas fueron seleccionadas, tomando el mayor número posible de colonias. Los aislamientos son conservados en su totalidad a -20°C en agar nutritivo. Los aislamientos fueron identificados con la ayuda de medios cromogénicos (CHROMagarTM Orientation).

7.3 Producción y extracción de metabolitos secundarios

Se prepararon siguiendo la metodología descrita por (Baur *et al.*, 2006; Frykman *et al.*, 2006) con modificaciones. Una única colonia de cada bacteria aislada se inoculó en 5 mL de caldo nutritivo durante 12 horas a 37°C. Al día siguiente 1 mL de éste cultivo se colocó en un matraz con 50 mL de caldo nutritivo y enseguida, se agregaron 2 mL (4% p/v) de resina absorbente Amberlite® XAD16. La incubación se realizó a 30°C durante 3 días a 150 rpm, al cabo de este tiempo, la resina se recuperó por decantación y los metabolitos se eluyeron con 15 mL de alcohol etílico al 99.9% (v/v), concentrándolos por evaporación hasta obtener 12 mL de extracto y conservándolos a -20°C.

7.4 Actividad antifúngica de metabolitos secundarios

Se evaporaron 3 mL de cada uno de los extractos durante 3 días, una vez obtenido el concentrado se diluyó en 1 mL de agua destilada.

Se realizó una siembra en placas de papa dextrosa (PDA) de *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*, colocándose los hongos obtenidos con sacabocado No. 5 y localizados equidistantemente en la placa. En el centro de la placa se realizó un pozo en el cual se depositaron 50 µL de cada extracto a evaluar, incubándose a 30°C por 24 horas. Se observó el crecimiento de los hongos durante una semana esperando con la finalidad de cuantificar halos de inhibición alrededor de los pozos, en el caso de que se presentara capacidad antifúngica por parte de los metabolitos.

7.5 Actividad antifúngica de aislamientos bacterianos

A partir de los géneros identificados se inocularon cada uno en 1 mL de caldo nutritivo y se incubaron durante 24 horas a 37°C, enseguida se colocaron 5 sensidiscos en cada tubo inoculado previamente.

Se realizó una siembra en placas PDA de *P. capsici* y *F. oxysporum*, colocándose los hongos obtenidos con sacabocado No. 5 y localizados equidistantemente en la placa. Enseguida se distribuyeron en el centro de las placas los sensidiscos previamente impregnados con los cultivos bacterianos, incubándose a 30°C por 24 horas. Se observó el crecimiento micelial durante una semana prestando atención a la presencia de halos de inhibición de *P. capsici* y *F. oxysporum* para determinar

cuáles aislamientos bacterianos presentan antagonismo, al séptimo día de crecimiento se observaron y se midieron los halos de inhibición (mm).

Los radios de inhibición fueron calculados con la siguiente ecuación:

$$\text{Radio de inhibición (\%)} = ((PB - PC)/PB)*100$$

Donde PB= Promedio del radio de crecimiento del hongo en blanco.

PC= Promedio del radio de crecimiento del hongo en confrontación de metabolitos o bacterias.

Los hongos fitopatógenos utilizados en este estudio como blanco para evaluar la actividad antifúngica fueron: *P. capsidi* y *F. oxysporum*. Todas las cepas de hongos fitopatógenos crecieron a 30°C en medio agar PDA, realizando pases para el mantenimiento de la cepa cada 7 ó 10 días de acuerdo al crecimiento del hongo.

7.6 Determinación de perfiles proteicos

Se elaboraron geles de poliacrilamida al 12.5% en los cuales se corrieron los extractos obtenidos a partir de los géneros bacterianos aislados, con la finalidad de evidenciar cada uno de sus perfiles proteicos.

A partir de los cultivos bacterianos se obtuvo la fracción proteica (extracto) por medio de la resina Amberlite® XAD16, evaporándose 3 mL de cada uno de los extractos durante 3 días, una vez obtenido el concentrado se diluyó en 1 mL de agua destilada. En seguida las muestras fueron llevadas a baño maría por 5 minutos y una vez que la muestra alcanzó la temperatura ambiente se cargó en el gel.

Las muestras se corrieron a 40 V durante 1 hora para el empaquetamiento, una vez que alcanza al gel concentrador se elevó a 70 V durante 2 horas. Los geles fueron teñidos con Azul de Coomassie y desteñidos con la solución desteñidora y los geles se interpretaron con la ayuda de un fotodocumentador.

7.7 Cuantificación de biopelícula

Las bacterias aisladas se colocaron en placas de 96 pocillos con cultivos de 24 horas en un medio mínimo salino, glicerol 1% y las siguientes concentraciones de ácido L-glutámico: 3.5, 10, 20, 30, 40, 50, 60,70, y 80 mM, se incubaron a 24 horas por 30°C. Transcurrido este tiempo se cuantificó la fase planctónica a una absorbancia de 492 nm; enseguida se eliminó el sobrenadante y se lavó con agua destilada, adicionando 20 µL de cristal violeta a cada uno de los pozos dejándose incubar por 15 minutos. A continuación se lavó con agua destilada y se agregaron 230 µL de etanol a cada pozo dejándose interaccionar durante 2 minutos y se cuantifico la biopelícula a 550 nm.

7.8 Prueba ADNasa

Se evaluó la actividad de ADNasa inoculando en agar una estría central delgada de cada uno de los 5 géneros bacterianos aislados, incubándose a 37°C por 24 horas. Enseguida, los cultivos fueron cubiertos con 100 µL de HCl 1 N, la aparición de una zona clara alrededor del crecimiento microbiano se considera reacción positiva a actividad de ADNasa.

7.9 Análisis Estadístico

Los datos obtenidos de la actividad antifúngica de los metabolitos secundarios y cultivos bacterianos fueron analizados con la prueba de ANOVA y su comparación múltiple de Tukey, con una $\alpha=0.05$ (IBM SPSS).

8. RESULTADOS Y DISCUSION

8.1 Selección de cepas bacterianas e identificación

Las muestras de suelo fueron extraídas de 5 zonas diferentes entre ellas de San Bartolomé Hueyapan donde los cultivos y metabolitos identificados tuvieron una mayor actividad antifúngica, este suelo tiene es de tipo Litosol y Cambisol (INAFED, 2015), sin embargo es importante considerar que la muestra fue tomada en zonas de cultivo de maíz.

La zona de muestreo de Coatepec corresponde en su mayoría a un suelo de tipo Andosol (41%), Luvisol (35%), Phaeozem (11%), Vertisol (4%) y Leptosol (1%). Por otro lado la zona de muestreo de Acajete tiene una distribución de tipo Arenosol (36%), Leptosol (18%), Fluvisol (11%), Cambisol (5%), Durisol (4%), Luvisol (3%) y Phaeozem (3%) (INEGI, 2009). Independientemente de los tipos de suelo que se presentan en estas zonas, las muestras fueron extraídas de áreas de cultivo presentando así una mayor diversidad de bacterias con actividad antifúngica, esto puede relacionarse con el tipo de agua de riego, a un mayor dinamismo inducido en el ciclo de nutrientes o así como a la existencia de una mayor actividad antropogénica. Sin embargo no hay bases de datos sobre la calidad microbiológica del agua de riego, aunque cada vez se presentan más pruebas del posible papel del agua como fuente de inóculo de patógenos (Pachepsky *et al.*, 2011). Esta es una omisión importante en vista del hecho de que las bacterias se propagan a través del ciclo del agua y de las masas de aire (Morris *et al.*, 2000).

Asimismo las muestras de suelo tomadas de la Malinche y de Tetela de Ocampo provienen de zonas con baja actividad antropogénica y nula presencia de aguas de riego, mostrando una menor actividad antifúngica.

Se realizaron un total de 44 aislamientos bacterianos para la producción y extracción de metabolitos secundarios. A partir de los cuales se identificaron los géneros *Enterococcus* sp. (38%), *Pseudomonas* sp. (34%), *Escherichia* sp. (7%), *Stenotrophomonas* sp. (3%), el grupo *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp. (18%) (Tabla 3).

Tabla 3. Géneros aislados en las diferentes zonas de estudio.

Zona	Malinche	Acajete	Coatepec	Tetela de Ocampo	San Bartolomé Hueyapan	Total
Género						
<i>Enterococcus</i> sp.	5	0	0	6	6	17
<i>Pseudomonas</i> sp.	3	2	2	4	4	15
<i>Escherichia</i> sp.	0	2	0	0	1	3
<i>Klebsiella</i> sp., <i>Enterobacter</i> sp., <i>Citrobacter</i> sp., <i>Serratia</i> sp.	0	5	3	0	0	8
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	0	0	1	0	0	1
Total	8	9	6	10	11	44

Se evaluaron los géneros identificados (*Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia* sp., *Stenotrophomonas* sp., y del grupo *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp), de 24 aislamientos, de la zona de Coatepec (5), Malinche (4), Acajete (6), Tetela de Ocampo (4), y Hueyapan (5) contra *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capcidi*, los resultados observados a los 8 días de crecimiento micelial fueron los siguientes:

8.2 Actividad antifúngica de metabolitos secundarios contra *Fusarium oxysporum*

Las pruebas donde se confrontaron metabolitos secundarios extraídos de suelo de Coatepec correspondientes a los géneros *Pseudomonas* sp., *Stenotrophomonas* sp., y del grupo *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Serratia* sp., no mostraron actividad inhibitoria frente al crecimiento micelial ($P > 0.05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del crecimiento de *Fusarium oxysporum* al ser confrontado con los metabolitos extraídos de aislamientos bacterianos de suelo de Coatepec.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio C4	<i>Pseudomonas</i> sp1.	22	34	40	0	a	±0.00
Promedio C5	<i>Pseudomonas</i> sp2.	21	31	40	0	a	±0.00
Promedio C1	<i>Klebsiella</i> sp1., <i>Enterobacter</i> sp1., <i>Citrobacter</i> sp1., <i>Serratia</i> sp1.	20	32	40	0	a	±0.00
Promedio C13	<i>Klebsiella</i> sp2., <i>Enterobacter</i> sp2., <i>Citrobacter</i> sp2., <i>Serratia</i> sp2.	20	30	40	0	a	±0.00
Promedio C16	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	20	33	38	5	a	±4.17
Promedio Control	-	20	32	40	0	a	±0.00

* Letras iguales no presentan diferencia entre ellas.

Ninguno de los metabolitos extraídos de las bacterias del suelo de la Malinche ejerció inhibición contra *F. oxysporum* ($P > 0.05$) (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la confrontación de metabolitos secundarios contra *Fusarium oxysporum*.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio M1	<i>Enterococcus</i> sp1.	20	32	40	0	a	±0.00
Promedio M2	<i>Enterococcus</i> sp2.	20	32	40	0	a	±0.00
Promedio M5	<i>Pseudomonas</i> sp1.	19	33	40	0	a	±0.00
Promedio M6	<i>Pseudomonas</i> sp2.	21	30	40	0	a	±0.00
Promedio Control	-	20	32	40	0	a	±0.00

* Letras iguales no presentan diferencia entre ellas.

En la zona de Acajete ninguno de los metabolitos de los géneros identificados presentó inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* ($P > 0.05$) (Tabla 6).

Tabla 6. Actividad de crecimiento de *F. oxysporum* al confrontarse con metabolitos bacterianos extraídos de suelo de Acajete.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio A4	<i>Pseudomonas</i> sp1.	20	32	40	0	a	±0.00
Promedio A9	<i>Pseudomonas</i> sp2.	19	31	40	0	a	±0.00
Promedio A6	<i>Klebsiella</i> sp1., <i>Enterobacter</i> sp1., <i>Citrobacter</i> sp1., <i>Serratia</i> sp1.	20	32	40	0	a	±0.00
Promedio A10	<i>Klebsiella</i> sp2., <i>Enterobacter</i> sp2., <i>Citrobacter</i> sp2., <i>Serratia</i> sp2.	20	32	40	0	a	±0.00
Promedio A11	<i>Escherichia</i> sp1.	20	33	40	0	a	±0.00
Promedio A1	<i>Escherichia</i> sp2.	18	28	35	12.5	a	±7.94

Promedio Control	-	20	32	40	0	A	±0.00
-------------------------	---	----	----	----	---	---	-------

* Letras iguales no presentan diferencia entre ellas.

En la muestra suelo de Tetela de Ocampo los metabolitos extraídos de *Pseudomonas* sp2 mostraron diferencia significativa en comparación con el control ($P < 0.05$) (Tabla 7).

Tabla 7. Datos del crecimiento de *Fusarium oxysporum* en presencia de metabolitos bacterianos del suelo de Tetela de Ocampo.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio RT1	<i>Enterococcus</i> sp1.	20	32	40	0	b	±0.00
Promedio RT7	<i>Enterococcus</i> sp2.	19	31	40	0	b	±0.00
Promedio RT2	<i>Pseudomonas</i> sp1.	22	30	37	8.3	b	±5.07
Promedio RT6	<i>Pseudomonas</i> sp2.	20	24	24	39	a	±4.41
Promedio Control	-	20	32	40	0	b	±0.00

* Letras iguales no presentan diferencia entre ellas.

Para la zona de San Bartolomé Hueyapan, los metabolitos secundarios de los aislamientos de *Pseudomonas* sp1., y de *Enterococcus* sp1., destacaron por su actividad inhibitoria del crecimiento de *Fusarium oxysporum* con ($P < 0.05$) (Tabla 8).

Tabla 8. Metabolitos de *Pseudomonas* sp1., y de *Enterococcus* sp1., retardan el crecimiento de *Fusarium oxysporum*.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio H1	<i>Pseudomonas</i> sp1.	20	29	31	22.5	a	±6.50
Promedio H10	<i>Pseudomonas</i> sp2.	21	34	38	5	bc	±5.83
Promedio H3	<i>Enterococcus</i> sp1.	21	30	32	20	ab	±2.89
Promedio H9	<i>Enterococcus</i> sp2.	20	32	40	0	c	±0.00
Promedio H8	<i>Escherichia</i> sp.	20	33	40	0	c	±0.00
Promedio Control	-	20	32	40	0	c	±0.00

* Letras iguales no presentan diferencia entre ellas.

De acuerdo con Bernal *et al.*(2002) un tiempo prolongado de la colonias antagonistas productoras de sustancias difusibles en agar posibilita una elevada persistencia y efectividad de estos compuestos antifúngicos producidos; por lo que a su vez, provoca una mayor inhibición, además estos pueden inducir la muerte del hongo o reducir su tasa de crecimiento.

8.3 Actividad antifúngica de metabolitos secundarios contra *Phytophthora capicidi*

En Coatepec los metabolitos extraídos de *Pseudomonas* sp1., y del grupo *Klebsiella* sp1., *Enterobacter* sp1., *Citrobacter* sp1., *Serratia* sp1., mostraron reducción en el crecimiento de *Phytophthora capicidi* (P<0.05) (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados del crecimiento de *Phytophthora capicidi* en presencia de metabolitos secundarios extraídos de los aislamientos bacterianos muestreados en suelo de Coatepec.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio C4	<i>Pseudomonas</i> sp1.	18	26	31	22.5	a	±1.59
Promedio C5	<i>Pseudomonas</i> sp2.	19	27	35	12.5	b	±0.01
Promedio C1	<i>Klebsiella</i> sp1., <i>Enterobacter</i> sp1., <i>Citrobacter</i> sp1., <i>Serratia</i> sp1.	15	22	31	24.1	a	±22.05
Promedio C13	<i>Klebsiella</i> sp2., <i>Enterobacter</i> sp2., <i>Citrobacter</i> sp2., <i>Serratia</i> sp2.	20	28	35	12.5	b	±0.01
Promedio C16	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	21	30	35	12.5	b	±0.01
Promedio Control	-	21	29	40	0	c	±0.00

* Letras iguales no presentan diferencia entre ellas.

En la zona Malinche los metabolitos extraídos de *Enterococcus* sp2., y *Pseudomonas* sp1., mostraron diferencia significativa ($P < 0.05$) en confrontación con *Phytophthora capicidi* (Tabla 10).

Tabla 10. Crecimiento de *Phytophthora capicidi* en presencia de metabolitos secundarios extraídos de los aislamientos bacterianos muestreados en suelo de Malinche.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	grupos homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio M1	<i>Enterococcus</i> sp1.	18	27	32	20	a	±1.44
Promedio M2	<i>Enterococcus</i> sp2.	21	31	40	0	b	±0.00
Promedio M5	<i>Pseudomonas</i> sp1.	23	31	40	0	b	±0.00
Promedio M6	<i>Pseudomonas</i> sp2.	19	27	33	17.5	a	±3.33

Promedio Control	-	21	29	40	0	b	±0.00
-------------------------	---	----	----	----	---	---	-------

* Letras iguales no presentan diferencia entre ellas.

En la localidad de Acajete los metabolitos extraídos de *Escherichia* sp2., presentó reducción de crecimiento de manera significativa en comparación al control ($P < 0.05$) (Tabla 11).

Tabla 11. Datos del crecimiento de *Phytophthora capsidi* en presencia de metabolitos secundarios extraídos de los aislamientos bacterianos muestreados en suelo de Acajete.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio A4	<i>Pseudomonas</i> sp1.	18	27	32	20	ab	±0.00
Promedio A9	<i>Pseudomonas</i> sp2.	19	27	32	20	ab	±0.00
Promedio A6	<i>Klebsiella</i> sp1., <i>Enterobacter</i> sp1., <i>Citrobacter</i> sp1., <i>Serratia</i> sp1.	18	27	33	17.5	ab	±0.00
Promedio A10	<i>Klebsiella</i> sp2., <i>Enterobacter</i> sp2., <i>Citrobacter</i> sp2., <i>Serratia</i> sp2.	21	28	38	5	b	±3.00
Promedio A1	<i>Escherichia</i> sp1.	19	27	32	20	ab	±0.00
Promedio A11	<i>Escherichia</i> sp2.	16	23	31	22.5	a	±0.00
Promedio Control	-	21	29	40	0	c	±0.00

* Letras iguales no presentan diferencia entre ellas.

Los metabolitos secundarios extraídos de todos los géneros identificados en el suelo de Tetela de Ocampo retardaron el crecimiento de *Phytophthora capsidi*, mostrando diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.05$) (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados del crecimiento de *Phytophthora capcidi* en presencia de metabolitos secundarios extraídos de los aislamientos bacterianos muestreados en suelo de Tetela de Ocampo.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio RT1	<i>Enterococcus</i> sp1.	19	27	34	15	bc	±0.83
Promedio RT7	<i>Enterococcus</i> sp2.	20	28	35	12.5	c	±0.28
Promedio RT2	<i>Pseudomonas</i> sp1.	17	26	31	22.5	b	±0.83
Promedio RT6	<i>Pseudomonas</i> sp2.	13	19	26	35	a	±2.20
Promedio Control	-	21	29	40	0	d	±0.00

* Letras iguales no presentan diferencia entre ellas.

Los metabolitos secundarios extraídos de *Pseudomonas* sp2., identificados en el suelo de San Bartolomé Hueyapan retardaron el crecimiento de *Phytophthora capcidi*, mostrando diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.05$) (Tabla 13).

Tabla 13. Resultados del crecimiento de *Phytophthora capcidi* en presencia de metabolitos secundarios extraídos de los aislamientos bacterianos muestreados en suelo de San Bartolomé Hueyapan.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio H1	<i>Pseudomonas</i> sp1.	17	25	32	20	ab	±1.44
Promedio H10	<i>Pseudomonas</i> sp2.	18	26	29	27.5	a	±2.20
Promedio H3	<i>Enterococcus</i> sp1.	18	27	35	12.5	b	±0.21
Promedio H9	<i>Enterococcus</i> sp2.	19	27	33	17.5	b	±4.25
Promedio H8	<i>Escherichia</i> sp.	20	28	33	17.5	b	±3.42
Promedio Control	-	21	29	40	0	c	±0.00

* Letras iguales no presentan diferencia entre ellas.

Se han evidenciado claramente en el control de especies de *Fusarium* sp., y *Phytophthora* sp. (Van Loon *et al.*, 1998), por medio de metabolitos secundarios denominados sideróforos que estos mismos han sido reportados en el género *Pseudomonas* sp., y *Enterococcus* sp.

8.4 Actividad antifúngica de aislamientos bacterianos contra *Fusarium oxysporum*

El cultivo de *Pseudomonas* sp1., mostró diferencia significativa frente al crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* (P<0.05) (Tabla 14).

Tabla 14. Resultados del crecimiento de *Fusarium oxysporum* al ser confrontado con los aislamientos bacterianos extraídos de suelo de Coatepec.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio C3	<i>Pseudomonas</i> sp1.	11	21	27	32.5	a	±9.17
Promedio C6	<i>Pseudomonas</i> sp2.	16	27	31	22.5	ab	±4.64
Promedio C1	<i>Klebsiella</i> sp1., <i>Enterobacter</i> sp1., <i>Citrobacter</i> sp1., <i>Serratia</i> sp1.	19	29	37	7.5	b	±3.82
Promedio C13	<i>Klebsiella</i> sp2., <i>Enterobacter</i> sp2., <i>Citrobacter</i> sp2., <i>Serratia</i> sp2.	14	19	30	25	ab	±0.29
Promedio C16	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	15	23	31	22.5	ab	±5.77
Promedio control	-	19	32	40	0	c	±0.00

* Letras iguales no presentan diferencia entre ellas.

El género *Pseudomonas* aislado de suelo de la Malinche formaron halos de inhibición alrededor de los cultivos, mostrando diferencia significativa con respecto al control (P<0.05) (Tabla 15).

Tabla 15. Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* en presencia de aislamientos bacterianos extraídos de suelo de la Malinche.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio M1	<i>Enterococcus</i> sp1.	14	24	30	25	C	±0.29
Promedio M2	<i>Enterococcus</i> sp2.	12	18	26	35	Bc	±3.61
Promedio M5	<i>Pseudomonas</i> sp1.	14	21	23	42.5	Ab	±2.59
Promedio M6	<i>Pseudomonas</i> sp2.	11	17	17	57.5	A	±4.33
Promedio control	-	19	32	40	0	D	±0.00

* Letras iguales no presentan diferencia entre ellas.

En la zona de Acajete el aislamiento de *Escherichia* sp2., presentó inhibición del crecimiento del hongo en un 50% con una $P < 0.05$ (Figura 2) (Tabla 16).

Tabla 16. Resultados del crecimiento del diámetro micelial de *Fusarium oxysporum* al confrontarse con aislamientos bacterianos extraídos de suelo de Acajete.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio A4	<i>Pseudomonas</i> sp1.	19	28	37	7.5	b	±0.29
Promedio A9	<i>Pseudomonas</i> sp2.	19	29	37	7.5	b	±1.44
Promedio A6	<i>Klebsiella</i> sp1., <i>Enterobacter</i> sp1., <i>Citrobacter</i> sp1., <i>Serratia</i> sp1.	20	30	37	7.5	b	±2.50
Promedio A10	<i>Klebsiella</i> sp2., <i>Enterobacter</i> sp2., <i>Citrobacter</i> sp2., <i>Serratia</i> sp2.	15	24	27	32.5	ab	±5.77
Promedio A11	<i>Escherichia</i> sp1.	15	25	31	22.5	b	±11.21
Promedio A1	<i>Escherichia</i> sp2.	14	19	20	50	a	±5.83
Promedio control	-	19	32	40	0	C	±0.00

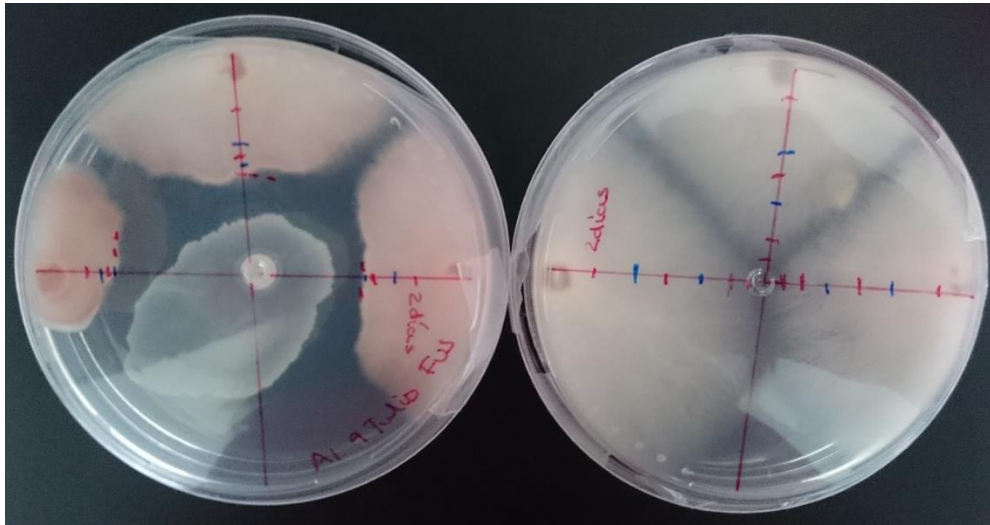


Figura 2. Halos de inhibición en *Fusarium oxysporum* en presencia de cultivo de *Escherichia* sp.

En suelo extraído de Tetela de Ocampo las bacterias del género *Pseudomonas* mostraron diferencia significativa en el crecimiento ($P < 0.05$) (Tabla 17).

Tabla 17. Datos de *Fusarium oxysporum* en presencia de aislamientos bacterianos extraídos de suelo de Tetela de Ocampo.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio RT1	<i>Enterococcus</i> sp1.	20	31	38	5	b	±2.05
Promedio RT7	<i>Enterococcus</i> sp2.	19	30	40	0	b	±0.00
Promedio RT2	<i>Pseudomonas</i> sp1.	13	27	32	20	a	±6.51
Promedio RT6	<i>Pseudomonas</i> sp2.	14	24	25	37.5	a	±0.26
Promedio control	-	19	32	40	0	b	±0.00

Para la zona de San Bartolomé Hueyapan, el aislamiento *Pseudomonas* sp1., y *Enterococcus* sp2., destacaron por su actividad inhibitoria del crecimiento, presentando diferencia significativa ($P < 0.05$) (Tabla 18).

Tabla 18. Resultados del crecimiento de *Fusarium oxysporum* en presencia de aislamientos bacterianos extraídos de suelos de San Bartolomé Hueyapan.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio H1	<i>Pseudomonas</i> sp1.	16	20	20	50	a	±0.12
Promedio H10	<i>Pseudomonas</i> sp2.	19	27	31	22.5	b	±1.44
Promedio H3	<i>Enterococcus</i> sp1.	19	31	40	0	c	±0.00
Promedio H9	<i>Enterococcus</i> sp2.	15	17	18	55	a	±3.82
Promedio H8	<i>Escherichia</i> sp.	20	29	33	17.5	b	±0.00
Promedio control	-	19	32	40	0	c	±0.00

Se ha reportado que *Pseudomonas fluorescens*, cuenta con mecanismos de biocontrol adicionales, como la producción de HCN, compuestos indólicos, sideróforos, proteasa extracelular y la presencia de la producción de antibiótico. Siendo así el HCN un antibiótico volátil y particularmente aquellos que producen 2,4-DAPG han sido reconocidos como factores significativos de control de diferentes patógenos de hongos (Haas y Keel, 2003).

8.5 Actividad antifúngica de aislamientos bacterianos contra *Phytophthora capcidi*

Las pruebas donde se confrontaron cultivos de los géneros extraídos del suelo de Coatepec contra *Phytophthora capcidi* no mostraron inhibición significativa ($P > 0.05$) (Tabla 19).

En pruebas de aislamientos extraídos de la Malinche en confrontación con el hongo la bacteria *Pseudomonas* sp1., mostró inhibición con diferencia significativa ($P < 0.05$) (Tabla 20).

Tabla 19. Datos del crecimiento de *Phytophthora capsidi* al ser confrontado con los aislamientos bacterianos extraídos de suelo de Coatepec.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio C3	<i>Pseudomonas</i> sp1.	17	28	40	0	a	±0.00
Promedio C18	<i>Pseudomonas</i> sp2.	20	32	39	2.5	a	±2.50
Promedio C1	<i>Klebsiella</i> sp1., <i>Enterobacter</i> sp1., <i>Citrobacter</i> sp1., <i>Serratia</i> sp1.	21	30	40	0	a	±0.00
Promedio C13	<i>Klebsiella</i> sp2., <i>Enterobacter</i> sp2., <i>Citrobacter</i> sp2., <i>Serratia</i> sp2.	19	31	40	0	a	±0.00
Promedio C16	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	21	32	40	0	a	±0.00
Promedio Control	-	22	34	40	0	a	±0.00

Tabla 20. Comportamiento de *Phytophthora capsidi* en presencia de aislamientos bacterianos extraídos de suelo de la Malinche.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio M1	<i>Enterococcus</i> sp1.	21	32	40	0	b	±0.00
Promedio M2	<i>Enterococcus</i> sp2.	22	35	40	0	b	±0.00
Promedio M5	<i>Pseudomonas</i> sp1.	19	26	32	20	a	±1.67
Promedio M6	<i>Pseudomonas</i> sp2.	20	33	40	0	b	±0.00
Promedio Control	-	22	34	40	0	b	±0.00

En la zona de Acajete *Klebsiella* sp2., *Enterobacter* sp2., *Citrobacter* sp2., *Serratia* sp2., mostraron inhibición del crecimiento micelial en un 22.5 % con diferencia significativa en comparación con los otros tratamientos (Tabla 21).

Tabla 21. Datos de crecimiento de *Phytophthora capcidi* al confrontarse con aislamientos bacterianos extraídos de suelo de Acajete.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio A4	<i>Pseudomonas</i> sp1.	24	32	40	0	b	±0.00
Promedio A9	<i>Pseudomonas</i> sp2.	15	25	40	0	b	±0.00
Promedio A6	<i>Klebsiella</i> sp1., <i>Enterobacter</i> sp1., <i>Citrobacter</i> sp1., <i>Serratia</i> sp1.	22	32	40	0	b	±0.00
Promedio A10	<i>Klebsiella</i> sp2., <i>Enterobacter</i> sp2., <i>Citrobacter</i> sp2., <i>Serratia</i> sp2.	17	26	31	22.5	a	±3.00
Promedio A11	<i>Escherichia</i> sp.	21	33	40	0	b	±0.00
Promedio Control	-	22	34	40	0	b	±0.00

Ninguno de los aislamientos extraídos del suelo de Tetela de Ocampo confrontados contra *Phytophthora capcidi* mostró inhibición ($P>0.05$) (Tabla 22).

Para la zona de San Bartolomé Hueyapan, el aislamiento del género *Pseudomonas* sp2., mostró inhibición del crecimiento de *Phytophthora capcidi* con una $P=0.0327$ (Tabla 23).

Tabla 22. Crecimiento de *Phytophthora capsidi* en presencia de aislamientos bacterianos extraídos de suelo de Tetela de Ocampo.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio RT1	<i>Enterococcus</i> sp1.	21	34	40	0	a	±0.00
Promedio RT7	<i>Enterococcus</i> sp2.	22	34	40	0	a	±0.00
Promedio RT2	<i>Pseudomonas</i> sp1.	16	30	36	10	a	±0.00
Promedio RT6	<i>Pseudomonas</i> sp2.	20	31	40	0	a	±0.00
Promedio Control	-	22	34	40	0	a	±0.00

Tabla 23. Resultados del crecimiento de *Phytophthora capsidi* en presencia de aislamientos bacterianos extraídos de suelos de San Bartolomé Hueyapan.

	Diámetro de crecimiento durante los días	3 días (mm)	5 días (mm)	7 días (mm)	Reducción de crecimiento (%)	Grupos Homogéneos	Error Estándar
	Cepa del género						
Promedio H1	<i>Pseudomonas</i> sp1.	20	28	30	25	b	±3.42
Promedio H10	<i>Pseudomonas</i> sp2.	20	24	24	40	a	±1.44
Promedio H3	<i>Enterococcus</i> sp1.	19	26	30	25	b	±2.20
Promedio H9	<i>Enterococcus</i> sp2.	19	27	29	27.5	b	±0.12
Promedio H8	<i>Escherichia</i> sp.	22	34	40	0	c	±0.00
Promedio Control	-	22	34	40	0	c	±0.00

La inhibición hifal fue el efecto primario de compuestos antifúngicos por cultivos bacterianos y metabolitos secundarios, sin embargo esta sólo pudo ser observada desde la apariencia, mientras que las reacciones bioquímicas implicadas aún no están del todo analizadas.

8.6 Determinación de perfiles proteicos

La figura 3 muestra el perfil proteico de SDS-PAGE de las bacterias aisladas e identificadas de suelos de la Malinche el género *Pseudomonas* sp., en los carriles 6 a 9 muestran bandas con más definidas

y con un rango de 15 a 260 kDa, mientras que el género *Enterococcus* sp., presentó proteínas con un rango de 40 a 50 kDa (Figura 3) (Tabla 24).

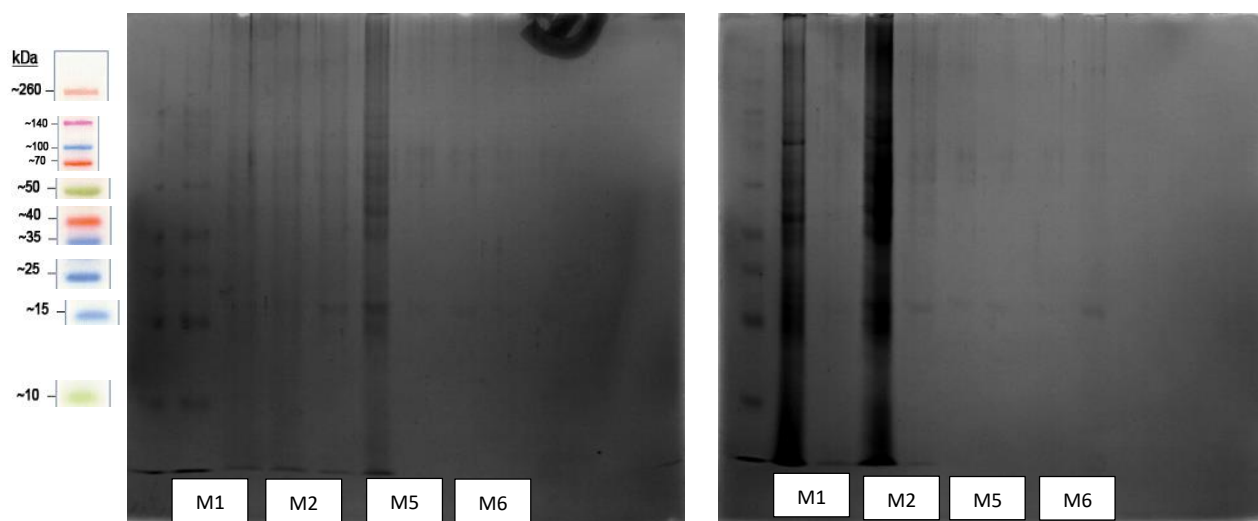


Figura 3. Perfiles proteicos de metabolitos extraídos de aislamientos de la zona de la Malinche M1, M2 (*Enterococcus* sp.) y M5, M6 (*Pseudomonas* sp.).

Tabla 24. Resultados de los perfiles proteicos de los aislamientos extraídos de suelo de la Malinche.

Lectura	Carril 3	Carril 4	Carril 5	Carril 6	Carril 7	Carril 8	Carril 9
Bacteria	M1 <i>Enterococcus</i> sp.	M2 <i>Enterococcus</i> sp.	M2 <i>Enterococcus</i> sp.	M5 <i>Pseudomonas</i> sp.	M5 <i>Pseudomonas</i> sp.	M6 <i>Pseudomonas</i> sp.	M6 <i>Pseudomonas</i> sp.
260 kDa						+	+
140 kDa	+	+		+			
100 kDa	+	+		+			
70 kDa	+	+	+	+	+	+	+
50 kDa	+	+	+	+	+	+	+
40 kDa	+	+	+	+			
35 kDa	+	+	+	+			
25 kDa							
15 kDa	+	+	+	+	+	+	+
10 kDa							

La comparación de diversos metabolitos secundarios extraídos de bacterias de suelo de Acajete mostraron que para el género *Pseudomonas* sp., se lograron evidenciar productos proteicos con pesos entre 140 y 260 kDa. En el total del análisis electroforético se encontró que prevalecen las proteínas con un rango de 50 y 70 kDa (Figura 4) (Tabla 25).

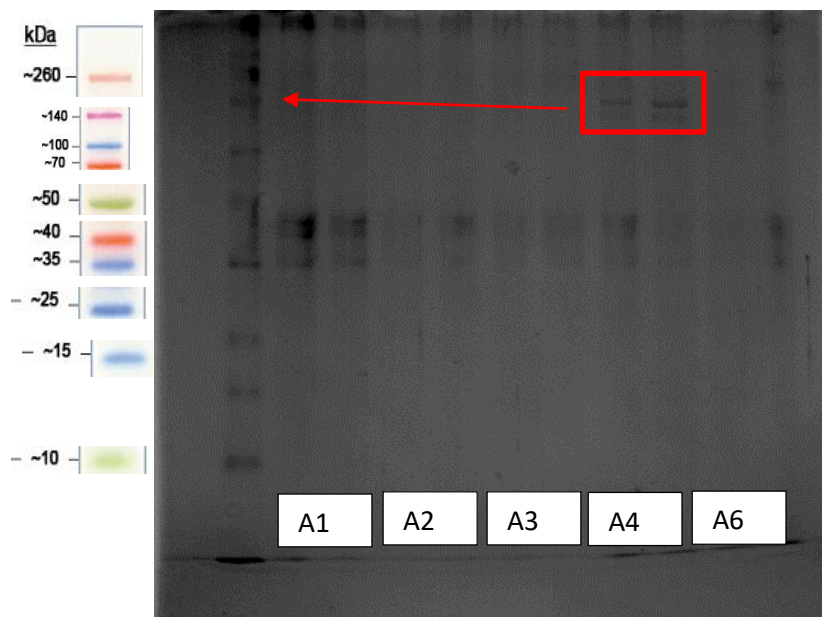


Figura 4. Extractos proteicos de *Pseudomonas* sp. (A4) con pesos moleculares de 140 y 260 kDa.

Tabla 25. Resultados de los perfiles proteicos de los aislamientos extraídos de suelo de Acajete.

Lectura	Carril 2	Carril 3	Carril 4	Carril 5	Carril 6	Carril 7	Carril 8	Carril 9	Carril 10	Carril 11
Bacteria	A1 <i>Escherichia</i> sp.	A1 <i>Escherichia</i> sp.	A2 <i>Klebsiella</i> sp.	A2 <i>Klebsiella</i> sp.	A3 <i>Klebsiella</i> sp.	A3 <i>Klebsiella</i> sp.	A4 <i>Pseudomonas</i> sp.	A4 <i>Pseudomonas</i> sp.	A6 <i>Klebsiella</i> sp.	A6 <i>Klebsiella</i> sp.
260 kDa							+	+		
140 kDa							+	+		
100 kDa										
70 kDa										
50 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40 kDa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
35 kDa	+	+								
25 kDa										
15 kDa										
10 kDa										

Los resultados en perfiles proteicos de diversos metabolitos secundarios extraídos de bacterias de suelo de San Bartolomé Hueyapan mostraron que el género *Pseudomonas* sp., expresa proteínas con pesos moleculares entre 25 y 40 kDa. (Figura 5) (Tabla 26).

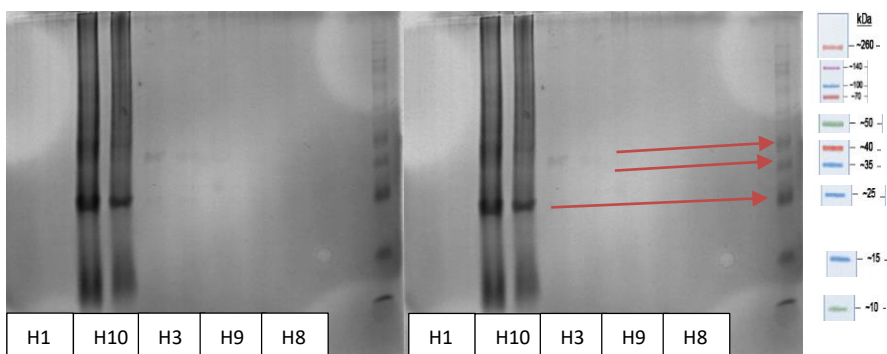


Figura 5. Perfiles proteicos de *Pseudomonas* sp. (H3 y H9), destacando proteínas con pesos moleculares entre 25 y 40 kDa.

Tabla 26. Resultados de los perfiles proteicos de los aislamientos extraídos de suelo de San Bartolomé Hueyapan.

Lectura	Carril 1	Carril 2	Carril 3	Carril 4	Carril 5	Carril 6	Carril 7	Carril 8	Carril 9	Carril 10
Bacteria	H1 <i>Pseudomonas</i> sp.	H1 <i>Pseudomonas</i> sp.	H10 <i>Pseudomonas</i> sp.	H10 <i>Pseudomonas</i> sp.	H3 <i>Enterococcus</i> sp.	H3 <i>Enterococcus</i> sp.	H9 <i>Enterococcus</i> sp.	H9 <i>Enterococcus</i> sp.	H8 <i>Escherichia</i> sp.	H8 <i>Escherichia</i> sp.
260 kDa										
140 kDa										
100 kDa										
70 kDa										
50 kDa										
40 kDa			+	+						
35 kDa					+	+				
25 kDa			+	+						
15 kDa										
10 kDa										

El sistema de electroforesis SDS-PAGE es específico para proteínas de bajo peso molecular ha sido empleado en diferentes estudios, como es el caso de la evaluación de un péptido antifúngico de 5.9 kDa aproximadamente aislado de las semillas de la col en China (Koay *et al.*, 2011).

Utilizando esta técnica las proteínas del género *Pseudomonas* sp., mostraron una gran diferencia de pesos moleculares entre 25 kDa a 70 kDa. Las bandas proteicas con mayor frecuencia se encuentran en pesos moleculares de 40 a 70 kDa, lo cual demuestra que las cepas analizadas producen y liberan diferentes factores proteicos, sugiriéndose que esta variabilidad puede depender de los factores abióticos y bióticos de las zonas en las que se extrajo la muestra de suelo.

El género *Pseudomonas* sp., es el que presenta una mayor actividad inhibitoria del crecimiento de ambos hongos, destacando que los extractos pudieran ser proteasas, ya que para esta bacteria se han reportado varias proteasas con pesos moleculares dentro del rango de 54 a 58 kDa (Costa *et al.*, 2002; Marquart *et al.*, 2005).

Diversos trabajos han inferido que la actividad antifúngica de *Pseudomonas aeruginosa* M-1001 está relacionada a la presencia de la actividad de las proteasas. Pero es diferente a otras cepas antifúngicas como *P. aeruginosa* K-187 donde su compuesto antifúngico es una glicoproteína (Wang *et al.*, 1999). En otros experimentos se ha reportado la producción de una proteína ligada a la enzima quitinasa con peso molecular de 55 kDa, la cual puede estar ligada a la degradación de quitina presente en el exoesqueleto de los insectos (Folders *et al.*, 2001), así como el compuesto antifúngico llamado fenazina producido por *P. fluorescens* (Thomashow *et al.*, 1988).

8.7 Cuantificación de biopelículas y fase planctónica

En la producción de material sobrenadante con mayor densidad óptica (DO) se registró con concentraciones de L-glutámico de 30 a 40 Mm, sin alguna actividad en los géneros aislados (Figura 6).

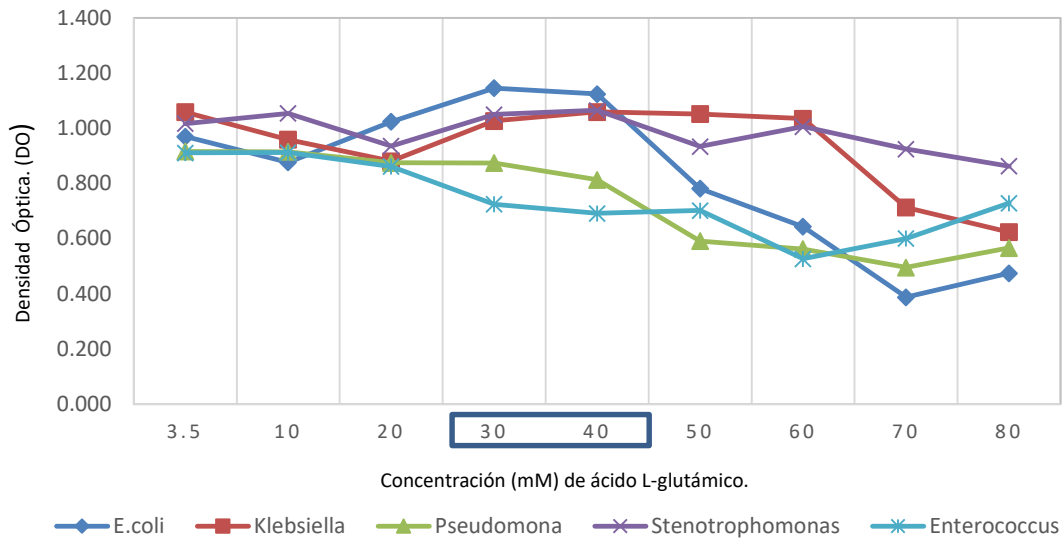


Figura 6. En presencia de ácido L-glutámico [30 a 40 mM] se ve favorecida la formación de la fase planctónica.

Concentraciones de ácido L-glutámico entre 3.5 y 30 mM favorecieron la formación de biopelícula en todos los aislamientos. Destacando *Enterococcus* sp., y *Pseudomonas* sp., con lecturas de DO mayores a 0.4 (Figura 7 y 8).

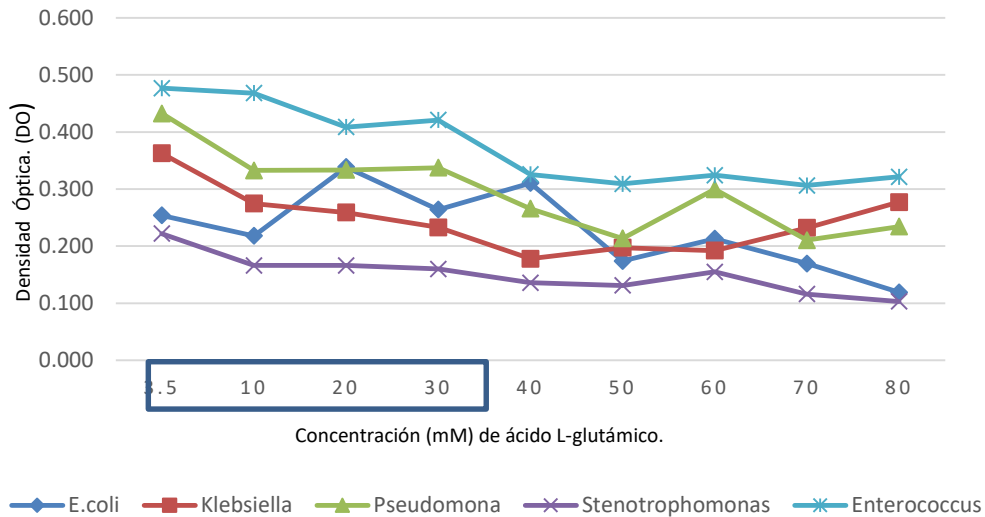


Figura 7. Los géneros *Enterococcus* sp., y *Pseudomonas* sp., en presencia de ácido L-glutámico [3.5 a 30 mM] formaron biopelículas consistentes con respecto al resto de los aislamientos.

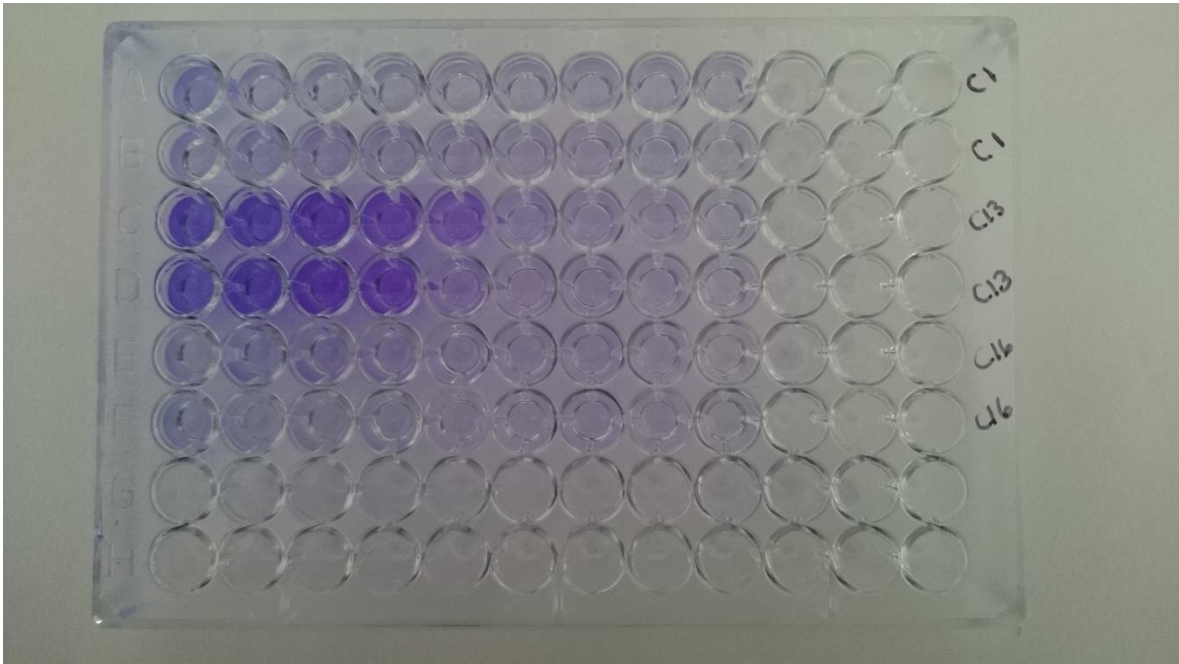


Figura 8. Revelado de biopelícula por método de tinción cristal violeta (C1: *Klebsiella* sp., C13: *Klebsiella* sp., C16: *Pseudomonas* sp.) muestras aisladas en la zona de Coatepec.

Los resultados presentados muestran claramente que las condiciones ambientales y la situación nutricional del medio influyen en la formación de biopelícula (requiriendo bajas concentraciones de ácido L-glutámico).

Las publicaciones científicas acerca de la producción de biopelículas son bastas, reportándose diferencias significativas en perfiles de proteínas sintetizadas por biopelículas contra aquellas en etapa planctónica (Costerton *et al.*, 1995).

En estudios recientes se ha caracterizado a *Pseudomonas* sp., como un patógeno productor de biopelícula moderado y consistente (Ochoa *et al.*, 2013), aunque se debe tener en cuenta que esta formación se ve condicionada por el medio donde se desarrolla, permitiendo que organismos que carecen de la capacidad formadora de biopelícula, reviertan su metabolismo y se conviertan en formadores moderados y/o consistentes (Nucleo *et al.*, 2010). Siendo necesario señalar la existencia de discrepancias entre la utilización de un entorno *in vitro* y el entorno *in vivo* debido a las condiciones de experimentación.

El conocimiento de la capacidad de producción de una biopelícula puede dirigirse o enfocar los tratamientos de elección en el control de insectos plagas, aprovechando su capacidad de adherencia a

las membranas de estos. En *Bacillus subtilis* ATCC6633, la presencia de biosurfactantes estaría involucrada en la formación de una biopelícula consistente, junto con la liberación de moléculas proteicas antifúngicas posicionan a esta bacteria en una situación ventajosa en relación a la competencia que existe en la microbiota del suelo (Sarti *et al.*, 2013). Se reporta que *Bacillus* a una lectura de 570 nm y una concentración de 20 y 50 mM ácido L-glutámico su D.O. es de aproximadamente 0.3, por lo que en comparativa *Pseudomonas* sp., en menores concentraciones de ácido L-glutámico genera mayor D.O. corroborando así un mayor potencial en la formación de estas biopelículas.

8.8 Actividad ADNasa

Los ensayos de actividad ADNasa muestran que el género *Enterococcus* sp., presentó un 76% de positividad. El grupo *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., y *Serratia* sp., presentó un 75% de actividad a ADNasa, el resto de los géneros no presentaron actividad de ADNasas (Figura 9).



Figura 9. Actividad ADNasa positiva, presencia de halo alrededor de cultivo *Enterococcus* sp.

La función de la actividad nucleasa no se conoce con precisión pero se sabe que son importantes para la nutrición bacteriana (Soler *et al.*, 2002), estas enzimas son importantes para el establecimiento (invasión de las células huéspedes) y desarrollo de la colonización y posterior lesión tisular (Chacón *et al.*, 2003).

Por su parte se ha aislado a *Enterococcus faecalis* y probado su factor de virulencia de gelatinasa extracelular destruyendo el sistema de defensa en la hemolinfa en insectos (Park *et al.*, 2007), en las cepas de este estudio el género *Enterococcus* sp., evidenció la producción de la enzima extracelular ADNasa en un 79%, planteándose el posible uso de esta enzima en adición a lo previamente estudiado como una bacteria con potencial insecticida.

Existe una gran diversidad de estudios en el tema de ADNasa en cuestión de salud pública sin embargo para el campo de la agricultura no se han reportado datos que utilicen estas aplicaciones como una herramienta para el control biológico de patógenos en agroecosistemas.

Durante los últimos diez años la comunidad científica ha reconocido que la calidad de dos grandes recursos naturales como son el aire y el agua está siendo degradada por la actividad humana. De tal forma el establecimiento en las normas de índice que miden la calidad de éstos y de umbrales, han contribuido a minimizar el impacto de las actividades humanas sobre estos recursos. Sin embargo, la aceptación de la degradación del suelo por diferentes usos y prácticas de manejo es reciente, posiblemente por la elevada capacidad de amortiguación del suelo. Por lo anterior, es evidente que los estudios que involucran las propiedades y umbrales de capacidad de los suelos es un buen escenario para mitigar la problemática que enfrenta la conservación de este recurso, siendo de relevancia el presente estudio debido a la aplicación que se le puede dar con la práctica del control de plagas por medio del uso de productos naturales, como es el caso de los metabolitos secundarios de microorganismos, evitando así el uso indiscriminado de agroquímicos.

9. CONCLUSIONES

De un total de 44 aislamientos bacterianos se lograron identificar a *Enterococcus* sp., *Pseudomonas* sp., *Escherichia* sp., *Stenotrophomonas* sp., y del grupo *Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., y *Serratia* sp.

Los metabolitos secundarios extraídos por medio de la resina Amberlite® XAD16, de las bacterias *Enterococcus* sp., y *Pseudomonas* sp., mostraron potencial antifúngico en un promedio del 24%.

Los cultivos bacterianos del género *Pseudomonas* sp., confrontado contra *Fusarium oxysporum* fue el que mostró mayor inhibición respecto a los demás géneros con un 40% de inhibición, seguido del género *Enterococcus* sp., con un 35% de inhibición.

Phytophthora capsici mostró una mayor resistencia frente a cultivos bacterianos, sin embargo dos cepas de *Pseudomonas* sp., presentaron potencial antifúngico en un 30% en promedio.

La técnica de electroforesis muestra proteínas con pesos en un rango de 15 a 260 kDa siendo los pesos moleculares entre 50 a 70 kDa los de mayor frecuencia.

Todos los géneros bacterianos fueron capaces de formar biopelículas siendo los géneros *Enterococcus* sp., y *Pseudomonas* sp., los que mostraron mayor densidad óptica.

El género *Enterococcus* sp., mostró actividad ADNasa en un 79%.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Akgül DS, Mirik M. 2008. Biocontrol of *Phytophthora capsici* on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. *Journal of Plant Pathology*. 90 (1): 29-34.
- Arauz LFC. 1998. Fitopatología: Un enfoque agroecológico, Ed. Universidad de Costa Rica. pp. 23-24.
- Audesirk BA. 2014. Biología la vida en la tierra. Ed. Pearson Education. 8va. Edición. México D.F. pp. 45-61.
- Agrios GN. 2005. Plant pathology (5th edition). Elsevier Academic Press. pp. 922.
- Badii MH, Tejada LO, Flores AE, Lopez CE y Quiróz H. 2000. Historia, fundamentos e importancia del control biológico. pp.3-17.
- Badii MH, Flores AE y Galán LJ. 2000. Fundamentos y Perspectivas de Control Biológico. UANL, Monterrey.
- Badii, MH, Abreu JL. 2006. Control biológico una forma sustentable de control de plagas. *International Journal of Good Conscience*. 1(1): 82-89.
- Bateman DF. 1978. The dynamic nature of disease. En: Horsfall JG y Cowling EB (Eds.) *Plant Pathology, an Advanced Treatise*. New York. 3:53-85.
- Bautista CJ, García ER, Pérez MJ, Zavaleta ME, Montes BR y Ferrera CR. 2008. Inducción de supresividad a Fitopatógenos del suelo. Un enfoque holístico al control biológico. *Scielo*. 33 (2): 96-102.
- Baur S, Niehaus J, Karagouni AD, Katsifas EA, Chalkou K, Meintanis C, Jones AL, Goodfellow M, Ward AC, Beil W, Schneider K, Süßmuth RD, Fiedler HP. 2006. Fluostatins CE novel members of the fluostatin family produced by *Streptomyces* strain. *Journal of Antibiotics*, 59:293-297.
- Berger F, Li H, White D, Frazer R, Leifert C. 1996. Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of *Phytophthora* and *Pythium* damping-off by *Bacillus subtilis* Cot1 in high-humidity fogging glasshouses. *Phytopathology*, 86: 428-433.

- Bernal G, Illanes A, Ciampi L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus* sp. With antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Journal of Biotechnology*. 5 (1): 45-54.
- Boles BR, and Horswill AR. 2008. agr-Mediated Dispersal of *Staphylococcus aureus* Biofilms. *PLoS Pathogens*. 4(4): e1000052. doi: 10.1371/journal.ppat.1000052.
- Branda SS, Vik AS, Friedman L. and Kolter R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* 13(1):20-26.
- Braun AG, Radman M, and Grossman L.1976. Enzymic repair of DNA: sites of hydrolysis by the *Escherichia coli* endonuclease specific for pyrimidine dimers (endonuclease II). *Biochemistry*. 15(18): 4116-4120.
- Carvalho F, Zhong N, Tavares, Klaine S. 1998. Rastreo de plaguicidas en los trópicos. *Boletín del OEIA*. 4: 25-28.
- Casas FR. 2012. El suelo de cultivo y las condiciones climáticas. España. Ed. Paraninfo. pp. 56-66.
- Chacón MR, Figueras MJ, Castro-Escarpulli G, Soler L, Guarro J. 2003. Distribution of virulence genes in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* spp. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 84:269–278.
- Clara IN. 2008. Control Biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Colombia. Ed. Universidad de la Antioquia.
- Claverie JM, and Notredame C. 2003. *Bioinformatics for Dummies*. Wiley Publishing Inc. pp.56-70.
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition*. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- Costa M, Gómez F, Molina L, Simpson R, Romero A. 2002. Purificación y caracterización de proteasas de *Pseudomonas fluorescens* y sus efectos sobre las proteínas de la leche. *Archivos Latinoamericano de Nutrición*. 52(2): 160-166.
- Costerton JW. 1999. Introduction to biofilms. *Journal of Antimicrobiology Agents*, 11: 217-221.

Costerton W, Lewandowski Z, Caldwell, Korber D. and Lappin- Scott H. 1995. Microbial Biofilms. Annual Review of Microbiology. California, USA. 49: 711-745.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284: 1318- 1322.

De Maagd RA, Bravo A, and Crickmore N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genetics. (17): 193-199.

Demian AL. 19996. Fungal secondary metabolism: regulation and functions. In: SuttonB (ed) A century of mycology. Cambridge University Press, Cambridge, USA. 23: 3-254.

Erwin DC and Ribeiro OK.1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. American Phytopathological Society Press. St. Paul, MN, EEUU. Pp.145-184.

Fassbender H. 1982. Química de Suelos con énfasis en suelos de América Latina. 3ra reimpresión. IICA San José, Costa Rica. 422.

Flint, Maria L, Dreistadt, HS, Clark y Jack K, 1998. Natural Enemies Handbook: The Illustrated Guide to Biological Pest Control. Ed. University of California Press. ISBN 978-0-520-21801-7.

Folders J, Algra J, ROelofs M, Van Loon LC, Tommansen J, and Bitter W. 2001. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Chitinase, a gradually secreted protein, J Bacteriol. 183(24): 7044–7052.

Frykman S, Tsuruta H, Galazzo J, Licari P. 2006. Characterization of product capture resin during microbial cultivations. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 33:445-453.

Gabriel CJ and Cook RJ. 1990. Biological control, the need for a new scientific framework. Bioscience. 40: 204- 207.

Garrido JM, Mendez R, Lema JM. 1996. Nitrificación de aguas residuales: Procesos de biomasa en suspensión y procesos de biopelículas. Bitechology Bioeng, 11: 116-122.

Gindrat D. 1979. Biocontrol of plant diseases by inoculation of fresh wounds, seeds. And soil with antagonists. En Schippers B, Gams W (Eds.) Soil-Borne Plant Pathogens. Academic Press. pp. 537-551.

Haas D, and Keel C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* sp. and relevance for biological control of plant disease. Annual Review of Phytopathology. California, USA. 4:117-153.

Haas D, Défago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. Nat Rev Microbiol, 3:307e19.

Handelsman J, Stabb EV. 1996. Biocontrol of soilborne plant pathogens. Plant Cell, 8:1855e69.

Hans WF, Bornemisza E. 1994. Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina. Costa Rica.

Hawksworth, DL, Kirk PM, Sutton BC, and Pegler DN. 1995. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. CAB International, Wallingford, United Kingdom. 616.

Helmuth WR. 2000. Manejo Integrado y Control Biológico de Plagas y Enfermedades. Alemania. Editorial Abya Yala. Pp 345-367.

Helmuth WR. 2001. Manejo Integrado de plagas en cultivos de la Amazonía Ecuatoriana. Ecuador. Editorial Mossaico.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/mexicocifras/datos-geograficos/21/21001.pdf>

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2004. Guías para la interpretación de Cartografía Edafología. Pp. 11-24.

Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, 2015: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM21puebla/municipios/21164a.html>

Jacobsen BJ, Zidack NK, Larson BJ. 2004. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: Plant diseases Phytopathology. 94: 1272-1275.

Jaramillo DF, Parra LN, Gonzáles LH. 1994. El recurso suelo en Colombia: Distribución y evaluación. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. P 88.

Jaramillo DF. 2002. Libro introducción a la ciencia del suelo. Colombia. Pp 56-76.

- Kim SG, Jang Y, Kim HY, Koh YJ and Kim YH. 2010. Comparison of microbial fungicides in antagonistic activities related to the biological control of *Phytophthora* blight in chili pepper caused by *Phytophthora capsici*. Plant Pathology Journal. 26: 340 e5.
- Kirisits MJ, Prost L, Starkey M, Parsek MR. 2005. Characterization of Colony Morphology Variants Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Applied Environmental Microbiol. 71(8): 4809-4821.
- Kloepper JW, Ryu CM and Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology, 94:1259e66.
- Koay S, Gam L. 2011. Methods development for analysis of proteins extracted from the leaves of *Orthosiphon aristatus*. Journal Chromatography B. 879, 2179-2183.
- Larena I, Melgarejo P, De Cal A. 2002. Production, survival, and evaluation of solid-substrate inocula of *Penicillium oxalicum*, as a biocontrol agent against *Fusarium* wilt of tomato. Phytopathology 92: 863-869.
- Lindsay D, and Von Holy A. 2006. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know? Journal of Hospital Infection, 64: 313-325.
- Madigan M, Martinko J y Parker J. 1998. Biología de los microorganismos. Madrid: Prentice Hall Iberia. 986 pp.
- Mangallappalli-Illathu A.K. and Korber DR. 2006. Adaptive Resistance and Differential Protein Expression of *Salmonella enteric* Serovar Enteritidis Biofilms Exposed to Benzalkonium Chloride. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 50(11): 3588-3596.
- Marcelo AS. 2004. Biología del suelo, guía de estudio. Argentina. Editorial De la Universidad Nacional del Sur.
- Marquart M, Caballero A, Chomnaw M, Thibodeaux B, Twining S, O'Callaghan R. 2005. Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005; 46(10): 3761-3768.
- Monds RD, and O'Toole GA. 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. Trends in Microbiol. 17(2):73-87.

Morris CE, Glaux C, Latour X, Gardan L, Samson R and Pitrat M. 2000. The relationship of host range, physiology, and genotype to virulence on cantaloupe in *Pseudomonas syringae* from cantaloupe blight epidemics in France. *Phytopathology*. 90: 636–646

Mulcahy LR, Burns JL, Lory S and Lewis K. 2010. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* strains producing high levels of persister cells in patients with cystic fibrosis. *Journal of Bacteriology*. 192 (23): 6191-6199.

Nava PE, García GC, Camacho BJ y Vázquez ML. 2012. Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Revista de Sociedad, Cultura y Desarrollo Sustentable*. 8(3): 17-29.

Nelson D and Michael CL. 2004. *Principles of biochemistry*. Fourth Edition. Chapter 11. 877pp.

Nicholls-Estrada CI. 2008. *Control biológico de insectos: Un enfoque agroecológico*. Editorial Universidad de Antioquia, Colombia. 1-9 Pp.

Nucleo E, Fugazza G, Migliavacca R, Spalla M, Comelli M, and Pagani L. 2010. Differences in biofilm formation and aggregative adherence between – lactam susceptible and lactamases producing *Pseudomonas mirabilis* clinical isolates. *New Microbiological*. Italy. 33:37 – 45.

Ochoa SA, López-Montiel F, Escalona G, Cruz-Córdova A. 2013. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas con la formación de biopelículas. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*. 70 (2):138-150.

Ongena M, Jaques P, Toure Y, Destain J, Jabrane A, and Thonart P. 2005. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 69:29-38.

O'Toole GA, and Kolter R. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*. 28(3):449-461.

Pachepsky Y, Shelton DR, McLain JET, Patel J and Mandrell RE. 2011. Irrigation waters as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. *Elsevier*. 13: 73-76.

- Park SY, Kim KM, Lee JH, Seo SJ and Lee IH. 2007. Extracellular Gelatinase of *Enterococcus faecalis* destroys a Defense System in Insect Hemolymph and Human Serum. *Infection and Immunity*. 2007. 75(4): 1861-1869.
- Parsek MR, y Fuqua C. 2004. Biofilms 2003: Emerging Themes and Challenges in Studies of Surface-Associated Microbial Life. *Journal of Bacteriology*. 186(14): 4427-4440.
- Pappas G, Papadimitrou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV. 2006. The new global map of human brucellosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 6(2): 91-9.
- Papavizas GC. 1981. Survival of *Trichoderma harzianum* in soil and in pea and bean rhizospheres. *Phytopathology*. 71: 121-125.
- Pimentel D and Lehman H. 1993. *The pesticide question*. Chapman and Hall. New York.
- Pratt LA, Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*. 30:285-93.
- Priest FG. 2000. Biodiversity of entomopathogenic, endospore-forming bacteria, pp. 16 In Charles JF, A. Delaecluse A, and Roux CL. *Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application*. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.
- Rahman MS, Ano T, and Shoda M. 2007. Biofilm fermentation of iturin A by a recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Bacteriology*. 127:503-507.
- Ramon PF, Juárez G.A. 1997. *Bioquímica de los Microorganismos*. España. Edit Reverté, S.A. pp. 128-140.
- Riazuddin S. and Grossman L. 1977. *Micrococcus luteus* correndonucleases. II. Mechanism of action of two endonucleases specific for DNA containing pyrimidine dimers. *Journal of Biological Chemistry*. 252 (18): 6287-6293.
- Rudrappa T, Biedrzycki ML, and Bais HP. 2008. Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiology Ecology*, 64:153-166.
- Sansinenea E, and Ortiz A. 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*. 33:1523-1538.

- Saranya P, Kumari HS, Rao BP & Sekaran G. 2014. Lipase production from a novel thermo-tolerant and extreme acidophile *Bacillus pumilus* using palm oil as the substrate and treatment of palm oil-containing wastewater. *Environmental Science and Pollution*. 21: 3907-3919.
- Sarti CG, Miyazaki SS, 2013. Actividad antifúngica de extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos de soja y efecto de su coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. *Agrociencia*. 47:373-383.
- Satorre EH. 2003. El libro de la Soja. Servicios y Marketing Agropecuario. Editorial Pluma y papel. 264.
- Sansinenea E, Ortiz A. 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnology Letters*. 33:1523-1538.
- Simón M, Peralta N, Costa JL. 2013. Relación entre la conductividad eléctrica aparente con propiedades del suelo y nutrientes. *Scieleo*, 31 (1): 45-55.
- Schettino YM. 2010. México: Problemas Sociales, Políticos y Económicos. México. Editorial Pearson Educación.
- Soler L, Figueras MJ, Chacón MR, Vila J, Marco F, Martínez-Murcia AJ, Guarro J. 2002. Potential virulence and antimicrobial susceptibility of *Aeromonas popoffii* recovered from freshwater and seawater. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 32:243-247.
- Spoering AL, and Lewis K. 2001. Biofilms and Planktonic Cells of *Pseudomonas aeruginosa* have a Similar Resistance to killing by Antimicrobials. *Journal of Bacteriology*, 183(23): 6746 -6751.
- Sutherland IW, Hughes KA, Skillman LC, and Tait K. 2007. Interaction of phage and biofilms. *Water Science Technology*, 55: 377-385.
- Thomashow LS and Weller DM. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Journal of Bacteriology*, 170(8): 3499-3508.
- Van EH, and Service M. 2004. Pest and vector control. Cambridge University Press, Cambridge.
- Van Loon L, Bank P, and Pieterse C. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology*. Palo Alto, USA. 36:453 - 483.

Varnero MT. 2006. Biodiversidad de Chile: Patrimonio y Desafíos. Capítulo No.2. Primera Edición. CONAMA. 1-5.

Vincent GB. 1992. ED₅₀ levels of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* with reduced sensitivity to thiabendazole, benomyl and imazalil. Elsevier, 1(4): 305-315.

Vining LC. 1990. Functions of secondary metabolites. Annual Review of Microbiology, 44:395-427.

Wang SL, Yieh TC and Shih IL. 1999. Production of antifungal compounds by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. Elsevier, 25: 142-148.

Watnick P, Kolter R. 2000. Biofilm, city of microbes. Journal of Bacteriology, 182: 2675-2676.

Watnick P, Kolter R. 1999. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* biofilm. Molecular Microbiology, 34:586-95.

Wild A. 1992. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Versión Española de P. Urbano Terrón y C. Rojo Fernández. Mundi-Prensa. Madrid. España, 1045.

Zavaleta ME. 1994. Control biológico de fitopatógenos. In: R. Alatorre R. y A.W. Guzmán F. (eds.). Memorias V Curso de Control Biológico. Sociedad Mexicana de Control Biológico, México. 115-125.