

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

TÍTULO DE LA TESIS:

**Actividad antifúngica mediada por lipopéptidos y policétidos
producidos por cepas del género *Bacillus*.**

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOLOGÍA



PRESENTA:

EVELIN PIMENTEL SILVA

DIRECTORA: DRA. VERONICA LILIANA RAMIREZ FALCON

CODIRECTOR: DR. JOSÉ ANTONIO MUNIVE HERNÁNDEZ

Fecha: 13/junio/2022

Agradecimientos

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por ser la cede de mi formación profesional como bióloga.

A los docentes de la Facultad de Ciencias biológicas por haber compartido sus valiosos conocimientos a lo largo nuestra preparación, haciendo que pudiéramos crecer día a día como profesionales, gracias por su dedicación y tolerancia.

A mi directora y Co-director de tesis, la Dra. Verónica y el Dr. Munive, gracias por darme la oportunidad de trabajar junto a ustedes, por su dedicación y paciencia, que sin sus conocimientos y consejos no hubiera podido llegar a la etapa final de mi licenciatura.

A mis amigos y compañeros que han estado conmigo a lo largo de esta bonita etapa, dentro y fuera de la universidad, han sido tantas las experiencias que hemos pasado juntos, sin duda, son de los mejores regalos que me pudo dejar Biología.

A mi mejor amiga, Grecia, gracias por haber estado conmigo cuando creía que ya no podría más, gracias por cada una de tus palabras para que continuara con mis sueños, te quiero mucho nita.

A mi hermano, Eddy, has sido una persona de admirar por tomar tus propias decisiones, pese a todo, gracias por ser el hermano que eres, te quiero mucho nito, ahora es momento de continuar creciendo y que nuestros papás se sientan orgullosos de nosotros.

Pero sobre todo quiero agradecer a mis padres, quienes han estado conmigo en cada momento, sin duda, dejar la casa ha sido la decisión más dolorosa de mi vida y pese a ello, siempre los he sentido cerca, gracias por todo su amor, paciencia y esfuerzo, gracias por confiar en mí y ayudarme a ser la persona que soy. No le puedo pedir nada más a la vida, me dio a los mejores papás, los amo infinitamente.

Gracias a cada una de las personas, que han aportado a mi formación como profesional y ser humano.

A mis padres, quienes me han impulsado y acompañado a lo largo de esta etapa.

Con todo mi amor.

Índice

1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1 Género Bacillus.....	3
2.1.1 Clasificación.....	3
2.1.2 Características.....	3
2.1.3 c) Importancia.....	5
2.2 Bacillus como agente de control biológico.....	7
2.3 Propiedades antifúngicas del género Bacillus.....	8
2.3.1 Péptidos de bajo peso molecular	
2.3.1.1 Lipopéptidos.....	9
a) Surfactina.....	9
2.3.1.2 Policétidos.....	12
a) Macrolactina.....	13
2.3.2 Enzimas hidrolíticas.....	14
2.3.2.1 Proteasas.....	15
2.3.2.2 Quitinasas.....	16
2.3.2.3 Celulasas.....	18
2.3.2.4 Amilasas.....	20
2.4 Fusarium vs Bacillus.....	21
3. Objetivos e hipótesis	
3.1 Objetivo general.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
3.4 Hipótesis.....	23
4. Material y métodos	
4.1 Material biológico.....	23
4.2 Condiciones de cultivo.....	25

4.2.1 Cultivo en medio solido.....	25
4.2.2 Cultivo en medio liquido.....	25
4.3 Ensayos de hidrolasas.	
4.3.1 Evaluación de la expresión de proteasas.....	25
4.3.2 Evaluación de la expresión de celulasas.....	26
4.3.4 Evaluación de la expresión de amilasas.....	26
4.3.4 Evaluación de la expresión de quitinasas.....	26
4.4 Evaluación del efecto de antifúngico de cepas del género Bacillus contra Fusarium oxysporum por medio de ensayos de cultivo dual.....	27
4.5 PCR.....	29
4.6 Determinación de la promoción de la germinación de Bacillus velezensis.....	30
4.7 Análisis estadístico.....	30
5. Resultados	
5.1 Ensayos de hidrolasas.....	31
5.1.1 Evaluación de la expresión de proteasas.....	31
5.1.2 Evaluación de la expresión de celulasas.....	32
5.1.3 Evaluación de la expresión de amilasas	33
5.1.4 Evaluación de la expresión de quitinasas.....	33
5.2 Evaluación del efecto de antifúngico de cepas del género Bacillus contra Fusarium oxysporum por medio de ensayos de cultivo dual.....	34
5.3 PCR.....	39
5.4 Determinación de la promoción de la germinación de Bacillus velezensis.....	40
6. Discusión.....	41
7. Conclusiones.....	45
8. Bibliografía.....	46
9. Anexo.....	61

1. Resumen

El área de más importancia dentro de la industria se centra en la pérdida de cultivos agrícolas como consecuencia de las distintas enfermedades causadas por patógenos, lo que ocasiona la búsqueda de estrategias para lograr combatirla, la más utilizada es el uso de pesticidas, sin embargo, esto conlleva un gran impacto negativo en el ambiente. Uno de los fitopatógenos fúngicos de mayor relevancia es *Fusarium*, causante principal del marchitamiento vascular, ya que afecta a más de 150 huéspedes vegetales, uno de ellos es el jitomate, segundo vegetal comestible con una gran importancia económica a nivel mundial.

Dado el impacto que poseen estos patógenos y las consecuencias que genera el uso de la principal estrategia para combatirlos, se ha buscado una alternativa amigable con el ambiente, dicha investigación se basa en el uso de microorganismos como agentes de control biológico como es el caso del género bacteriano de *Bacillus*.

De hecho, *Bacillus* ha sido ampliamente estudiado por su capacidad de producir una diversa gama de metabolitos secundarios útiles para combatir patógenos. Dentro los metabolitos que produce *Bacillus* con propiedades antifúngicas, se encuentran péptidos de bajo peso molecular, siendo los más estudiados los lipopéptidos como la surfactina y algunos policétidos, capaces de producir enzimas hidrolíticas con las mismas propiedades. *Bacillus* presentan una gran diversidad de propiedades antifúngicas, como la producción péptidos de bajo peso molecular. Ejemplo de ello, son los lipopéptidos y policétidos con actividades antimicrobianas, además de la producción de enzimas hidrolíticas como quitinasas, proteasas y celulasas capaces de causar la lisis de la pared celular de *Fusarium*, por lo que la actividad de biocontrol en *Bacillus* ha sido ampliamente documentada.

Es por ello, que el objetivo principal de este trabajo fue evaluar la actividad antifúngica de cepas del género *Bacillus* provenientes de una zona semiárida contaminada con metales pesados en el estado de Puebla; frente a *Fusarium oxysporum*. Para lograr dicho objetivo, se realizaron ensayos de cultivo dual, se evaluó la presencia de enzimas hidrolíticas a través de halos de hidrólisis, se

identificaron péptidos de bajo peso molecular por medio de PCR y se determinó el potencial de biocontrol durante el proceso de germinación en semillas de jitomate.

Los resultados mostraron que la cepa LEM1054 *B. velezensis* es capaz de expresar proteasas y amilasas, pero no fue capaz de hidrolizar celulosa y quitinasas. La PCR demostró que LEM1054 es capaz de codificar para péptidos de bajo peso molecular que se identificaron como surfactina y macrolactina, metabolitos secundarios con antecedentes de actividad antifúngica. Estos resultados se refuerzan a través de los cultivos duales donde LEM1054 fue la principal cepa capaz de inhibir a *F. oxysporum*. En cuanto a la intervención de esta cepa durante la germinación de semillas de jitomate contaminadas por *F. oxysporum*, nuestros resultados no fueron significativos, a diferencias de antecedentes reportados previamente.

Con los resultados obtenidos podemos concluir que *B. velezensis* LEM1054 presenta metabolitos secundarios con propiedades antifúngicas de gran potencial que actúan de manera sinérgica frente a *F. oxysporum*, por lo que puede utilizarse como agente de control biológico y así disminuir los efectos negativos del uso excesivo de pesticidas.

2. Introducción

2.1 El género *Bacillus*

2.1.1 Clasificación

Bacillus es un género que pertenece a la familia Bacillaceae, orden Bacillales, clase Bacilli, phylum Firmicutes y dominio Bacteria. Fue reportado y descrito por primera vez en 1872 por Cohn, quien propuso de manera inicial una clasificación simple que consideraba únicamente la forma de bastón de las células. Su especie tipo es *Bacillus subtilis* que tienen la clásica forma de bastón y además es formadora de esporas. De acuerdo con Cohn la característica de formar esporas es fundamental para incluir especies dentro de este género (Cohn, 1872).

Desde su primera identificación el género *Bacillus* ha sufrido grandes modificaciones con el avance de la ciencia y las nuevas técnicas de identificación, desde las bioquímicas hasta las técnicas moleculares. *Bacillus*, ha integrado a nuevas cepas como especies. Aunque, muchas han sido reclasificadas dentro de géneros distintos. El género *Bacillus* tiene al mayor número de especies dentro de la familia Bacillaceae, hasta septiembre de 2014 contenía 226 especies según Mandic et al., en 2015. Para el año 2020 Patel, expuso que este género contiene 293 especies/subespecies debido a todas las nuevas especies y reclasificaciones, realizadas, con la ayuda de las herramientas moleculares basadas en las secuencias del gen 16S rRNA (Patel, 2020).

2.1.2 Características

Dentro de las principales características del género *Bacillus* se encuentra que se trata de una bacteria gram positivo que destaca su morfología bacilar, un tamaño que varía de 0.5 a 10 μm , presentan movilidad a través de flagelo, son aerobios o anaerobio facultativos, para un crecimiento óptimo se requiere de un pH neutro, un intervalo de temperatura que va de 30 a 45°C (bacterias mesófilas). Sin embargo, no son características exclusivas para el género *Bacillus*, ya que estas pueden

diferir entre las distintas especies que integran el género debido a la diversidad fenotípica que existe como consecuencia de los mecanismos de evolución. Un ejemplo de esta diversidad de ambientes en los que puede crecer *Bacillus* de acuerdo a la temperatura y pH, ya que pueden dividirse en psicrófilos, termófilos, acidófilos y alcalófilos (Hernández, 2019; Forjado-Cavazoz, 2014).

La característica más distintiva de este género se basa en su capacidad de esporular una de las etapas de su ciclo de vida. La esporulación se compone de dos fases: el crecimiento vegetativo y la esporulación. El primero es la fase de crecimiento exponencial, donde la bacteria tiene las condiciones nutricionales y ambientales favorables para su crecimiento. La segunda fase es la esporulación donde estas especies forman una endospora debido a cambios desfavorables en sus condiciones nutricionales o ambientales. La esporulación le permite a la bacteria poder sobrevivir en ambientes desfavorables, debido a que sus esporas son resistentes a distintos factores como el calor, radiación, desecación, falta de nutrientes o cualquier situación adversa (Setlow, 2014; Villarreal-Delgado et al., 2018).

Por otra parte, *Bacillus* es considerado un género ubicuo, debido a que se encuentra ampliamente distribuido en diferentes ambientes, como el suelo, aire, agua dulce y salada, el tracto gastrointestinal de animales, materia vegetal en descomposición, la rizosfera de plantas, desierto e incluso la Antártida. (Layton et al., 2011; Vilain et al., 2006). Es precisamente el proceso de esporulación el que le permite al género *Bacillus* considerarse ubicuo, ya que sus esporas pueden diseminarse por medio de corrientes de aire o agua en distintos ambientes y permanecer en ellos incluso durante años hasta que logren germinar y convertirse en una célula en crecimiento a través de distintos agentes que desencadenan la germinación, perdiendo así su latencia y sus propiedades de resistencia que presentan como una espora. Pese a ello aún no está del todo claro si es posible que las esporas de *Bacillus*, puedan germinar y sobrevivir en todos los ambientes que han sido halladas o simplemente han sido encontradas en estos ambientes por la dispersión de aire y agua (Hernández, 2019; Setlow, 2014).

2.1.3 Importancia

A lo largo de las últimas décadas de investigación las especies de *Bacillus* han tenido una inmensa importancia debido a la gran diversidad dentro del género. Gracias a sus propiedades fisiológicas y metabólicas que le permiten sobrevivir en los distintos ambientes, las especies de *Bacillus* tienen la capacidad de producir una amplia gama de metabolitos que han sido utilizados en distintas industrias desde farmacéuticas, agrícolas, alimentaria, cosméticas, en procesos médicos, etc. (Hudson, 2008; Karpov, 2020; Su, 2020; Konuray et al., 2018).

Sin embargo, entre las especies de *Bacillus* también se presentan casos de especies con importancia médica, un ejemplo de ello es *B. thracis*, ántrax, la enfermedad más conocida del género *Bacillus*. Aunque esta enfermedad es principalmente de los herbívoros, también la pueden adquirir los humanos como consecuencia del contacto con animales infectadas o productos contaminados, es decir, por intoxicación en alimentos debido a la contaminación por sus esporas (Hudson, 2008). Otra especie patógena igualmente importante por su alta frecuencia en casos hospitalarios es el caso de *B. cereus*, una de las especies que comúnmente pueden ocasionar distintas infecciones en ojo, tracto respiratorio, sistema nervioso central heridas, tracto urinario, oído, septicemia, etc. (Logan, 1988; Turnbull, 1996).

Son muy pocas las especies patógenas dentro del género *Bacillus*, la gran mayoría se trata de especies inofensivas y con un alto potencial dentro de la industria alimenticia. No solo se ha demostrado que existen especies como contaminantes de los alimentos, sino que también se puede tratar de microorganismos probióticos que actualmente su interés ha aumentado entre los consumidores debido a su capacidad de inhibir a microorganismos patógenos. Los probióticos pueden ser producidos de dos distintas maneras, ya sea a través de su forma vegetativa o por sus esporas, resistentes a las altas temperaturas. Las distintas condiciones de crecimiento entre las especies de *Bacillus*, le permite considerarse como una alternativa para esta industria. Una de las especies de interés ha sido *B. coagulans*, una especie que puede fermentar glucosa y xilosa a ácido láctico, uno de los

principales productos con interés industrial para la producción de probióticos (Konuray et al., 2018).

Finalmente, una de las principales áreas con mayor importancia de estudio ha sido la agricultura debido a la gran diversidad de metabolitos que son producidos por el género *Bacillus* y que funcionan como agentes de control biológico. Entre los metabolitos con importancia en la agricultura se encuentran cuerpos microscópicos que adquieren la forma de cristal. Estos cuerpos están formados por diferentes proteínas, pero principalmente por las proteínas Cry las cuales presentan actividad de plaguicida. La principal especie que ha sido estudiada por la producción de estos cristales es *B. thuringiensis*, como biocontrol de distintas plagas agrícolas que incluyen a distintos géneros de insectos (lepidópteros, dípteros y coleópteros) y nematodos. La citotoxicidad de estas proteínas ocurre tras unirse a las membranas celulares al llegar al intestino, causando la muerte de la plaga. Estas proteínas han sido utilizadas desde hace más de 50 años en forma comercial contra plagas agrícolas (Vázquez-Pineda et al., 2012; Valtierra et al., 2020).

Además de los metabolitos que *Bacillus* produce contra patógenos de plantas, también se ha encontrado que tienen la capacidad de producir compuestos antimicrobianos con propiedades antibióticas contra hongos, bacterias y virus, como es el caso de péptidos de bajo peso molecular generados ribosomalmente (bacteriocinas) o los no ribosomalmente (péptidos, lipopéptidos y policétidos), e incluso tiene la capacidad de producir enzimas hidrolíticas con las mismas funciones antifúngicas y antibacterianas (Miljaković et al., 2020; Wang et al., 2015). Otra característica de interés en *Bacillus* es su capacidad de producir moléculas que promueven el crecimiento vegetal y su participación en la biorremediación en suelos con alto contenido de metales pesados, gracias a la presencia de genes de resistencia a metales pesados, que hace que distintas especies del género *Bacillus* puedan sobrevivir en suelos contaminados, además de ser capaces para utilizarlos en su metabolismo generando beneficios para las plantas (Miljaković et al., 2020; Olanrewaju et al., 2017). Por ejemplo, se ha demostrado la presencia de algunas especies de *Bacillus*, en suelos contaminados con metales pesados aislados de

nódulos *Prosopis laevigata*, siendo candidatos adecuados para la restauración de suelos contaminados por metales pesados (Ramírez et al., 2019).

2.2 *Bacillus* como agente de control biológico

La pérdida de cultivos agrícolas como consecuencia de las distintas enfermedades causadas por microorganismos como virus, bacterias u hongos cada día son más frecuentes, se sabe que aproximadamente entre el 20 y 40% de las pérdidas de los cultivos cada año son a causa estos patógenos (Savary et al., 2012). Entre las estrategias para combatir estas plagas está la rotación de cultivos e incluso evitar cultivos de plantas más susceptibles. Estos métodos son menos invasivos pero no tan efectivos debido a la alta supervivencia de los patógenos en el suelo, por lo que los agricultores se han vuelto más dependientes del uso de agroquímicos volviéndose un método “confiable” para la protección de los cultivos (Syed et al., 2018).

Sin embargo, el uso de los pesticidas en la agricultura para combatir plagas en los cultivos y así protegerlos ha generado gran impacto negativo acumulándose grandes cantidades de agroquímicos en el ambiente. Esta situación ha traído consigo graves problemas como la contaminación de los suelos, ocasionando la disminución de las poblaciones de microorganismos benéficos en los suelos, además de la contaminación de aguas subterráneas y superficiales. (Aktar et al., 2009).

Como consecuencia del uso inadecuado y en exceso de los pesticidas se ha provocado que muchos de los microorganismos patógenos se hayan vuelto resistentes a estos químicos, por lo que resulta más complicado combatir estas plagas además de todos los contras que su uso conlleva por ejemplo el impacto directo en los humanos o a través de productos alimentarios generando enfermedades crónicas e incluso la muerte como consecuencia del envenenamiento de estos químicos (Aktar et al., 2009).

Por lo tanto, desde las últimas décadas se ha buscado una alternativa amigable con el ambiente con la finalidad de evitar el impacto negativo que se ha generado por el uso de estos pesticidas. Dicho método se basa en el uso de microorganismos con características antimicrobianas, tal como las que presenta el género *Bacillus*, al ser capaces de producir una gran cantidad de metabolitos secundarios con actividades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, etc., por lo que muchas especies de este género son consideradas como agentes de control biológico. Según Layton et al. (2011) define el mecanismo de biocontrol como el uso del conjunto de reacciones metabólicas y bioquímicas que presentan algunos microorganismos, dichas reacciones son capaces de inhibir la expresión de microorganismos patógenos.

Tal como se mencionó anteriormente, *Bacillus* también promueve el crecimiento vegetal debido a que pueden facilitar la disponibilidad de nutrientes para las plantas a través de los numerosos metabolitos que produce, siendo fijadores de N₂ y/o solubilizadores de P, además de producir fitohormonas importantes en el desarrollo de las plantas (Miljaković et al., 2020). Se ha comprobado que cepas de *Bacillus* pueden inhibir la infección fúngica por distintas especies del género *Fusarium* en semillas de frijol durante la germinación sugiriendo su potente actividad de biocontrol desde este proceso (Hazarika et al., 2019). El mecanismo de biocontrol en *Bacillus*, se debe a la producción de antibióticos de bajo peso molecular como las bacteriocinas, lipopéptidos, péptidos, policétidos, también por la producción de enzimas líticas (Miljaković et al., 2020; Tejera-Hernández et al., 2011).

2.3 Propiedades antifúngicas del género *Bacillus*

Los fitopatógenos fúngicos son más complicados de controlar debido a su alto espectro de huéspedes, por lo tanto, se requieren de dosis más altas de pesticidas para combatirlos, ocasionando que el impacto en el ambiente suela ser mucho mayor. *Bacillus* es uno de los géneros bacterianos con la capacidad de producir una amplia gama de compuestos antimicrobianos, entre ellos, antifúngicos. Tal como se ha mencionado anteriormente, *Bacillus* es capaz de producir compuestos de bajo peso molecular con actividades antibióticas, así como enzimas líticas contra

fitopatógenos fúngicos entre las que destacan las proteasas, quitinasas, celulasas y amilasas; enzimas capaces de degradar la pared celular de algunos microorganismos (Shoda, 2000). Se ha comprobado que especies de *Bacillus*, destinan hasta el 8.5% de su maquinaria genética a la síntesis de compuestos antimicrobianos (Chen et al., 2009).

Dentro de los compuestos de bajo peso molecular producidos por *Bacillus* con mayor importancia en la investigación se encuentran los producidos no ribosomalmente como los lipopéptidos, péptidos, policétidos ya que exhiben una actividad antimicrobiana mucho más fuerte actuando sobre la estructura y permeabilidad de la membrana a través de poros conductores de iones (Miljaković et al., 2020). A continuación se describen los lipopéptidos y policétidos más importantes en *Bacillus*.

2.3.1 Péptidos de bajo peso molecular. No ribosomales. (Independientes al ribosoma)

2.3.1.1 Lipopéptidos.

Los lipopéptidos son pequeños compuestos cíclicos o lineales de bajo peso molecular con características anfifílicas (Hashem et al., 2019), se encuentran constituidos por 7 a 10 aminoácidos ligados a un ácido graso β -hidroxi con 13 a 19 átomos de C (Zhao et al., 2017). En 2007 Romero et al., informaron que los lipopéptidos pueden proteger a las plantas antes y después de la cosecha mediante la supresión directa a los hongos patógenos o al inducir la resistencia sistémica en las plantas hospedantes.

A) Surfactina

Se trata de un metabolito secundario, descrito y aislado por primera vez en 1968 por Arima et al., como un compuesto biológicamente activo producido por las especies del género *Bacillus*. La surfactina como su nombre lo indica se trata de un

lipopéptido con actividad de biosurfactante producidos por sistemas biológicos como es el caso de bacterias. Los surfactantes se pueden clasificar de acuerdo con su origen y propiedades encontrándose principalmente los glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, ácidos grasos, fosfolípidos, lípidos neutros y surfactantes poliméricos (Desai y Banat, 1997). Los producidos por sistemas biológicos son considerados más amigables en comparación con los surfactantes sintéticos debido a las propiedades que presentan como su eficacia para mejorar la biodegradación, la menor sensibilidad en entornos extremos, su baja toxicidad y la solubilización de compuestos de baja solubilidad (Mulligan, 2005).

Para la producción fermentativa de surfactina es necesario considerar algunos factores importantes para una mayor producción ya que depende de la cepa microbiana, de la fuente de carbono y nitrógeno, algunos factores medioambientales como el pH, la temperatura, la agitación, la disponibilidad de oxígeno e incluso la concentración de sales (Desai y Banat, 1997).

Cada una de las propiedades que presenta la surfactina, se debe a la estructura química que presenta, la cual consiste en una cadena de aminoácidos de siete residuos con la siguiente secuencia: L-Glu1- L-Leu2- D-Leu3- L-Val4- L-Asp5- D-Leu6-L-Leu7 en forma de anillo unida a una cadena de ácido graso β -hidroxi con 13-15 carbonos a través de la formación de lactona y de naturaleza anfifílica (Théatre et al., 2021).

Se trata de un péptido de bajo peso molecular, los cuales son independientes al ribosoma es decir se sintetizan de una forma no ribosómica. Estos lipopéptidos son sintetizados por un sistema especializado, llamado péptido sintetasa no ribosomal (NRPS) codificados por el operón *urfA* que contiene los siguientes marcos de lectura abiertos: *urfAA*, *urfAB*, *urfAC* y *urfAD*. Los NRPS son megaenzimas multimodulares constituidas por 7 módulos, en cada módulo se incorporará uno de los siete aminoácidos que conforman el esqueleto peptídico.

Es fundamental mencionar que además de la actividad de biosurfactante de la surfactina, también presenta una gran importancia como antibiótico debido a su amplio espectro contra fitopatógenos, principalmente como antifúngico, con el fin de

buscar nuevas alternativas para combatir dichas plagas y disminuir el uso de pesticidas. Se considera que estas actividades se deben a sus propiedades y su naturaleza anfifílica como una consecuencia directa de la interacción de surfactina con su membrana diana y la modulación de las propiedades de las bicapas de fosfolípidos (Grau et al., 1999).

Se ha demostrado que la interacción de la surfactina con la membrana lipídica de las células, según Grau et al. en 1999 perturba las bicapas de fosfolípidos de forma distinta según la composición lipídica ocasionando la formación de poros conductores de iones en las membranas (Grau et al., 1999).

En los últimos años se ha realizado una investigación considerablemente creciente sobre el tema de la surfactina y sus actividades antimicrobianas en especies de *Bacillus*. Las familias de lipopéptidos con mayor interés se centran en la clasificación de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y a la longitud del ácido graso como la surfactina, iturina y fengicina (Ongena y Jacques, 2008). Siendo la familia de las surfactinas la más ampliamente estudiada en el género *Bacillus* y encontrándose en especies como *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *B. coagulans*, *B. velezensis* y *B. spizizeni* (Miljaković et al., 2020; Théatre et al., 2021).

Queda claro que la actividad de la surfactina como antibiótico se debe a la alteración de la integración de la membrana, cuando se presenta una mayor concentración de surfactina en la célula da como resultado final la lisis celular, debido a la desintegración del sistema de membrana. (Vollenbroich et al., 1997; Carrillo et al., 2003; Heerklotz y Seelig, 2007).

Un papel importante de la surfactina en la actividad de biocontrol frente a hongos fitopatógenos se debe a su participación en la colonización de la raíz vegetal y la formación de biopelículas. En 2004, Bais et al., realizaron un estudio para conocer el sistema de patogenicidad de las raíces de *Arabidopsis* susceptible a la infección por *Pseudomonas syringae*, utilizando la cepa 6051 de *B. subtilis* como agente de biocontrol y la cepa M1 de *B. subtilis* la cual carece del gen *srfA* que codifica para la enzima surfactina sintetasa, la cual cataliza la síntesis de la surfactina por lo tanto al carecer de dicho gen hay una deficiente producción del péptido antibiótico. Los

resultados arrojaron que *B. subtilis M1* es ineficaz como agente de biocontrol y una reducida producción de biopelícula en las raíces de *Arabidopsis*, contrario a la cepa 6051 de *B. subtilis*, en la que se observó una biopelícula estable y secreción de surfactina, actuando ambas de manera sinérgica contra el ataque de *P. syringae*

Otra especie bacteriana en el que también se ha demostrado que *Bacillus* tiene actividad antimicrobiana, es en *Xanthomonas citri*, causante de cancrrosis en los cítricos mostrando que *B. amyloliquefaciens* presenta surfactina, iturina y fengicina, además mediante un análisis de microscopia electrónica de barrido y microscopia electrónica de transmisión, se pudo observar un daño en la pared celular con fugas del contenido bacteriano (Wang et al., 2022).

Son muchas las especies de *Bacillus* en las que se ha comprobado su actividad como agente de biocontrol, otra de ellas es *B. siamensis*, de gran importancia en la marchitez causada por *Fusarium* de un sinfín de plantas como en pepino (*Cucumis sativus* L.). Con sus experimentos Zhou et al., en 2022, mostraron que con la aplicación de la cepa YC-9 de *B. siamensis* se reducía significativamente la incidencia de marchitez del pepino. Asimismo, con pruebas de PCR, se reveló la presencia de genes para antibióticos conocidos como bacilomicina, iturina y surfactina. Además de la marchitez en pepino, *Fusarium* también puede provocar la pudrición de la corona del trigo. Buscando alternativas amigables con el ambiente se encontró que *B. halotolerans* pueden reducir el índice de la enfermedad por la presencia de varios lipopéptidos, entre ellos la surfactina (Li et al, 2022).

Podemos darnos cuenta que son muchas las especies *Bacillus* que presentan un amplio espectro contra distintos géneros bacterianos y fúngicos en las que pueden producir una gran gama de lipopéptidos con propiedades antimicrobianas, uno de los más estudiados hasta la actualidad ha sido la surfactina.

2.3.1.2 Policétidos

Los policétidos son un conjunto de péptidos de bajo peso molecular producidos de forma independiente al ribosoma, considerados como metabolitos secundarios

bioactivos sintetizados por bacterias, hongos y plantas, que pueden tener distintas funciones biológicas en las que destaca la de antibiótico (Staunton y Weissman, 2001). Los policétidos son sintetizados por complejos multienzimáticos llamado policétido sintetasa (PKS) (Staunton y Wilkinson, 1998). Entre los policétidos con actividades antifúngicas y antibacterianas podemos encontrar al bacillaeno, dihidrobacillaeno, oxidifidina, difficidina y macrolactinas (Miljaković et al., 2020).

A) Macrolactina

Las macrolactinas son macrólidos que contienen tres elementos de estructuras de dienos que se encuentran separados en un anillo de lactona de 24 miembros, su síntesis es no ribosómica y se lleva a cabo en el sistema multienzimático PKS (policétido sintetasa) (Fazole y Baek, 2020). Fueron aisladas y descritas por primera vez en 1989 por Gustafson et al., en una especie marina del género *Bacillus* (Gustafson et al., 1989). En su gran mayoría las macrolactinas son metabolitos secundarios de microorganismos marinos, sin embargo, también se han aislado de *Bacillus* sp. Sunhua en suelo en cultivos de papa. Esta cepa es capaz de producir Macrolactina A la cual puede inhibir el proceso de esporulación y formación de micelio en *Streptomyces scabiei* provocando también la disrupción del mismo (Han et al., 2005).

Se han descrito químicamente alrededor de 17 macrolactinas las cuales difieren en pequeñas diferencias dentro de su estructura. Siendo la macrolactina A el metabolito más activo del grupo (Fazole y Baek, 2020) y una de las más estudiadas junto a 7-O-malonil macrolactina A, 7-O-succinil macrolactina A, macrolactina E y macrolactina F. En las últimas que han sido caracterizadas se han encontrado en especies marinas, como es el caso de la macrolactina T, macrolactina U, con actividad inhibitoria contra hongos como *Pyricularia oryzae* y *Alternaria solani* y la bacteria *Staphylococcus aureus* (Xue et al., 2008). También se reportó a macrolactina S, con actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Lu et al., 2008). Otra macrolactina que presenta un efecto

inhibidor para estas dos especies patógenas es macrolactina N, que fue encontrado en caldos de cultivos de *B. subtilis* (Yoo et al., 2006).

Se sabe que las macrolactinas presentan una gran gama de actividades biológicas con una considerable importancia en el área médica, destacando su actividad como antibacteriano, antiviral y antifúngico (Ortiz y Sansinenea, 2020). En el área médica se ha investigado su potencial como una alternativa para producción de nuevos fármacos con actividad antibiótica para bacterias resistentes. Se han expuesto las actividades antibacterianas de la macrolactina A y 7-O-succinil macrolactina A producidas por *B. polyfermenticus* contra enterococos resistentes a vancomicina y *S. aureus* resistente a la meticilina (Kim et al., 2011).

Una de las especies de *Bacillus* con mayor interés en la investigación como agente de biocontrol ha sido *B. amyloliquefaciens*, la cual es capaz de producir además de lipopéptidos también policétidos, entre ellos la macrolactina (Yuan et al., 2014). Se ha descrito que la macrolactina A presenta actividades antimicrobianas en *Camellia oleifera* contra la pudrición blanda, enfermedad bacteriana que puede afectar a muchos cultivos de importancia agrícola ocasionando grandes pérdidas económicas (Chen et al., 2019). Otra bacteria patógena contra la que también se ha evaluado la actividad antimicrobiana de macrolactina A, 7-O- malonil macrolactina A y 7-O-macrolactina A frente a *Ralstonia solanacearum*, patógeno que puede afectar con marchitez cultivos de tomate, papa, plátano, etc. (Yuan et al., 2012).

Pese a que la gran mayoría de los estudios de macrolactina se basa en su actividad como antibacteriano, también es importante mencionar su potencial como antifúngico, tal como se mencionó anteriormente, son muchos los hongos fitopatógenos en los que la macrolactina tiene un efecto inhibidor.

2.3.2 Enzimas hidrolíticas

La actividad antimicrobiana del género *Bacillus*, además de los péptidos de bajo peso molecular, también se debe a la producción de enzimas hidrolíticas como las proteasas, quitinasas, celulasas y amilasas capaces de degradar los principales

componentes de la pared celular de fitopatógenos (Miljaković et al., 2020). El género *Bacillus* es responsable del 50% aproximadamente del total de las enzimas con importancia en la industria generando 1.600 millones de dólares, por ello tanto interés en la investigación para la producción en masa de estas enzimas (Schallmey et al., 2004).

2.3.2.1 Proteasas

Las proteasas son un grupo de enzimas altamente complejas que actúan sobre la hidrólisis de los enlaces péptidos en una reacción esencialmente irreversible (Fink y Jerala, 2022). Estas pueden clasificarse de acuerdo con distintas características como la posición de la ruptura de los enlaces peptídicos, según ello, se clasifican en exopeptidasas y endopeptidasas. Dentro de las primeras se encuentran los aminopeptidasas y carboxipeptidasas, mientras que, en las segundas, la serina, cisteína, aspártico, metalo, treonina, endopeptidasas glutámicas y péptido liasas asparagina. Otra característica con la cual también se dividen es según el pH, en alcalinas, neutras y ácidas (Saggu y Mishra, 2017).

Estas enzimas constituyen el 60% aproximadamente del total de las ventas de las enzimas industriales debido a la amplia gama de aplicaciones que presentan (Saggu y Mishra, 2017). Las proteasas se han utilizado en el campos de los detergentes, alimentos, productos fármacos, cosmética, textil, recuperación de metales y tratamientos de residuos (Banerjee y Ray, 2017; Jisha et al., 2013)

Las especies del género *Bacillus*, son las principales productoras de proteasas durante años se ha utilizado ampliamente a *B. subtilis* como modelo de estudio en los distintos sectores industriales e incluso es la mejor especie caracterizada en este tema; otras especies igualmente importantes han sido *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis* (Van Dijn y Hecker, 2013).

Dentro de las características que favorece a *Bacillus* para que sea el género más estudiado en la producción de enzimas con aplicación en la industria se debe a su capacidad de producir y secretar grandes cantidades de enzimas (20-25 g/L),

además de su capacidad de fermentar en rangos de pH ácidos, neutros y alcalinos, esto combinado con sus características de crecimiento a diferentes temperaturas, destacando su estabilidad térmica, su rápido crecimiento, su fácil manipulación genética y la ausencia total de subproductos tóxicos (Van Dijk y Hecker, 2013; Schallmeyer et al., 2004). Además de que el principal interés para la industria es la obtención de mayor masa a un menor costo. En el proceso de producción de enzimas es precisamente el recuperación y purificación de las mismas lo que ocasione un aumento en los costos, es por ello que se han buscado géneros bacterianos con características que puedan ser factibles para disminuir los gastos, siendo el género de *Bacillus* el más rentable para la industria por su corto ciclo de fermentación (Saggu y Mishra, 2017; Contesini et al., 2018).

En tal sentido, una de las utilidades de las proteasas en *Bacillus* es su aplicación como agentes de biocontrol. Se ha informado la actividad de biocontrol por proteasas en *B. amyloliquefaciens* SP1 contra *F. oxysporum*, con un análisis de la secuencia de aminoácidos se reveló un 86% de homología con subtilisina, una proteasa de *B. subtilis* (Guleria et al., 2016).

Por ello, las proteasas de *Bacillus* tienen gran importancia debido a su fácil manejo y producción en masa en la industria, lo que las vuelve fundamentales como una de las mejores estrategias como alternativas para disminuir el uso de pesticidas en exceso.

2.3.2.2 Quitinasas

La quitina es un polisacárido constituido por unidades de N-acetilglusamina que se encuentra unida con enlaces β -1,4-glucosídicos. Es el segundo polisacárido más abundante disponible de forma natural después de la celulosa. La quitina es el componente estructural de varios organismos como insectos, crustáceos, moluscos y hongos. Según el organismo será el porcentaje de quitina que presentan; el mayor porcentaje de este polisacárido se encuentra en los cangrejos y camarones ya que

constituyen el 90% de los desechos quitinosos (Bhushan, 2000; Rathore y Gupta, 2015).

A pesar de la abundancia de la quitina esta no se acumula en el ambiente debido a la participación de enzimas denominadas como quitinasas que son capaces de degradar los enlaces β -1,4-glucosídicos. Las quitinasas son producidas por una gran variedad de organismos que incluyen bacterias, hongos, insectos, plantas y vertebrados. Las quitinasas bacterianas utilizan la quitina, como fuente de energía, además de que desempeñan un papel importante en la patología bacteriana, siempre que el huésped contenga quitina (Rathore y Gupta, 2015).

Estas enzimas han llamado mucho la atención debido a su amplia gama de aplicaciones en la industria, pero lo que mayormente ha destacado es su actividad de control biológico de fitopatógenos fúngicos (Villarreal-Delgado et al., 2018; Dahiya et al., 2006). Esta actividad ocurre ya que la pared celular de los hongos se encuentra constituida principalmente por quitina y glucano, componentes que las quitinasas pueden degradar (Miljaković et al., 2020). Douriet-Gómez et al. en 2018, realizaron un análisis genómico de *Bacillus* sp. Cepa B25 junto a otras cepas de *Bacillus*, encontrando la presencia de genes asociados con el antagonismo fúngico que incluyen a quitinasas, glucósidos hidrolasas, sideróforos y antibióticos.

Bacillus, es uno de los géneros bacterianos, reportados como productores de quitinasas, en 2005, Driss et al., realizaron una caracterización molecular de una nueva quitinasa obtenida de *B. thuringiensis subsp. Kurstaki*. Tal como se ha mencionado anteriormente, *Bacillus* es un género modelo de las investigaciones para su aplicación a nivel industrial.

Se ha reportado que las quitinasas obtenidas de distintas especies de *Bacillus* tienen un papel en las actividades antifúngicas (Villarreal-Delgado et al., 2018). Huang et al. en 2005, mostraron la actividad antifúngica de una quitinasa de *B. cereus* 28-9, aislada de una planta de lirio en Taiwán, frente a la germinación conidial del patógeno fúngico del tizón de la hoja del lirio, *Botrytis elliptica* (Huang et al., 2005).

Otra especie de *Bacillus* en la que se ha encontrado la presencia de quitinasas es en *B. thuringiensis*, se ha investigado su actividad al actuar frente a hongos fitopatógenos como *Slerotium rolfsii* y algunas especies de *Fusarium* en semillas de soja infectadas (Reyes-Ramírez et al., 2006). En 2012 Gomaa, realizó una investigación en distintas cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de plantas recolectadas de Egipto para la producción de quitinasas, *B. thuringiensis* y *B. licheniformis* fueron positivas a quitinasas. Estas enzimas presentaron potencial para la lisis de la pared celular de hongos fitopatógenos, siendo más eficaz *B. thuringiensis* que *B. licheniformis* para aumentar la germinación de semillas de soja infectadas (Gomaa, 2012).

Con todo ello, se ha comprobado la presencia de quitinasas en especies del género *Bacillus* y su contribución en la actividad de agentes de control biológico en fitopatógenos fúngicos a través de la degradación de la quitina que es el principal componente estructural de la pared celular de los hongos.

2.3.2.3 Celulasas

La celulosa es el componente más abundante de la biomasa vegetal y se encuentra en las paredes celulares de las plantas. Las fibras de celulosa están incrustadas en un biopolímero estructural constituido por hemicelulosa y lignina. Químicamente la celulosa es un polisacárido compuesto por monómeros de glucosa unidos por medio de enlaces 1,4- β - glucósidos. La celulosa se sintetiza como moléculas individuales que se ensamblan en unidades más grandes llamadas protofibrillas, estas a su vez se empaquetan en microfibrillas que interactúan para dar origen a las fibras de celulosas (Lynd et al., 2002).

La biodegradación de la celulosa se lleva a cabo a través de las celulasas, enzimas capaces de degradar los enlaces 1,4- β - glucosídicos de la celulosa. Estas enzimas son producidas por distintos microorganismos entre los que se incluyen bacterias y hongos. Las celulasas incluyen tres tipos de enzimas con diferentes actividades: las endoglucanasas que actúan en la región interna de las fibras de celulasas liberando

oligosacáridos de diversas longitudes, las exoglucanasas que actúan en los extremos de las fibras y dan lugar a la celobiosa y las β -glucosidasas que rompen los enlaces de celobiosa liberando moléculas de glucosa libre (Lynd et al., 2002).

La hidrólisis de la celulosa en sus monómeros de glucosa presenta un potencial a nivel de industria debido a su uso como sustrato microbiano para la producción de productos de fermentación, como el etanol, que puede utilizarse como una fuente de biocombustible alternativo. Sin embargo, no es su única aplicación, ya que también tiene diversas aplicaciones en la industria textil, en la producción de pulpa y papel, en la fabricación de detergentes e incluso el control de fitopatógenos en la agricultura (Fatani et al, 2021; Behera et al., 2016; Ejaz et al., 2021).

Pese a que la mayoría de los estudios de celulasas se han basado en hongos, en varios géneros bacterianos como *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Bacillus*, *Thermonospora*, *Ruminococcus*, *Bacteriodes*, *Erwinia* y *Acetivibrio* se ha reportado la presencia de celulasas (Robson y Chambliss, 1989). Con respecto a *Bacillus*, ya que se ha mencionado que es una bacteria con predominante capacidad en la secreción de enzimas hidrolíticas como las quitinasas, proteasas y celulasas. Específicamente, las celulasas producidas por *Bacillus*, al ser termoestables han tenido un uso preferencial en la industria. Por lo tanto, el género *Bacillus* es una de los géneros bacterianos más utilizados para la producción industrial después de los hongos (Chang et al., 2016).

En el género *Bacillus*, se han reportado celulasas en *B. amyloliquefaciens* (Kim, 2020), *B. licheniformis* (Da-Silva et al., 2021), *B. cereus* (Tabssum et al., 2018). La especie que ha presentado mayor interés ha sido *B. subtilis* (Su, 2002).

En 2018, Siu-Rodas et al., aislaron e identificaron cepas bacterianas de este género durante el proceso de compostaje de residuos de café con capacidad celulítica que fue evaluada por la formación de halos de hidrólisis. Para este mismo género se han realizado caracterizaciones bioquímicas y optimización de la composición de medios mediante métodos estadísticos para inducir una mayor producción de celulosa (Malik y Javed, 2021; Deka et al., 2011).

La mayoría de la información en cuanto a la actividad de agentes de control biológico de fitopatógenos se basa en celulasas producidas por hongos, ya que las β -glucanasas fúngicas son capaces de controlar enfermedades al degradar las paredes fúngicas de los patógenos vegetales. También, se sabe que las celulasas pueden ayudar a la germinación de semillas y sistema radicular, mejoran el crecimiento y la floración de las plantas (Kuhad et al., 2011).

2.3.2.4 Amilasas

El almidón es una macromolécula formada por dos tipos de polímeros de glucosa: la amilosa y la amilopectina. Estos polímeros presentan estructuras y propiedades que difieren entre sí; la amilosa es un polímero lineal de 6000 unidades de glucosa unidos por enlaces α -1,4-glucosídicos, en cambio amilopectina está compuesta por cadenas unidos de enlaces α -1,4 a 10-60 unidades de glucosa con un lado unido a α -1,6 con 15-45 unidades de glucosa (De-Souza y De-Oliveira, 2010).

Esta macromolécula es hidrolizada por las enzimas amilasas que se clasifican en α -amilasa, β -amilasa y glucoamilasa o γ -amilasa. Además, estas enzimas se pueden dividir en endoamilasas y exoamilasas; las primeras hidrolizan el almidón de forma aleatoria formando oligosacáridos lineales de varias longitudes, mientras que las segundas hidrolizan desde el extremo resultando productos más cortos (Gopinath et al., 2017). Las amilasas comprenden aproximadamente el 30% de las enzimas de la producción mundial con una gran gama de aplicaciones en la industria, por ello tanto interés en su investigación (Van der Maarel et al., 2002).

Se distribuyen ampliamente en una gran variedad de organismos que van desde bacterias, hongos y levaduras. Siendo las amilasas bacterianas las de mayor interés debido a que su producción es más económica y rápida en comparación con otros microorganismos (De-Souza y De-Oliveira, 2010).

Gopinath et al. en 2017, informo en su revisión que la mayoría de las especies bacterianas para la secreción de amilasa pertenecen al género *Bacillus*, entre las especies están *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B.*

licheniformis, *B. coagulans*, *B. polymyxa*, *B. mesentericus*, *B. vulgaris*, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. halodurans* y *Bacillus* sp. *Ferdowsicus*.

Se considera a *Bacillus* un caballo de batalla bacteriano debido a su ciclo de fermentación corto, fácil manipulación, un amplio rango de condiciones que va desde pH, temperatura, presión, etc., sin embargo, el principal desafío para satisfacer las demandas en la industria es la diversidad de patrones de crecimientos, perfiles enzimáticos y propiedades generales dependiendo de la cepa y especie (Dash et al., 2015).

2.4 *Fusarium* vs *Bacillus*

El género *Fusarium* pertenece al phylum ascomycota, se trata de hongos filamentosos con reproducción asexual que se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo y sustratos orgánicos (Tapia y Amaro, 2014). *Fusarium*, es de los hongos patógenos más importantes a nivel mundial. Se han reportado como patógenos en ganado e incluso humanos, esto como consecuencia de la contaminación de los alimentos por toxinas producidas por *Fusarium* principalmente por la micotoxina que afecta en primer lugar a personas inmunocomprometidos (Antonissen et al., 2014). Durante años este género fúngico ha recibido mucha atención por las afectaciones que trae en el sector agrícola al ocasionar grandes pérdidas económicas.

La especie más representativa del género es *F. oxysporum* ya que es la especie que provoca mayor destrucción económica debido a que afecta a más de 150 huéspedes vegetales como el tomate, plátano, repollo, algodón, sandía, melón, cebolla, guisante, flores, etc. (Dean et al., 2012; Michielse y Rep, 2009).

La principal infección en las plantas ocasionados por *Fusarium* es el marchitamiento vascular; este hongo puede invadir las plantas a través de las semillas, heridas y raíces, sobre todo si las células del borde de las raíces están dañadas. Lo primero que ocurre es el reconocimiento de la raíz, posterior a ello, la unión a la corteza de la raíz hasta llegar al tejido vascular, seguido de invadir la xilema con su micelio, las

hifas proliferan y comienza la producción de microconidios, parte de la patogenia de *Fusarium* se debe a los metabolitos tóxicos(Khan et al., 2018; Pietro et al., 2003).

Entre las alternativas con mayor eficacia para combatir a este fitopatógeno fúngico es el uso de microorganismos como agentes de control biológico, sobre todo bacterias que se encuentren asociadas a plantas siendo el género que ha sido mayormente investigado ha sido *Bacillus* (Khan, 2018). Como se ha mencionado anteriormente *Bacillus* presenta una gran diversidad de propiedades antifúngicas como la producción de lipopéptidos y policétidos antibióticos, como la producción de las enzimas quitinasas, proteasas y celulasas capaces de causar la lisis de la pared celular de *Fusarium*, razones por las cuales la actividad de biocontrol en *Bacillus* ha sido ampliamente documentada.

1. Objetivos e hipótesis

3.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica de cepas de *Bacillus* sp. Aislada de *Prosopis laevigata* como agentes de control biológico frente a *Fusarium oxysporum*.

3.2 Objetivos específicos:

1. Evaluar *in vitro* el efecto antifúngico de cepas de *Bacillus* sp. contra *Fusarium oxysporum* por medio de ensayos de cultivo dual.
2. Evaluar la expresión de enzimas hidrolíticas (proteasas, quitinasas, amilasas y celulasas) a través de la visualización de halos de hidrólisis.
3. Identificar la presencia de péptidos de bajo peso molecular en cepas de *Bacillus* sp. con actividad antifúngica por medio de PCR.

4. Determinar el potencial de biocontrol de cepas de *Bacillus* sp. en el proceso de germinación de semillas de *Solanum lycopersicum* frente a *Fusarium oxysporum*.

3.3 Hipótesis

Si las especies de *Bacillus* aisladas de nódulos radiculares de *Prosopis laevigata* presentan lipopéptidos, policétidos y enzimas hidrolíticas con actividades antifúngicas, entonces son una alternativa como agentes de control biológico.

2. Material y métodos

4.1 Material biológico

Se seleccionaron 35 cepas bacterianas identificadas como integrantes del género *Bacillus* de la colección del laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (Tabla 1), las cuales provienen del interior de nódulos de *Prosopis laevigata*, pertenecientes a una zona semiárida contaminada con metales pesados en la región de Chietla, Puebla, México (Ramírez et al., 2019). Como cepa control se utilizó *E. coli* BL21DE3, además de 3 cepas no tolerantes a cromo LEM1061, LEM1031 y LEM1065, todas las cepas bacterianas estaban conservadas en glicerol al 20% (v/v) a -80°C.

Para la evaluación de efecto antifúngico, se utilizó el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* proveniente de la colección de cultivos fúngicos del Centro de Agroecología (CENAGRO) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, aislado de la raíz de planta de jitomate en invernaderos de Tetela de Ocampo, Puebla.

Cepa	Especie
LEM1001	<i>Bacillus</i> sp.
LEM1003	<i>Bacillus</i> sp.
LEM1004	<i>Bacillus</i> sp.

LEM1005	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1012	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1013	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1014	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1017	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1020	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1022	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1025	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1026	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1029	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1037	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1041	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1043	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1044	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1045	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1046	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1054	<i>Bacillus velezensis</i>
LEM1056	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1057	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1058	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1060	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1062	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1066	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1069	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1072	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1079	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1080	<i>Bacillus inaquosus</i>
LEM1083	<i>Bacillus subtilis</i>
LEM1085	<i>Bacillus inaquosus</i>
LEM1086	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1087	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1088	<i>Bacillus cereus</i>
LEM1031	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1061	<i>Bacillus sp.</i>
LEM1065	<i>Bacillus sp.</i>
BL21DE3	<i>E. coli</i>
	<i>Fusarium oxysporum</i>

Tabla 1. Bacterias y hongos utilizados en el trabajo de investigación

4.2 Condiciones de cultivo

4.2.1 Cultivo en medio sólido

Para su crecimiento en medio sólido se colocaron 100 µl de cada una de las cepas bacterianas y se sembraron por estría cruzada en placas de agar extracto de levadura-manitol (YMA modificado) (Anexo 1), estos se incubaron a 37°C por 48 horas.

4.2.2 Cultivo en medio líquido

Para el crecimiento en medio líquido se preparó caldo YM (Modificado) Anexo 1 y se colocaron 5 ml de este caldo en tubos falcón de 50ml. En cada tubo se colocó una colonia bacteriana de cada una de las cepas crecidas en medios de YMA y se incubaron a 37 °C con agitación a 110 rpm durante 96 horas.

4.3 Ensayos de hidrolasas

4.3.1 Evaluación de la expresión de proteasas

Para determinar la actividad proteolítica en las cepas del género *Bacillus* se preparó Agar leche a partir de 24 ml/l de leche descremada y 14 g/l de agar. A partir de la suspensión de células libres en el caldo YM modificado, se tomó con un asa bacteriológica una muestra del caldo, y se sembró por inoculación primaria de extremo a extremo de la caja Petri. Se realizaron triplicados para cada una de las cepas que se incubaron por 48 horas a 37°C. Se utilizaron como cepas control negativos a *E. coli* BL21DE3 y las cepas no tolerantes a cromo.

Para las cepas que dieron positivas se hicieron repeticiones por triplicado nuevamente, en esta ocasión, se colocaron 200 ml/l de leche descremada para que el halo proteolítico sea más visible. Para tal efecto, se tomó una colonia de los medios sólidos y se sembró utilizando la misma técnica, descrita en el párrafo anterior. Las placas se incubaron a 37°C por 48 horas.

4.3.2 Evaluación de la expresión de celulasas

Para observar la actividad de celulasas en las cepas del género *Bacillus* se preparó agar con carboximetil celulosa (Anexo 1).

Del medio de crecimiento sólido de cada una de las cepas que dieron positivo a proteasas (ensayo descrito anteriormente), además de las cepas control negativo *E. coli* BL21DE3 y cepa LEM1061, se tomó una colonia y se sembró por medio de una sola asada de extremo a extremo a través de toda la caja Petri, esto se realizó por triplicado y se incubaron por 48 horas a 37 °C.

4.3.3 Evaluación de la expresión de amilasas

Para conocer la actividad de amilasas en las cepas del género *Bacillus* se preparó agar almidón (Anexo 1).

Del medio de crecimiento sólido de cada una de las cepas que dieron positivo a proteasas, además de las cepas control *E. coli* BL21DE3 y la cepa LEM1061; se tomó una colonia y se sembró por medio una sola asada de extremo a extremo a través de toda la caja Petri, esto se realizó por triplicado y se incubaron por 48 horas a 37 °C.

Para las cepas que dieron positivas se hicieron repeticiones por duplicado nuevamente.

4.3.4 Evaluación de la expresión de quitinasas

Para la evaluación de la actividad de quitinasas en las cepas del género *Bacillus* se preparó medio de crecimiento de quitina coloidal, que fue preparada al disolver 40 g de quitina en 400 ml de HCl concentrado en agitación constante por 50 min. Pasado el tiempo se añadieron 2 L de agua destilada fría y se mantuvo en agitación durante 24 horas. Posteriormente se procedió a eliminar el ácido, para lo cual se efectuaron sucesivos lavados con agua destilada.

El medio de cultivo se preparó a partir agar-quitina (Anexo 1). Del medio de crecimiento sólido de cada una de las cepas que dieron positivo a proteasas, además de las cepas control *E. coli* BL21DE3 y la cepa LEM1061; se tomó una colonia y se sembró de extremo a extremo a través de toda la caja Petri, esto se realizó por triplicado y se inocularon por 48 horas a 37 °C.

4.4 Evaluación del efecto de antifúngico de cepas del género *Bacillus* contra *Fusarium oxysporum* por medio de ensayos de cultivo dual

Para el crecimiento de *F. oxysporum* se obtuvo una muestra de la colección del laboratorio, 0.5 cm³ de cultivo del medio sólido de *F. oxysporum* y se colocó en caldo YM, este se incubó por 48 horas a 37°C con agitación a 110 rpm.

Para el cultivo dual, se realizaron 4 diferentes ensayos usando las cepas de *Bacillus* que fueron positivas a la expresión de proteasas: el ensayo “A” (Figura 1) consistió en colocar 10 µl del caldo de *F. oxysporum* en uno de los extremos de una placa de medio YMA mientras que en el extremo contrario se colocó una colonia previamente crecida en los medios sólidos YMA de las cepas de *Bacillus* la cual se sembró con la técnica de inoculación primaria de manera horizontal al hongo fitopatógeno y se incubaron por 7 y 14 días a 37°C, esto se realizó por triplicado. Para el control positivo solo se colocaron los 10 µl del caldo de *F. oxysporum* sin ninguna cepa de *Bacillus*.

En el ensayo “B” (Figura 1) se colocó 5 µl del caldo de *F. oxysporum* en ambos extremos y en el centro se sembró una sola asada a través de toda la caja Petri de las cepas seleccionadas, se incubaron 7 días a 37°C, esto se realizó por triplicado.

De acuerdo con los resultados de los ensayos de cultivo dual descritos anteriormente se procedió con la realización del tercer y cuarto ensayo.

Para el ensayo “C” (Figura 1) se sembró de manera inversa al segundo ensayo, es decir, se sembraron dos asadas de las cepas de *Bacillus* en los extremos de la caja Petri y se colocaron 4 µl del caldo de *F. oxysporum* en el centro de la caja, esto se

realizó por triplicado, se incubaron a 37°C y se estuvieron revisando a los 4, 11 y 22 días.

Finalmente, el ensayo “D” (Figura 1) consistió en colocar 4 asadas de las cepas de *Bacillus*, formando un cerco a *F. oxysporum* del cual se colocaron 4 µl en el centro de la caja Petri, de igual manera, se incubaron a 37°C y se revisaron a los 4, 11 y 22 días.

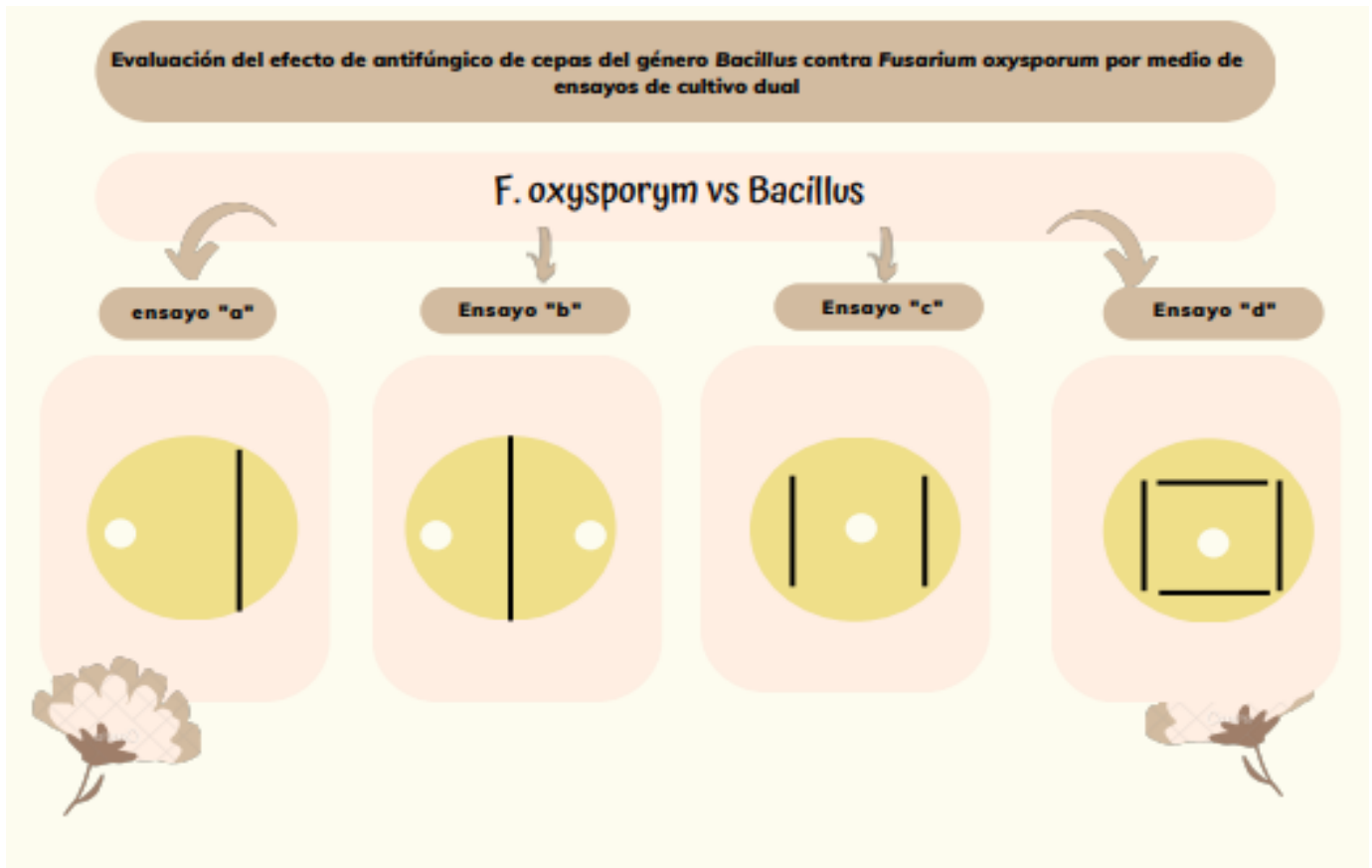


Figura 1. Esquema de los ensayos de cultivo dual de *F. oxysporum* vs *Bacillus*

4.5 PCR

Se utilizó como referencia a los genes detectados en *B. subtilis* por Hazarika, et al., (2019), las secuencias de dichos genes fueron obtenidas del mismo trabajo (Tabla 2). Para esta PCR se seleccionaron los genes *srfA* para surfactina y *mInA* para macrolactina.

La reacción de PCR se realizó utilizando DreamTaq Green PCR Máster Mix (2X) en un volumen de 50 µl, para la cepa de *Bacillus* que presentó inhibición en el ensayo de cultivo dual (LEM1054), además de las cepas control negativo *E. coli* y LEM1061.

La condición de PCR fue: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 min; seguido de 34 ciclos que comprendían desnaturalización a 95°C por 30 s, recocido de cebador a 59°C por 30 s, extensión de cebador a 72°C por 1 min y finalmente extensión a 72°C por 5 min.

Los productos amplificados obtenidos se analizaron en un gel de agarosa al 1.5% con 10 µl bromuro de etidio a 55V por 3 horas, posteriormente se procedió a su visualización bajo luz ultravioleta.

Cebador	Secuencia (5'-3')	Temperatura de recocido utilizada (°C)	Tamaño aproximado del producto (pares de bases)
SrfA-F	GCTGATGATGAGGAGAGCTATG	55	890
SrfA-R	GATGGTCGATACGTCCGATAAA		
MInA-F	GGCAGGGTCATACCTCATAATC	55	920
MInA-R	AGCAGACTTTCCGGTCTCATT		

Tabla 2. Secuencias de cebadores utilizadas para la amplificación de genes biosintéticas de metabolitos secundarios

4.6 Determinación de la promoción de la germinación de *Bacillus velezensis*

Se utilizaron semillas de jitomate (*Solanum lycopersicum*) para estudiar el potencial de biocontrol durante la germinación de la cepa que presentó inhibición en el ensayo dual (LEM1054) y las cepas control negativo *E. coli* BL21DE3 y la cepa LEM1061.

Para este estudio se formaron tres grupos experimentales, el grupo 1 consistió en semillas tratadas tanto con *Bacillus* como con *F. oxysporum*, el grupo 2 de semillas solo tratadas con *Bacillus*, pero sin *F. oxysporum*, finalmente el grupo 3, de semillas que no fueron tratadas ni con *Bacillus* ni tampoco con *F. oxysporum*.

Para la preparación de la solución bacteriana se colocó una colonia de cada una de las cepas seleccionadas en 10 ml de caldo YM en tubos falcón, durante 72 horas a 37 °C con agitación a 110 rpm. En otro tubo, se colocó 10 ml de caldo YM con *F. oxysporum*.

Después de las 72 horas se procedió a centrifugar los tubos que contenían la colonia bacteriana durante 5 min a 1350 rpm, tras la centrifugación se extrajo el líquido sobrenadante, el tubo se aforó a 10 ml de NaCl a 0.85% y se colocaron en vortex por 30 s.

Posterior a eso, se colocaron 10 semillas en cada tubo y se mantuvieron en la solución bacteriana durante 24 horas.

Pasado ese tiempo, a cada tubo se le colocó 0.1 µl del caldo con la suspensión de esporas de *F. oxysporum* con una concentración inicial de $\sim 10^6$ esporas/ 10 µl, durante 30 min a 37°C con agitación a 110 rpm, para finalmente colocar las 10 semillas de cada uno de los tubos en placas Petri con agar agua durante 72 horas a 37°C, para posteriormente determinar el porcentaje de germinación.

4.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos del porcentaje de germinación fueron sometidos a un análisis de varianza ANOVA en Microsoft Excel y se consideró significativo $p \leq 0,05$.

3. Resultados

5.1 Ensayos de hidrolasas

Se determinó la actividad proteolítica de las cepas y la expresión de otras enzimas importantes con efecto antifúngico como quitinasas, celulasas y amilasas en las cepas del género *Bacillus* de la colección bacteriana del laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

5.1.1 Evaluación de la expresión de proteasas

Se tomaron como cepas positivas a proteasas, aquellas en las que se presentó la visualización de un halo proteolítico. De las 35 cepas solo 11 fueron positivas (Tabla 3). Se eligió a la cepa LEM1061 que no pertenece al género *Bacillus* como control negativo, junto con la cepa *E. coli* BL21DE3, que tampoco presento halo proteolítico. En la figura 2 se pueden observar las cepas control negativo LEM1061 y *E. coli* BL21DE3, las cepas LEM1026 y LEM1069 que no presentaron halo proteolítico y las 11 cepas positivas a proteasas.

LEM1001
LEM1004
LEM1012
LEM1013
LEM1014
LEM1054
LEM1056
LEM1058
LEM1066
LEM1083
LEM1088

Tabla 3. Cepas de *Bacillus* positivas a la actividad proteolítica

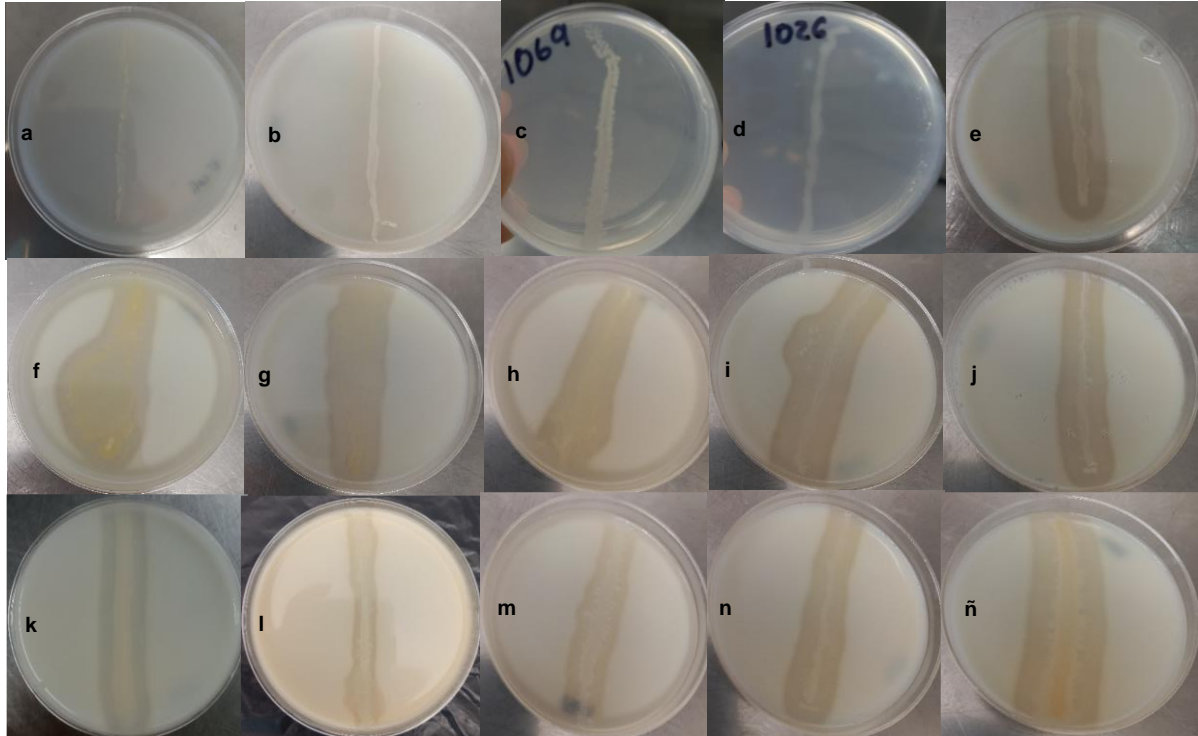


Figura 2. Ensayo de expresión de proteasas en agar leche. Inoculadas a 37°C por 48 horas. La actividad de proteasas positivas o negativas se observa mediante la presencia de un halo proteolítico alrededor de la colonia. **a)** cepa control negativo *E. coli* BL21DE3, actividad de proteasas negativa. **b)** cepa control LEM1061, actividad de proteasas negativa. **c)** cepa LEM1069, actividad de proteasas negativa. **d)** cepa LEM1026, actividad de proteasas negativa. **e)** cepa LEM1012, actividad de proteasas positiva. **f)** cepa LEM1001, actividad de proteasas positiva. **g)** cepa LEM1004, actividad de proteasas positiva. **h)** cepa LEM1013, actividad de proteasas positiva. **i)** cepa LEM1058, actividad de proteasas positiva. **j)** cepa LEM1066, actividad de proteasas positiva. **k)** cepa LEM1014, actividad de proteasas positiva. **l)** cepa LEM1054, actividad de proteasas positiva. **m)** cepa LEM1083, actividad de proteasas positiva. **n)** cepa LEM1056, actividad de proteasas positiva. **o)** cepa LEM1088, actividad de proteasas positiva.

5.1.2 Evaluación de la expresión de celulasas

Se tomaron como cepas positivas a celulasas, aquellas en las que se presentó la visualización de un halo de hidrólisis. Las cepas seleccionadas fueron aquellas que dieron positivo a proteasas (Tabla 3). En el ensayo de expresión de celulasas ninguna cepa presentó halo de inhibición, por lo que las 11 cepas fueron negativas a la expresión de celulasas al igual que las cepas utilizadas como control LEM1061 y *E. coli* BL21DE3.

5.1.3 Evaluación de la expresión de amilasas

Las cepas que presentaron halos de hidrólisis fueron consideradas como positivas a amilasas. Para este ensayo fueron seleccionadas las cepas que dieron positivo a proteasas y únicamente la cepa LEM1054 fue positiva, el resultado de este ensayo se puede observar en la figura 3.

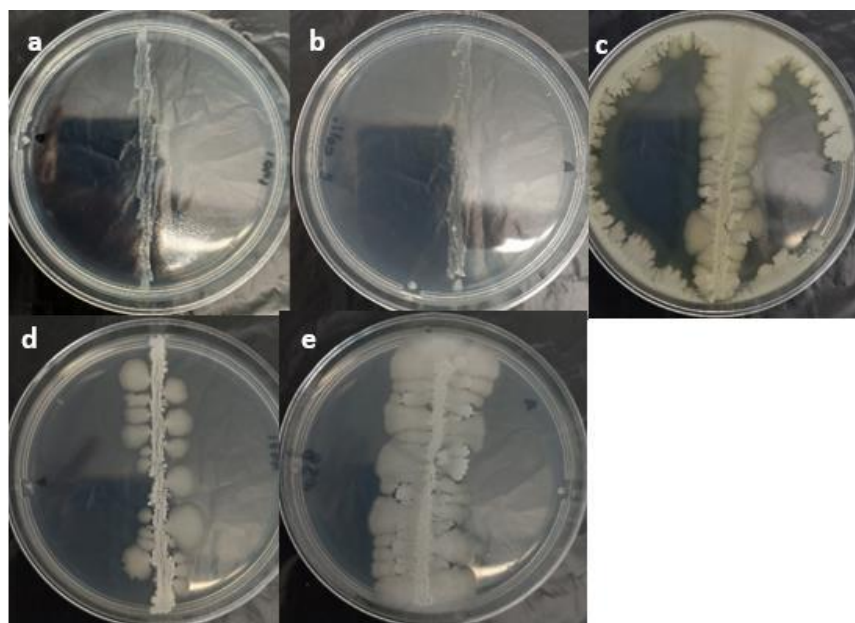


Figura 3. Ensayo de expresión de amilasas. Incubadas a 37°C por 48 horas. La actividad de amilasas positivas o negativas se observa mediante la presencia de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia. **a)** cepa control negativo LEM1061, actividad de amilasas negativa. **b)** cepa control negativo *E. coli* BL21DE3, actividad de amilasas negativa. **c)** cepa LEM1054, actividad de amilasas positiva. **d)** cepa LEM1066, actividad de amilasas negativa. **e)** cepa LEM1058, actividad de amilasas negativa.

5.1.4 Evaluación de la expresión de quitinasas

Fueron consideradas como cepas positivas aquellas en la que se visualizó un halo de hidrólisis. Al igual que en los ensayos anteriores de hidrolasas las cepas seleccionadas fueron las 11 que dieron positivo a proteasas (Tabla 3), así mismo, ninguna presentó halo de hidrólisis (Figura 4), así como las cepas LEM1061 y *E. coli* BL21DE3 utilizadas como control negativo.

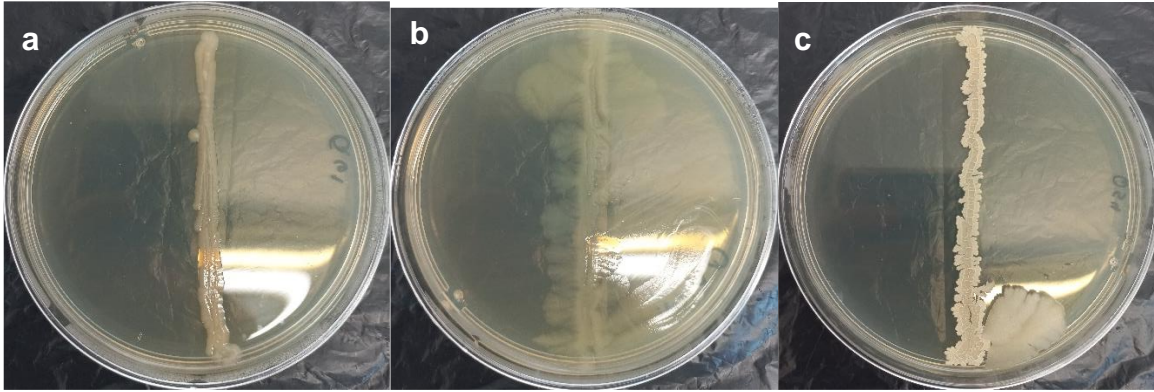


Figura 4. Ensayo de expresión de quitinasas. Incubadas a 37°C por 48 horas. La actividad de quitinasas positivas o negativas se observa mediante la presencia de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia. **a)** cepa control negativo LEM1061, actividad de quitinasas negativa. **b)** cepa control negativo *E. coli* BL21DE3, actividad de quitinasas negativa. **c)** cepa LEM1054, actividad de quitinasas negativa.

5.2 Evaluación del efecto de antifúngico de cepas del género *Bacillus* contra *Fusarium oxysporum* por medio de ensayos de cultivo dual

Del ensayo "A" realizado de cultivo dual a las cepas positivas a proteasas (Tabla 3), fueron las cepas LEM1058 y LEM1054; las que presentaron inhibición, en donde podemos considerarlas como cepas positivas* hasta el día 14.

*(Se consideraron positivas solo aquellas cepas en las que *F. oxysporum* no toco a *Bacillus*)

Para el día 7 (Figura 5), no se presentan un gran crecimiento como para poder definir la inhibición de *Bacillus* frente a *F. oxysporum* en ninguna de las cepas.

Pasado los 14 días (Figura 6), se observa la inhibición de las cepas LEM1058 y LEM1054 frente al hongo fitopatógeno a través de metabolitos secundarios como lipopéptidos e hidrolasas con capacidades antifúngicas. En cambio, las cepas LEM1001, LEM1004, LEM1012, LEM1013, LEM1014, LEM1056, LEM1066, LEM1083 y LEM1088 no presentaron inhibición frente a *F. oxysporum*, lo que quiere decir, que estas cepas de *Bacillus* tocaron al hongo e incluso crecieron por encima de estas.

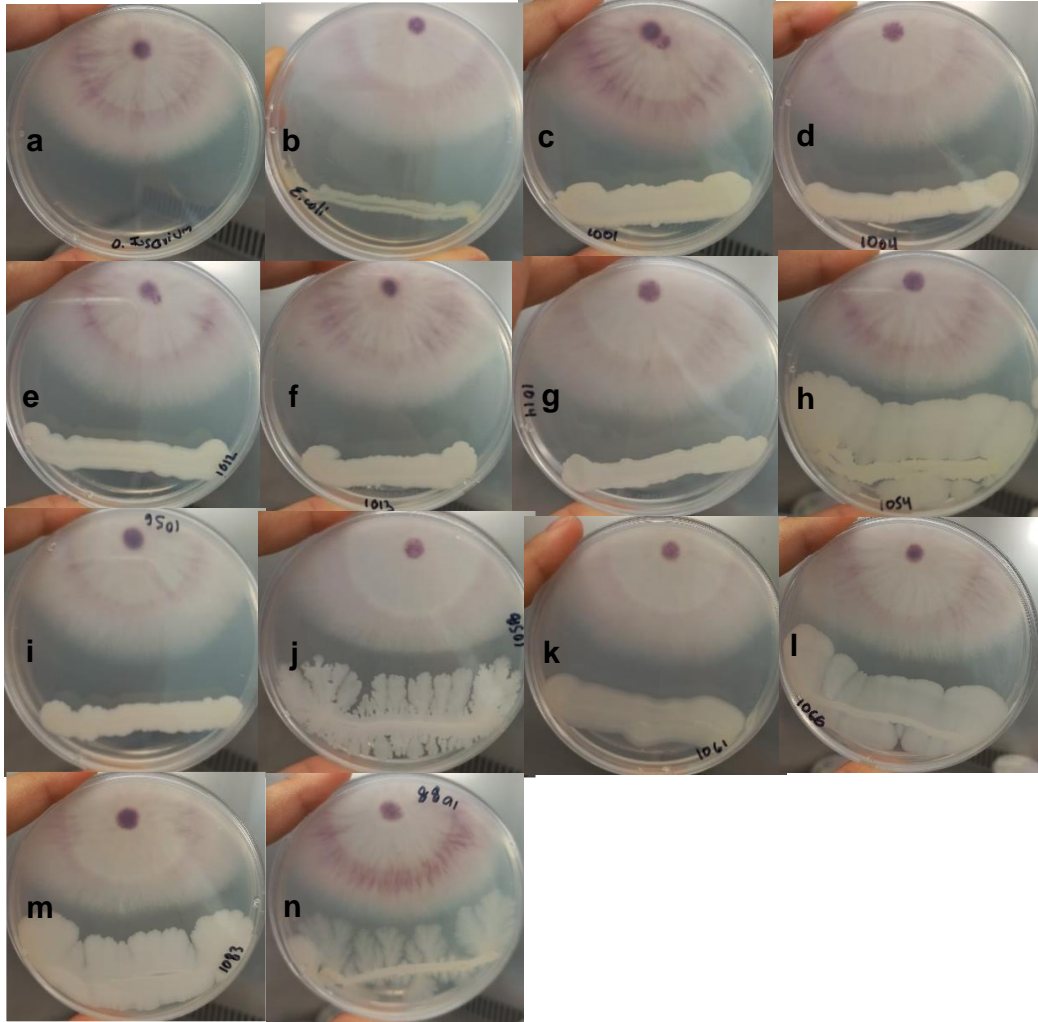


Figura 5. Ensayo "A". Cultivo dual en medio YMA que muestra la inhibición de cepas de *Bacillus* frente a *F. oxysporum* a través de metabolitos secundarios como lipopéptidos e hidrolasas con capacidades antifúngicas. En uno extremos se encuentra *F. oxysporum* mientras que en el extremo contrario está presente de manera horizontal al hongo fitopatógeno una sola asada de las cepas de *Bacillus*, a los 7 días de su incubación, pero ninguna de las cepas había crecido lo suficiente para que se observara inhibición. **a)** cepa control positivo *F. oxysporum*. **b)** cultivo dual de *E. coli* BL21DE3 frente a *F. oxysporum*. **c)** cultivo dual de la cepa LEM1001 frente a *F. oxysporum*. **d)** cultivo dual de la cepa LEM1004 frente a *F. oxysporum*. **e)** cultivo dual de la cepa LEM1012 frente a *F. oxysporum*. **f)** cultivo dual de la cepa LEM1013 frente a *F. oxysporum*. **g)** cultivo dual de la cepa LEM1014 frente a *F. oxysporum*. **h)** cultivo dual de la cepa LEM1054 frente a *F. oxysporum*. **i)** cultivo dual de la cepa LEM1056 frente a *F. oxysporum*. **j)** cultivo dual de la cepa LEM1058 frente a *F. oxysporum*. **k)** cultivo dual de la cepa LEM1061 frente a *F. oxysporum*. **l)** cultivo dual de la cepa LEM1066 frente a *F. oxysporum*. **m)** cultivo dual de la cepa LEM1083 frente a *F. oxysporum*. **n)** cultivo dual de la cepa LEM1088 frente a *F. oxysporum*.

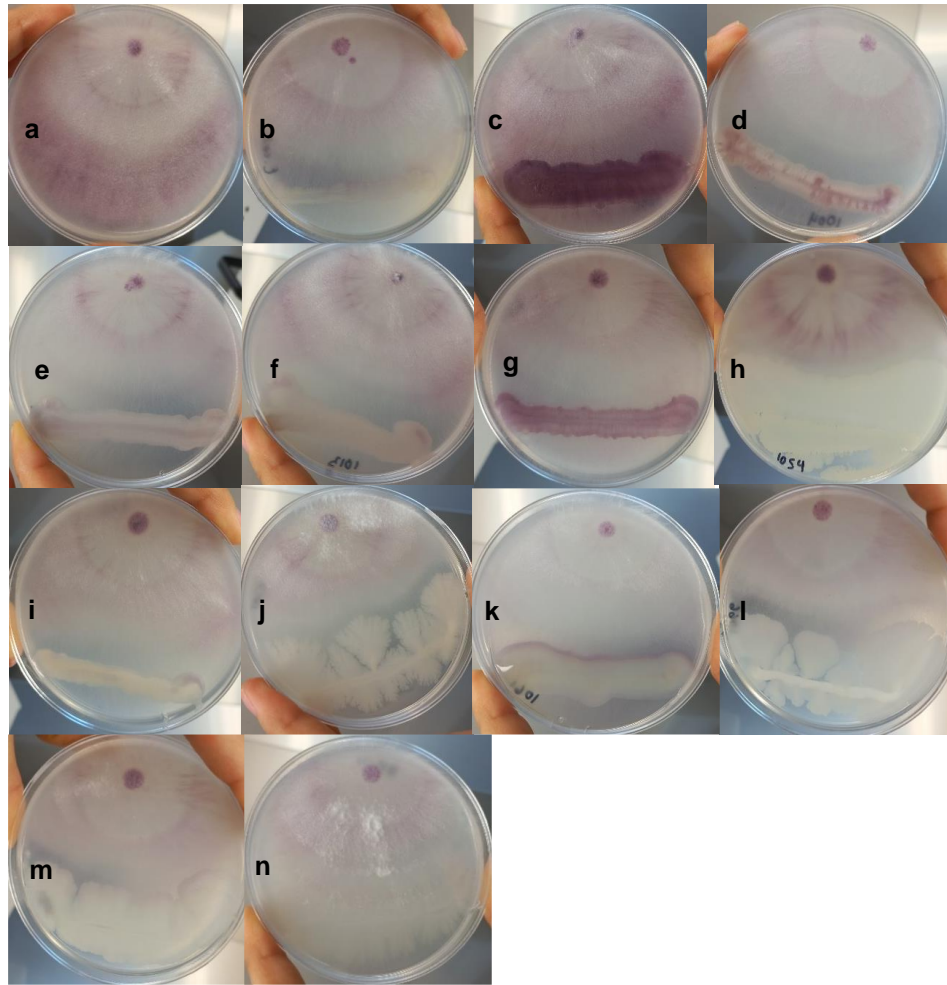


Figura 6. Ensayo "A". Cultivo dual en medio YMA que muestra la inhibición de cepas de *Bacillus* frente a *F. oxysporum* a través de metabolitos secundarios como lipopéptidos e hidrolasas con capacidades antifúngicas. En uno extremos se encuentra *F. oxysporum* mientras que en el extremo contrario está presente de manera horizontal al hongo fitopatógeno una sola asada de las cepas de *Bacillus*, a los 14 días de su incubación, en el que solo las cepas LEM1058 y LEM1054 mostraron inhibición, contrario al resto de las cepas de *Bacillus* y las cepas control. **a)** cepa control positivo *F. oxysporum*. **b)** cultivo dual de *E. coli* BL21DE3 frente a *F. oxysporum*. **c)** cultivo dual de la cepa LEM1001 frente a *F. oxysporum*. **d)** cultivo dual de la cepa LEM1004 frente a *F. oxysporum*. **e)** cultivo dual de la cepa LEM1012 frente a *F. oxysporum*. **f)** cultivo dual de la cepa LEM1013 frente a *F. oxysporum*. **g)** cultivo dual de la cepa LEM1014 frente a *F. oxysporum*. **h)** cultivo dual de la cepa LEM1054 frente a *F. oxysporum*, inhibición positiva. **i)** cultivo dual de la cepa LEM1056 frente a *F. oxysporum*. **j)** cultivo dual de la cepa LEM1058 frente a *F. oxysporum*, inhibición positiva. **k)** cultivo dual de la cepa LEM1061 frente a *F. oxysporum*. **l)** cultivo dual de la cepa LEM1066 frente a *F. oxysporum*. **m)** cultivo dual de la cepa LEM1083 frente a *F. oxysporum*. **n)** cultivo dual de la cepa LEM1088 frente a *F. oxysporum*.

En el ensayo "B" de todas las cepas con actividad positiva a proteasa (Tabla 3), se mostraron los mismos resultados para las cepas LEM1058 y LEM1054 para el día 7 (Figura 7), en ambas cepas, se presentó inhibición de las cepas *Bacillus* frente a

F. oxysporum. Mientras que el resto de las cepas de *Bacillus*, al igual que las cepas control negativo *E. coli* BL21DE3, LEM1061 y la cepa control positivo *F. oxysporum*, no presentaron inhibición a los 7 días de crecimiento.

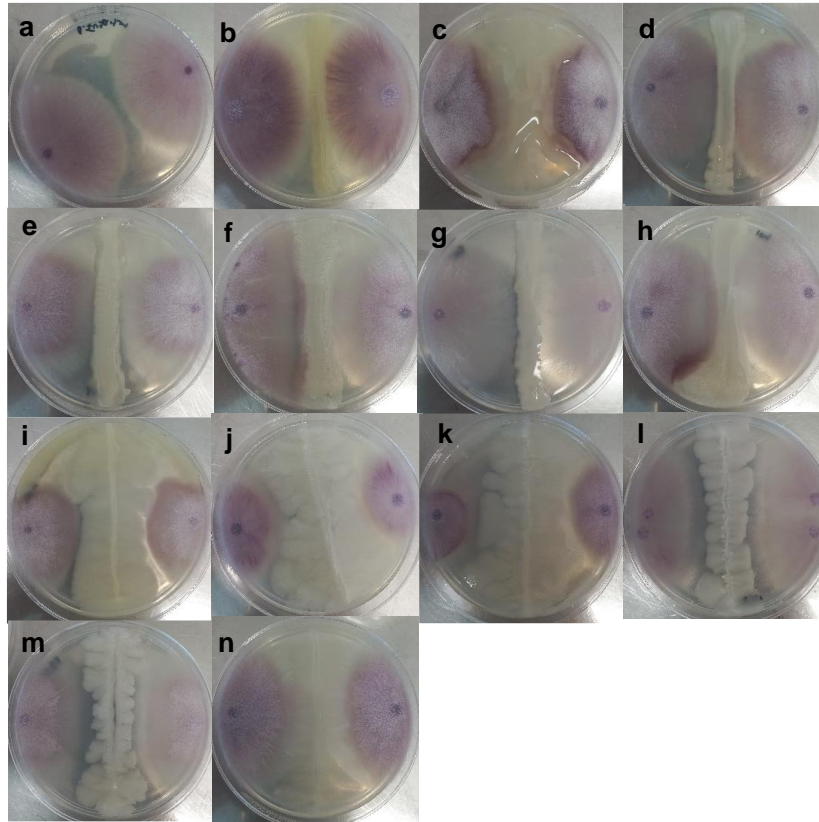


Figura 7. Ensayo “B”. Cultivo dual en medio YMA que muestra la inhibición de cepas de *Bacillus* frente a *F. oxysporum* a través de metabolitos secundarios con capacidades antifúngicas. En ambos extremos se encuentra *F. oxysporum* mientras que en el centro que encuentra una sola asada de las cepas de *Bacillus*, que se inocularon durante 7 días. Las letras **a**, **b** y **c** fueron las cepas control; **i** y **k** son las cepas que, si presentaron inhibición, mientras que **d**, **e**, **f**, **g**, **h**, **j**, **m** y **n** son las cepas de *Bacillus* que no presentaron inhibición. **a**) cepa control positivo *F. oxysporum*. **b**) cultivo dual sin inhibición de *E. coli* BL21DE3 frente a *F. oxysporum*. **c**) cultivo dual sin inhibición de la cepa LEM1061 frente a *F. oxysporum*. **d**) cultivo dual sin inhibición de la cepa LEM1001 frente a *F. oxysporum*. **e**) cultivo dual sin inhibición de la cepa LEM1004 frente a *F. oxysporum*. **f**) cultivo dual sin inhibición de la cepa LEM1012 frente a *F. oxysporum*. **g**) cultivo dual sin inhibición de la cepa LEM1013 frente a *F. oxysporum*. **h**) cultivo dual sin inhibición de la cepa LEM1014 frente a *F. oxysporum* **i**) cultivo dual con inhibición de la cepa LEM1054 frente a *F. oxysporum*. **j**) cultivo dual sin inhibición de la cepa LEM1056 frente a *F. oxysporum*. **k**) cultivo dual con inhibición de la cepa LEM1058 frente a *F. oxysporum*. **l**) cultivo dual sin inhibición de la cepa LEM1066 frente a *F. oxysporum*. **m**) cultivo dual sin inhibición de la cepa LEM1083 frente a *F. oxysporum*. **n**) cultivo dual sin inhibición de la cepa LEM1088 frente a *F. oxysporum*.

El ensayo “C” y “D” se les realizo a las cepas que presentaron inhibición del ensayo “A” y “B”, los cuales fueron las cepas LEM1058 y LEM1054. En el ensayo “C” para

el día 4 todas las cepas incluyendo las cepas controles no han crecido lo suficiente. En el día 11 ya se presenta inhibición en las cepas LEM1054 y LEM1058 frente a *F. oxysporum*. Mientras que en las cepas controles *F. oxysporum* ya se encuentra creciendo por encima de estas. Para el día 22 la única cepa que presenta inhibición es la cepa LEM1054 (Figura 8).

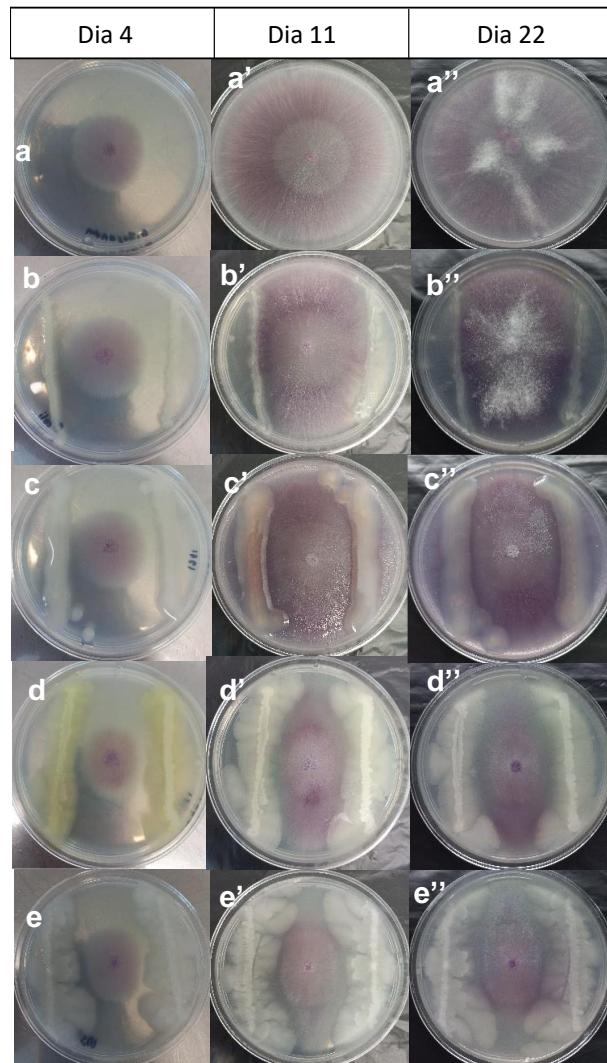


Figura 8. Ensayo "C". Cultivo dual en medio YMA que muestra la inhibición de cepas de *Bacillus* frente a *F. oxysporum* a través de metabolitos secundarios como lipopéptidos e hidrolasas con capacidades antifúngicas. A los 4, 11 y 22 días después de su crecimiento. En ambos extremos se encuentra una sola asada de una colonia de cada una de las cepas de *Bacillus*, mientras que en centro se encuentra 4 µl del caldo de *F. oxysporum*. Las letras **a**, **b**, **c**, **d**, **e** y **f** son a los 4 días, **a'**, **b'**, **c'**, **d'**, **e'** y **f'** son a los 11 días, mientras que **a''**, **b''**, **c''**, **d''**, **e''** y **f''** son a los 22 días. Para el día 4 ninguna de las cepas ha crecido lo suficiente para presentar inhibición, mientras que para el día 11, solo las cepas LEM1054 y LEM1058 presentan inhibición, sin embargo, para el día 22 solo en la cepa LEM1054 se observa inhibición. **a**) cepa control positivo *F. oxysporum*. **a')** cepa control positivo *F. oxysporum*. **a'')** cepa control positivo *F. oxysporum*. **b**) cultivo dual de *E. coli* BL21DE3 frente a *F. oxysporum*. **b')** cultivo dual sin inhibición de *E. coli* BL21DE3 frente a *F. oxysporum*. **b'')** cultivo dual sin inhibición de *E. coli* BL21DE3 frente a *F. oxysporum*.

BL21DE3 frente a *F. oxysporum*. c) cultivo dual de la cepa control LEM1061 frente a *F. oxysporum*. c') cultivo dual sin inhibición de la cepa control LEM1061 frente a *F. oxysporum*. c'') cultivo dual sin inhibición de la cepa control LEM1061 frente a *F. oxysporum*. d) cultivo dual de la cepa LEM1054 frente a *F. oxysporum*. d') cultivo dual con inhibición de la cepa LEM1054 frente a *F. oxysporum*. d'') cultivo dual con inhibición de la cepa LEM1054 frente a *F. oxysporum*. e) cultivo dual de la cepa LEM1058 frente a *F. oxysporum*. e') cultivo dual con inhibición de la cepa LEM1058 frente a *F. oxysporum*. e'') cultivo dual sin inhibición de la cepa LEM1058 frente a *F. oxysporum*.

5.3 PCR

Los genes codificantes para las enzimas que catalizan la síntesis no ribosómica de los péptidos antibióticos en el genoma de las distintas cepas de *Bacillus*, se investigaron mediante PCR. Los resultados en la PCR plantean la presencia de los genes *srfA* para la síntesis de surfactina y *mlnA* para la síntesis de macrolactinas en la cepa LEM1054 (Figura 9).

Los productos amplificados fueron del tamaño mencionados en la tabla 2. Para *srfA* de un tamaño de 890 pb y para *mlnA* de 920 pb, mientras que los controles negativos *E. coli* BL21DE3 y LEM1061, no mostraron la presencia los genes anteriormente mencionados.

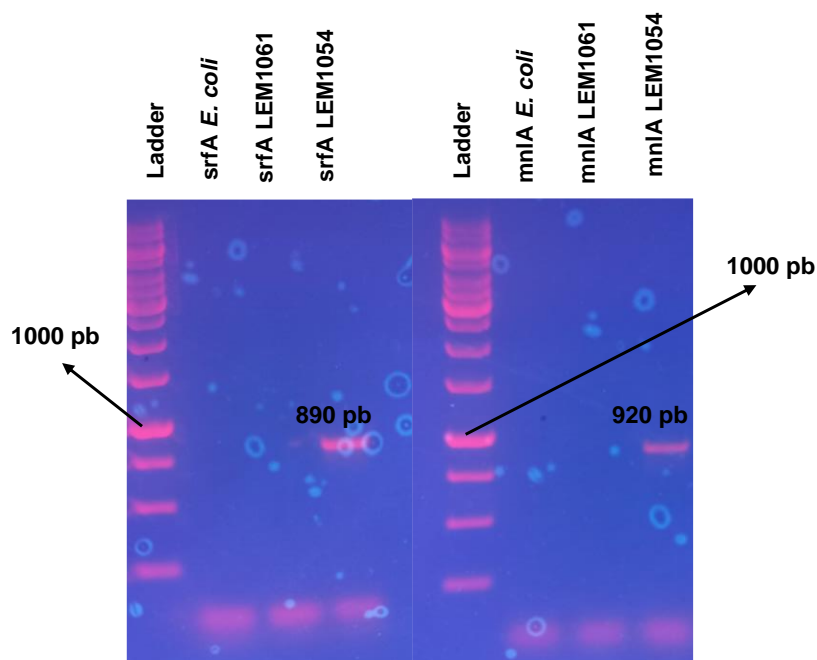


Figura 9. Productos amplificados por PCR de dos genes biosintéticos de metabolitos secundarios en gel de agarosa al 1.5%.

5.4 Determinación de la promoción de la germinación de *Bacillus velezensis*

El porcentaje de germinación en las semillas de *Solanum lycopersicum* en el grupo experimental control, es decir donde solo se encuentran las semillas de jitomate en condiciones normales, sin la presencia de *F. oxysporum* ni de *Bacillus* es de 90%. A diferencia de cuando se encuentra presente la cepa LEM1054 fue de 95%, mientras que cuando encontramos a la cepa LEM1054 en combinación con *F. oxysporum* es de 90%. Para las cepas control *E. coli* y LEM1061 en presencia de *F. oxysporum* el porcentaje de germinación fue de 90% y 80% respectivamente, mientras que sin la presencia del patógeno fúngico fue 100% en ambos grupos.

Sin embargo, los resultados de esta investigación no mostraron diferencia significativa ($p < 0.5$) entre los grupos experimentales en el porcentaje de germinación de las semillas de jitomate, tal como se observa en la Figura 10. Lo que quiere decir que ni las cepas *Bacillus* ni *Fusarium* o *E. coli*, influyen en la germinación de las semillas de *Solanum lycopersicum*.

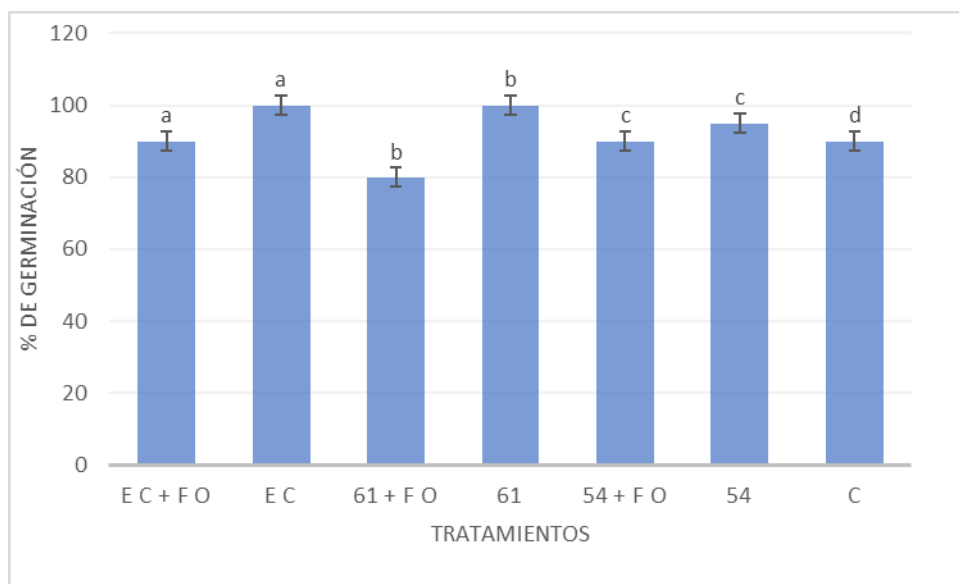


Figura 10. Potencial de control de cepas de *Bacillus* frente a *F. oxysporum* durante la germinación de semillas de jitomate. EC (*E. coli* BL21DE3), FO (*F. oxysporum*), 61 (LEM1061), 54 (LEM1054), C (grupo control, sin cepas de *Bacillus* ni el hongo fitopatígeno), sin diferencia significativa entre los grupos.

4. Discusión

El uso de pesticidas para combatir las plagas en la agricultura trae consigo una gran cantidad de problemas al ambiente como la contaminación de suelo y agua. Además, la acumulación de los residuos tóxicos representa un riesgo para la salud al entrar en contacto con los alimentos e ingerirlos, asimismo del peligro que representa para los trabajadores en el campo al utilizarlos y aquellos que están expuestos desde la fabricación de estos (Damalas y Eleftherohorinos, 2011). Una de las preocupaciones en la actualidad es la resistencia que pueden generar los patógenos poco después de la aplicación de los pesticidas (Hawkins et al., 2018).

Por tal motivo, se han buscado alternativas para sustituir o disminuir el uso de pesticidas siendo la de mayor interés el uso de agentes de control biológico.

En los últimos años la atención se ha centrado en el uso de microorganismos como agentes de control biológico contra patógenos, debido a la actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios que pueden producir. Entre los organismos mayormente utilizados como agentes de control biológico esta *Bacillus* sp. que debido a sus características ha llamado la atención en la industria y se prefieren por su capacidad de producir endosporas que son resistentes a condiciones adversas en el ambiente y sobrevivir a la preparación de las formulaciones bacterianas (Chowdhury et al., 2013).

Una de los microorganismos fitopatógenos fúngicos de preocupación son las especies de *Fusarium*, principal causante del marchitamiento vascular que afecta a una gran variedad de cultivos, entre ellos del tomate que es el segundo vegetal comestible más importante económicamente.

Con los resultados de nuestro estudio, encontramos que en la colección del laboratorio de ecología microbiana y molecular una de las cepas con gran importancia para la industria es la LEM1054 perteneciente a *B. velezensis*.

Entre las cepas de *Bacillus* con actividad de proteasas, fueron positivas *B. velezensis*, *B. subtilis* y *B. cereus*, resultados que podemos comparar con el trabajo de Jiang et al. en 2019, en el que se identificó la cepa F21 de *B. velezensis* como

biocontrol de *Fusarium* en la producción de sandía por la producción proteasas, glucanasas y celulasas, pero no presenta actividad de quitinasas. Resultados similares a nuestro estudio, con la presencia de proteasas, sin la expresión de ninguna quitinasa; difiriendo únicamente en la expresión de celulasas, ya que la cepa LEM1054, fue negativa a la expresión de estas enzimas.

Otro ejemplo claro de la expresión de enzimas hidrolíticas en *Bacillus*, lo da Xu et al., en 2022, con la evaluación de *B. subtilis* YB-04 como agente de biocontrol contra el marchitamiento del pepino causado por *Fusarium* y con un análisis de su genoma, informaron que esta cepa secretaba proteasa extracelular, amilasa, celulosa y β -1,3-glucanasa, además de expresar genes para la biosíntesis de otros metabolitos secundarios con actividad antifúngica que en conjunto parecen ser un mecanismo eficaz para el control de *Fusarium*.

La actividad antifúngica de estas enzimas se debe a la composición estructural de la pared celular de los hongos, ya que esta está compuesta por quitina, glucano y glicoproteínas (Bowman y Free, 2006), compuestos que pueden ser hidrolizados por estas enzimas ocasionando la lisis y deformación de la pared celular, por lo tanto, se inhibe el crecimiento del micelio. Se ha mostrado la actividad en conjunto principalmente de proteasas, quitinasas y β -1,3-glucanas en cepas *B. velezensis* CE 100, mostrando una fuerte actividad antifúngica, inhibiendo la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio en *Colletotrichum gloeosporioides* (Choub et al., 2021). Con ello, podemos observar el amplio espectro de las enzimas hidrolíticas en distintos fitopatógenos fúngicos.

LEM1054, no mostró celulasas ni quitinasas, esta última, es la enzima que se encarga de hidrolizar la quitina, uno de los principales componentes de la pared celular fúngica. Resultados similares a los presentados por Hazarika, et al., (2019) en el que no se presentó actividad de quitinasas en el medio de agar quitina por *B. subtilis*.

Sin embargo, si expresó proteasas y amilasas; se ha demostrado la importancia de proteasas secretadas por *B. velezensis* en la lisis celular en oomicetos patógenos del género *Phytophthora* spp., por lo que se corrobora su participación en la

actividad antifúngica (Moon et al., 2021). Además se ha informado el papel de las proteasas producidas por *Bacillus* en distintas condiciones de crecimiento, confirmando el medio por el cual se eliminan los nutrientes por parte de *B. subtilis* en la pared celular, además el potencial de las proteasas al degradar las proteínas en la pared celular fúngica (Schönbichler et al., 2020).

En cuanto a las amilasas, en nuestros ensayos la única cepa que formó halos de hidrólisis fue la cepa LEM1054 (*B. velezensis*) reafirmamos que *Bacillus* puede hidrolizar almidón por acción de las amilasas. Al respecto, por ejemplo, Zhou et al., (2021) mencionan las múltiples características de *B. cereus* YN917 que promueven el crecimiento de las plantas y su actividad como agentes de control biológico frente a *Magnaporthe oryzae* por la producción de enzimas hidrolíticas como proteasas, β -1,3-glucanasa, además de amilasas.

Bacillus es considerado como un género con un gran potencial en la industria como biocontrol del patógeno *Fusarium* debido su actividad como antifúngico. Nuestros resultados muestran que las cepas LEM1058 y LEM1054 presentan un gran potencial de inhibición frente a *F. oxysporum* después del día 7, contrario a las cepas control, antes del día 7 no se puede observar un alto crecimiento de ambos microorganismos como para observar inhibición por parte de *Bacillus*. Después del día 22 la única con actividad antifúngica es LEM1054 (*B. velezensis*). Resultados similares a los encontrados por Karthika et al., 2020, en el que *B. cereus* KTMA4 mostro inhibición frente a *F. oxysporum* y *Alternaria solani*, patógenos de importancia en plagas del tomate, inhibiendo el crecimiento del micelio y no sobrecreciendo incluso después de los 7 días de incubación, relacionándolo así con la producción tardía de los metabolitos secundarios con actividad antifúngica en la última etapa de crecimiento (Swain et al., 2009).

Los resultados de la PCR mostraron que la cepa LEM1054 tiene los genes que codifican para las enzimas que catalizan la síntesis no ribosómica de los péptidos antibióticos surfactina y macrolactina. Con ello y junto a las proteasas y amilasas con las mismas propiedades que expresa *B. velezensis* LEM1054, es posible explicar la inhibición que presenta frente a *F. oxysporum*.

La macrolactina es un policétido que presenta actividades antibacterianas principalmente se han encontrado efectos en una gran cantidad de patógenos bacterianos gram positivos y multirresistente, entre los que destacan *S. aureus* (Romero-Tabarez et al., 2006).

Nuestros resultados muestran la presencia de genes *mnIA*, genes de gran importancia para la síntesis de macrolactinas. Existen estudios en los que se ha descrito la actividad antibiótica de las macrolactinas. Por ejemplo, un estudio realizado por Salazar et al. (2020), mostro la actividad antifúngica de *B. amyloliquefaciens* de las macrolactinas A y 7-O-Succinil macrolactina A frente a algunos importantes hongos fitopatógenos como *F. oxysporum*, *Moniliophthora roreri*, *F. proliferatum*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternata* y *Rhizoctonia sp.*, los resultados mostraron que 7-O-Succinil macrolactina A presenta un efecto inhibitor frente a todos los hongos, mientras la macrolactina A solo no mostro para *M. roreri* y *A. niger*.

Además de *mnIA*, la cepa LEM1054 también mostro la presencia de genes *srfA* de gran importancia para la síntesis del lipopéptido surfactina. Son muchos los estudios en los que se expone que la actividad antifúngica de *Bacillus* se debe a la presencia de lipopéptidos principalmente de la iturina y fengicina, antibióticos principales para la actividad antimicrobiana de *B. velezensis* frente a *F. oxysporum* (Cao et al., 2018). Mientras que la surfactina presenta menor actividad e incluso nula, tal como lo expone Gong et al. (2015) en el que la cepa S76-3 de *B. amyloliquefaciens* no mostro actividad antifúngica frente a *F. graminearum*.

Estos resultados difieren con lo informado por Tendulkar et al., (2007) en el que se identificó como el lipopéptido activo de *B. licheniformis* frente a *Magnaporthe grisea* a la surfactina, induciendo cambios morfológicos e inhibiendo el crecimiento del micelio.

Para poder explicar la actividad antifúngica de la surfactina en la cepa LEM1054, podemos decir que ocurre debido al efecto sinérgico (Zhao et al., 2014). Un ejemplo lo muestra Li et al., (2016) en *B. amyloliquefaciens* SYBC H47 capaz de producir bacilomicina, fengicina y surfactina. En el que la bacilomicina es el lipopéptido más

efectivo de los tres en la actividad antifúngica pero la mezcla de todos los lipopéptidos fue la que presentó un mayor potencial debido al efecto aditivo o sinérgico sobre la supresión de la germinación de conidios y la permeabilidad de la membrana celular en *Botryosphaeria dothidea*.

Los resultados del potencial de control de *B. velezensis* frente *F. oxysporum* durante la germinación, no fueron significativos en ninguno de los grupos experimentales, ni en el grupo en el que se encontraban solo las semillas de jitomate con la suspensión bacteriana de la cepa LEM1054. Resultados similares a los presentados por Wang et al. (2020), en el que semillas de *Nelumbo nucifera* fueron remojadas en una suspensión bacteriana de *B. velezensis*, pero los resultados no mostraron cambios significativos en la tasa de germinación de las semillas.

Lo informado en este ensayo difiere con lo expuesto por Hazarika et al., (2019) en el que el aislado bacteriano de *B. subtilis* logro inhibir la infección fúngica por *F. oxysporum* en la germinación de semillas de frijol mungo.

5. Conclusiones

Los resultados de este estudio establecen a la cepa LEM1054 (*B. velezensis*) con un alto potencial antifúngico por la producción de proteasas, amilasas, surfactina y macrolactina; componentes importantes con propiedades antifúngicas, por lo que queda abierta la posibilidad de su uso en la industria como agente de control biológico.

6. Bibliografía

- Aktar, M. W., Sengupta, D. y Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisciplinary toxicology*, 2(1), 1-12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Antonissen, G., Martel, A., Pasmans, F., Ducatelle, R., Verbrugghe, E., Vandebroucke, V., Li, S., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F, y Croubels, S. (2014). The impact of *Fusarium mycotoxins* on human and animal host susceptibility to infectious diseases. *Toxins (Basel)*, 6(2), 430-452. <https://doi.org/10.3390/toxins6020430>
- Arima, K., Kakinuma A. y Tamura, G. (1968). Surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 31(3), 488-94. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(68\)90503-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(68)90503-2)
- Bais, H. P., Fall, R. y Vivanco, J. M. (2004). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol*, 134(1), 307-319. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- Banerjee, G. y Ray, A. K. (2017). Impact of microbial proteases on biotechnological industries. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 33(2), 119-143. <https://doi.org/10.1080/02648725.2017.1408256>
- Behera, B. C., Sethi, B. K., Mishra, R. R., Dutta, S. K. y Thatoi, H. N. (2017). Microbial cellulases - Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review. *J Genet Eng Biotechnol*, 15(1), 197-210. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2016.12.001>
- Bhushan, B. (2000). Production and characterization of a thermostable chitinase from a new alkalophilic *Bacillus* sp. BG-11.. *J Appl Microbiol*, 88(5), 800-808. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01016.x>
- Bowman, S. M. y Free, S. J. (2006). The structure and synthesis of the fungal cell wall. *Bioessays*, 28(8), 799-808. <https://doi.org/10.1002/bies.20441>

- Cao, Y., Pi, H., Chandrangsu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J.D. y Cai, Y. (2018). Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Sci Rep*, 8(1), 4360. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>
- Carrillo, C., Teruel, J. A., Aranda, F. J. y Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim Biophys Acta*, 1611(1-2), 91-97. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(03\)00029-4](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(03)00029-4)
- Chang, C. J., Lee, C. C., Chan, Y. T., Trudeau, D. L., Wu, M. H., Tsai, C. H., Yu, S. M., Ho, T. H., Wang, A. H., Hsiao, C. D., Arnold, F. H. y Chao, Y. C. (2016). Exploring the Mechanism Responsible for Cellulase Thermostability by Structure-Guided Recombination. *PLoS One*, 11(3), e0147485. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147485>
- Chen, J., Liu, T., Wei, M., Zhu, Z., Liu, W. y Zhang, Z. (2019). Macrolactin a is the key antibacterial substance of *Bacillus amyloliquefaciens* D2WM against the pathogen *Dickeya chrysanthemi*. *Eur J Plant Pathol*, 155, 393–404. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01774-3>
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Schneider, K., Vater, J., Süssmuth, R., Piel, J. y Borriss, R. (2009). Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *J Biotechnol.* 140(1-2), 27-37. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2008.10.011>
- Choub, V., Ajuna, H. B., Won, S. J., Moon, J. H., Choi, S. I., Maung, C. E. H., Kim, C. W. y Ahn, Y. S. (2021). Antifungal Activity of *Bacillus velezensis* CE 100 against Anthracnose Disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) and Growth Promotion of Walnut (*Juglans regia* L.) Trees. *Int J Mol Sci.* 22(19), 10438. <https://doi.org/10.3390/ijms221910438>
- Chowdhury, S. P., Dietel, K., Rändler, M., Schmid, M., Junge, H., Borriss, R., Hartmann, A. y Grosch, R. (2013). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact

on the rhizosphere bacterial community. *PLoS One*, 8(7). e68818.
<https://doi.org/10.1038/srep12975>

- Cohn, F. (1872) Untersuchungen Über Bakterien. *Beitr Biol Pflanz*, 1, 127-224.
- Contesini, F. J., Melo, R. R. y Sato, H. H. (2018). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Crit Rev Biotechnol*, 38(3), 321-334.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>
- Da-Silva, R. N., Melo, L. F. y Luna, F. C. (2021). Optimization of the cultivation conditions of *Bacillus licheniformis* BCLLNf-01 for cellulase production. *Biotechnol Rep (Amst)*, 29(1). e00599.
<https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00599>
- Dahiya, N., Tewari, R. y Hoondal, G. S. (2006). Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 71(6), 773-782.
<https://doi.org/10.1007/s00253-005-0183-7>
- Damalas, C. A. y Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *Int J Environ Res Public Health*. 8(5), 1402-1419. <https://doi.org/10.3390/ijerph8051402>
- Dash, B. K., Rahman, M. M. y Sarker, P. K. (2015). Molecular Identification of a Newly Isolated *Bacillus subtilis* B119 and Optimization of Production Conditions for Enhanced Production of Extracellular Amylase. *Biomed Res Int*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/859805>
- De-Souza, P. M. y De-Oliveira M. P. (2010). Application of microbial α -amylase in industry - A review. *Braz J Microbiol*, 41(4), 850-861.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400004>
- Dean, R., Van Kan J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann R., Ellis, J. y Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Deka, D., Bhargavi, P., Sharma, A., Goyal, D., Jawed, M. y Goyal, A. (2011). Enhancement of Cellulase Activity from a New Strain of *Bacillus subtilis* by

Medium Optimization and Analysis with Various Cellulosic Substrates. *Enzyme Res.* 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/151656>

- Desai, J. D. y Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(1), 47-64. <https://doi.org/10.1128/mnbr.61.1.47-64.1997>
- Douriet-Gámez, N. R., Maldonado-Mendoza, I. E., Ibarra-Laclette, E., Blom, J. y Calderón-Vázquez, C. L. (2018). Genomic Analysis of *Bacillus* sp. Strain B25, a Biocontrol Agent of Maize Pathogen *Fusarium verticillioides*. *Curr Microbiol*, 75(3), 247-255. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1372-1>
- Driss, F., Kallassy-Awad, M., Zouari, N. y Jaoua, S. (2005). Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J Appl Microbiol*, 99(4), 945-953. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02639.x>
- Ejaz, U., Sohail, M. y Ghanemi, A. (2021). Cellulases: From Bioactivity to a Variety of Industrial Applications. *Biomimetics (Basel)*, 6(3), 44. <https://doi.org/10.3390/biomimetics6030044>
- Fatani, S., Saito, Y., Alarawi, M., Gojobori, T. y Mineta, K. (2021). Genome sequencing and identification of cellulase genes in *Bacillus paralicheniformis* strains from the Red Sea. *BMC Microbiol*, 21(1), 254. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02316-w>
- Fazle, R. M. y Baek, K.H. (2020). Antimicrobial Activities of Lipopeptides and Polyketides of *Bacillus velezensis* for Agricultural Applications. *Molecules*, 25(21), 4973. <https://doi.org/10.3390/molecules25214973>
- Fink, T., & Jerala, R. (2022). Designed protease-based signaling networks. *Curr Opin Chem Biol*, 68, <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2022.102146>
- Gomaa, E. Z. (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *J Microbiol*, 50, 103–111. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1343-y>
- Gong, A. D., Li, H. P., Yuan, Q. S., Song, X. S., Yao, W., He, W. J., Zhang, J. B. y Liao, Y. C. (2015). Antagonistic mechanism of iturin A and plipastatin A

from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. *PLoS One*, 10(2), e0116871. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116871>

- Gopinath, S. C, Anbu, P., Arshad, M. K., Lakshmipriya, T., Voon, C. H., Hashim, U., & Chinni, S. V. (2017). Biotechnological Processes in Microbial Amylase Production. *Biomed Res Int*, 2017, <https://doi.org/10.1155/2017/1272193>
- Grau, A., Gómez Fernández, J. C., Peypoux, F. y Ortiz, A. (1999). A study on the interactions of surfactin with phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1418(2), 307-319. [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(99\)00039-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(99)00039-5)
- Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A. y Shirkot, C. K. (2016). Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. *Int J Food Microbiol*, 232, 134-143. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.030>
- Gustafson, K. M., Roman, M., Yand, W. y Fenical, W. (1989). The macrolactins, a novel class of antiviral and cytotoxic macrolides from a deep-sea marine bacterium. *J. Am. Chem. Soc*, 111: 7519-7524
- Han, J. S., Cheng, J. H., Yoon, T. M., Song, J., Rajkarnikar, A., Kim, W. G., Yoo, I. D., Yang, Y. Y. y Suh, J. W. (2005). Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus* sp. sunhua. *J Appl Microbiol*, 99(1), 213-21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02614.x>
- Hashem, A., Tabassum, B., Yand F. y Abd Allah, E. (2019). *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi J. Biol. Sci*, 26(6), 1291-1297. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.05.004>
- Hawkins, N. J., Bass, C., Dixon, A. y Neve, P. (2018). The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 94(1), 135–155. <https://doi.org/10.1111/brv.12440>
- Hazarika, D. J., Goswami, G., Gautom, T., Parveen, A., Das, P., Barooah, M. y Boro, R.C. (2019). Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic

- Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. *BMC Microbiol*, 19(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1440-8>
- Heerklotz, H. y Seelig, J. (2007). Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J*, 36(4-5), 305-314. <https://doi.org/10.1007/s00249-006-0091-5>
 - Hernández, I. (2019). Análisis de la distribución del género *Bacillus*, a través de reconstrucción logenómica y genómica comparativa. Centro de Investigación y de estudios avanzados del Instituto Politécnico Nacional. IL Cinvestav-Irapuato
 - Huang, C. J., Wang, T. K., Chung, S. C. y Chen, C. Y. (2005). Identification of an antifungal chitinase from a potential biocontrol agent, *Bacillus cereus* 28-9. *J Biochem Mol Biol*, 38(1), 82-88. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2005.38.1.082>
 - Hudson, M. J., Beyer, W., Böhm, R., Fasanella, A., Garofolo, G., Golinski, R., Goossens, P. L., Hahn, U., Hallis, B., King, A., Mock, M., Montecucco, C., Ozin, A., Tonello, F. y Kaufmann, S. H. (2008). *Bacillus anthracis*: balancing innocent research with dual-use potential. *Int J Med Microbiol*, 298(5-6), 345-364. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.09.007>
 - Jiang, C. H., Yao, X. F., Mi, D. D., Li, Z. J., Yang, B. Y., Zheng, Y., Qi, Y. J. y Guo, J. H. (2019). Comparative Transcriptome Analysis Reveals the Biocontrol Mechanism of *Bacillus velezensis* F21 Against *Fusarium* Wilt on Watermelon. *Front Microbiol*, 10, 652. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00652>
 - Karpov, D. S., Domashin, A. I., Kotlov, M. I., Osipova, P. G., Kiseleva, S. V., Seregina, T. A., Goncharenko, A. V., Mironov, A. S., Karpov, V. L. y Poddubko, S. V. (2020). Potencial biotecnológico de la cepa *Bacillus subtilis* 20. *Mol Biol*, 54, 119–127. <https://doi.org/10.1134/S0026893320010082>
 - Karthika, S., Midhun, S. J. y Jisha, M.S. (2020). A potential antifungal and growth-promoting bacterium *Bacillus* sp. KTMA4 from tomato rhizosphere. *Microb Pathog*, 142, 104049. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104049>

- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Sanders, E. R., Kaplan, D. y Hirsch, A. M. (2018). Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Front Microbiol*, 9, 2363. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>
- Kim, D. H., Kim, H. K., Kim, K. M., Kim, C. K., Jeong, M. H., Ko, C. Y., Moon, K. H. y Kang, J. S. (2011). Antibacterial activities of macrolactin A and 7-O-succinyl macrolactin A from *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 against vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch Pharm Res*, 34(1), 147-52. <https://doi.org/10.1007/s12272-011-0117-0>
- Kim, S. H., Oh J. K., Kim, Y. H. y Kang, D. K. (2020). Complete genome sequence of the acidic cellulase producer *Bacillus amyloliquefaciens* ATC6. *J Anim Sci Technol*, 62(5), 761-763. <https://doi.org/10.5187/jast.2020.62.5.761>
- Konuray, G. y Erginkaya, Z. (2018). Potential Use of *Bacillus coagulans* in the Food Industry. *Foods (Basel, Switzerland)*, 7(6), 92. <https://doi.org/10.3390/foods7060092>
- Kuhad, R. C., Gupta, R. y Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res*, 2011, 280696. <https://doi.org/10.4061/2011/280696>
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Constanza, L. y Sanchez, L. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova-Publicacion científica en ciencias biomédicas*, 9(15), 113 - 214.
- Li, S., Xu, J., Fu, L., Xu, G., Lin, X., Qiao, J. y Xia, Y. (2022). Biocontrol of Wheat Crown Rot Using *Bacillus halotolerans* QTH8. *Pathogens*, 11(5), 595. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050595>
- Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y. y Liao, X. (2016). Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of

Peach Gummosis. *PLoS One*, 11(9), e0162125.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162125>

- Logan, N. A. (1988). *Bacillus* species of medical and veterinary importance. *J Med Microbiol*, 25(3), 157-165. <https://doi.org/10.1099/00222615-25-3-157>
- Lu, X. L., Xu, Q., Shen, Y. H., Liu, X. Y., Jiao, B. H., Zhang, W. D. y Ni, K. Y. (2008). Macrolactin S, a novel macrolactin antibiotic from marine *Bacillus* sp. *Nat Prod Res*, 22(4), 342-347. <https://doi.org/10.1080/14786410701768162>
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, I. W. H. y Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(3), 506-577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
- Malik, W. A. y Javed, S. (2021). Biochemical Characterization of Cellulase From *Bacillus subtilis* Strain and its Effect on Digestibility and Structural Modifications of Lignocellulose Rich Biomass. *Front Bioeng Biotechnol*, 9, 800265. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.800265>
- Mandic-Mulec, I., Stefanic, P. y van Elsas, J. D. (2015). Ecology of Bacillaceae. *Microbiol Spectr*, 3(2), TBS-0017-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TBS-0017-2013>
- Michielse, C. B. y Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Mol Plant Pathol*, 10(3), 311-324. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00538.x>
- Miljaković, D., Marinković, J. y Balešević-Tubić, S. (2020). The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms*, 8(7), 1037. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
- Moon, J. H., Won, S. J., Maung, C. E. H., Choi, J. H., Choi, S. I., Ajuna, H. B. y Ahn, Y. S. (2021). *Bacillus velezensis* CE 100 Inhibits Root Rot Diseases (*Phytophthora* spp.) and Promotes Growth of Japanese Cypress (*Chamaecyparis obtusa* Endlicher) Seedlings. *Microorganisms*, 9(4), 821. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040821>
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environ Pollut*, 133(2), 183-198. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.06.009>

- Jisha, N., Smitha, B., Pradeep, S., Sreedevi, S., Unni, N., Sajith, S., Priji, P., Josh, M. y Benjamin., S. (2013). Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*, 1(3), 39-51.
- Olanrewaju, O. S., Glick, B. R. y Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, 33(11), 197. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2364-9>
- Ongena, M. y Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*, 16(3), 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ortiz, A. y Sansinenea, E. (2020). Macrolactin Antibiotics: Amazing Natural Products. *Mini Rev Med Chem*, 20(7), 584-600.
- Patel, S. y Gupta, R. S. (2020). A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 70(1), 406-438. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>
- Pietro, A. D., Madrid, M. P., Caracuel, Z., Delgado-Jarana, J. y Roncero, M. I. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol*, 4(5), 315-325. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00180.x>
- Ramírez, V., Baez, A., López, P., Bustillos, R., Villalobos, M. A., Carreño, R., Contreras, J. L., Muñoz-Rojas, J., Fuentes, L. E., Martínez, J. y Munive, J. A. (2019). Chromium Hyper-Tolerant *Bacillus* sp. MH778713 Assists Phytoremediation of Heavy Metals by Mesquite Trees (*Prosopis laevigata*). *From Microbiol*, 10, 1833. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01833>
- Rathore, A. S. y Gupta, R. D. (2015). Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. *Enzyme Res*, 2015, 791907. <https://doi.org/10.1155/2015/791907>
- Reyes-Ramírez, A., Escudero-Abarca, B., Aguilar-Uscanga, M., Hayward-Jones, P. M. y Corona, J. E. (2004). Antifungal Activity of *Bacillus*

thuringiensis Chitinase and Its Potential for the Biocontrol of Phytopathogenic Fungi in Soybean Seeds. *Journal of Food Science*, 69, M131-M134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb10721.x>

- Robson, L. M. y Chambliss, G.H. (1989). Cellulases of bacterial origin. *Enzyme and Microbial Technology*, 11(10), 626–644.
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M. y Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podospheera fusca*. *Mol Plant Microbe Interact*, 20(4), 430-440. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-4-0430>
- Romero-Tabarez, M., Jansen, R., Sylla, M., Lünsdorf, H., Häussler, S., Santosa, D. A., Timmis, K. N. y Molinari, G. (2006). 7-O-malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50(5), 1701-1709. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1701-1709.2006>
- Saggi, S. K. y Mishra, P. C. (2017). Characterization of thermostable alkaline proteases from *Bacillus infantis* SKS1 isolated from garden soil. *PLoS One*, 12(11), e0188724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188724>
- Salazar, F., Ortiz, A. y Sansinenea, E. (2020). A Strong Antifungal Activity of 7-O-Succinyl Macrolactin A vs Macrolactin A from *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149. *Curr Microbiol*, 77, 3409–3413. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02200-2>
- Savary, S., Ficke, A., Aubertot, J. y Hollier, C. (2012). Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security. *Food Secur*, 4, 519–537. <https://doi.org/10.1007/s12571-012-0200-5>
- Schallmeyer, M., Singh, A. y Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can J Microbiol*, 50(1), 1-17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>

- Schönbichler, A., Díaz-Moreno, S. M., Srivastava, V. y McKee, L. S. (2020). Exploring the Potential for Fungal Antagonism and Cell Wall Attack by *Bacillus subtilis natto*. *Front Microbiol*, 11, 521. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00521>
- Setlow, P. (2014). Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know. *J Bacteriol*, 196(7), 1297-305. doi: 10.1128/JB.01455-13.
- Shoda, M. (2000). Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 89(6), 515-521. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(00\)80049-3](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(00)80049-3)
- Siu-Rodas, Y., Calixto-Romo, M., Guillén-Navarro, K., Sánchez, J., Zamora-Briseño, J. y Amaya-Delgado, L. (2018). *Bacillus subtilis* with endocellulase and exocellulase activities isolated in the thermophilic phase from composting with coffee residues. *Revista Argentina de Microbiología*, 50 (3), 234-243. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.08.005>
- Staunton, J. y Weissman, K. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep*, 18, 380-416.
- Staunton, J. y Wilkinson, B. (1998). La biosíntesis de policétidos alifáticos. *Topics in Current Chemistry*, 195, 49-92. Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-69542-7_2
- Su, Y., Liu, C., Fang, H. y Zhang, D. (2020). *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microb Cell Fact*, 19(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01436-8>
- Swain, M. R. y Ray, R. C. (2009). Biocontrol and other beneficial activities of *Bacillus subtilis* isolated from cowdung microflora. *Microbiol Res*, 164(2), 121-130. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2006.10.009>
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J. y Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Sci*. 267, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
- Tabssum, F., Irfan, M., Shakir, H. A. y Qazi, J. I. (2018). RSM based optimization of nutritional conditions for cellulase mediated Saccharification

by *Bacillus cereus*. *J Biol Eng*, 12, 7. <https://doi.org/10.1186/s13036-018-0097-4>

- Tapia, C. y Amaro, J. (2014). Género *Fusarium*. *Revista chilena de infectología*, 31(1), 85-86. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182014000100012>
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M. y Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 42: 131-138.
- Tendulkar, S. R., Saikumari, Y. K., Patel, V., Raghotama, S., Munshi, T. K., Balaram, P. y Chattoo, B. B. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*. *J Appl Microbiol*, 103(6), 2331-2339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03501.x>
- Théâtre, A., Cano-Prieto, C., Bartolini, M., Laurin, Y., Deleu, M., Niehren, J., Fida, T., Gerbinet, S., Alanjary, M., Medema, M. H., Léonard, A., Lins, L., Arabolaza, A., Gramajo, H., Gross, H. y Jacques, P. (2021). The Surfactin-Like Lipopeptides From *Bacillus* spp.: Natural Biodiversity and Synthetic Biology for a Broader Application Range. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. 9(623701). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.623701>
- Turnbull, P. C. B. (1996). *Bacillus*. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 15.
- Valtierra de Luis, D., Villanueva, M., Berry, C. y Caballero, P. (2020). Potential for *Bacillus thuringiensis* and Other Bacterial Toxins as Biological Control Agents to Combat Dipteran Pests of Medical and Agronomic Importance. *Toxins*, 12(12), 773. <https://doi.org/10.3390/toxins12120773>
- Van der Maarel, M. J., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C., Leemhuis, H. y Dijkhuizen, L. (2002). Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J Biotechnol*, 94(2), 137-155. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(01\)00407-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00407-2)

- van Dijk, J. M. y Hecker, M. (2013). *Bacillus subtilis*: from soil bacterium to super-secreting cell factory. *Microb Cell Fact*, 12, 3. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-3>
- Vázquez-Pineda, A., Bravo-de-la-Parra, A., Mendoza-de-Gives, P., Liébano-Hernández, E., Hernández-Linares, I., Yáñez-Pérez, N., Aguilar-Marcelino, L., Ramírez-Vargas, G., Hernández-Castro, E., Gutiérrez-Segura, I. y López-Arellano, M. E. (2012). Uso de productos derivados de *Bacillus thuringiensis* como alternativa de control en nematodos de importancia veterinaria: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 3(1), 77-88.
- Vilain, S., Luo, Y., Hildreth, M. B. y Brözel, V. S. (2006). Analysis of the life cycle of the soil saprophyte *Bacillus cereus* in liquid soil extract and in soil. *Applied and environmental microbiology*, 72(7), 4970–4977. <https://doi.org/10.1128/AEM.03076-05>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I. y Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista mexicana de fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M. y Vater, J. (1997). Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*, 63(1), 44-49. <https://doi.org/10.1128/aem.63.1.44-49.1997>
- Wang, G. F., Meng, J. F., Tian, T., Xiao, X. Q., Zhang, B. y Xiao, Y. N. (2020). Endophytic *Bacillus velezensis* strain B-36 is a potential biocontrol agent against lotus rot caused by *Fusarium oxysporum*. *J Appl Microbiol*, 128(4), 1153-1162. <https://doi.org/10.1111/jam.14542>
- Wang, T., Liang, Y., Wu, M., Chen, Z., Lin, J. y Yang, L. (2015). Natural products from *Bacillus subtilis* with antimicrobial properties. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 23(4), 744–754. <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2014.05.020>

- Wang, X., Liang, L., Shao, H., Ye, X., Yang, X., Chen, X., Shi, Y., Zhang, L., Xu, L. y Wang, J. (2022). Isolation of the Novel Strain *Bacillus amyloliquefaciens* F9 and Identification of Lipopeptide Extract Components Responsible for Activity against *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Plants (Basel)*, 11(3), 457. <https://doi.org/10.3390/plants11030457>
- Xu, W., Yang, Q., Yang, F., Xie, X., Goodwin, P. H., Deng, X., Tian, B. y Yang, L. (2022). Evaluation and Genome Analysis of *Bacillus subtilis* YB-04 as a Potential Biocontrol Agent Against *Fusarium* Wilt and Growth Promotion Agent of Cucumber. *Front Microbiol*, 13, 885430. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.885430>
- Xue, C., Tian, L., Xu, M., Deng, Z. y Lin, W. (2008). A new 24-membered lactone and a new polyene delta-lactone from the marine bacterium *Bacillus marinus*. *J Antibiot (Tokyo)*, 61(11), 668-674. <https://doi.org/10.1038/ja.2008.94>
- Yoo, J. S., Zheng, C. J., Lee, S., Kwak, J. H. y Kim W. G. (2006). Macrolactin N, a new peptide deformylase inhibitor produced by *Bacillus subtilis*. *Bioorg Med Chem Lett*, 16(18), 4889-4892. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.06.058>
- Yuan, J., Li, B., Zhang, N., Waseem, R., Shen, Q. y Huang, Q. (2012). Production of bacillomycin- and macrolactin-type antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for suppressing soilborne plant pathogens. *J Agric Food Chem*, 60(12), 2976-2981. <https://doi.org/10.1021/jf204868z>
- Yuan, J., Zhang, F., Wu, Y., Zhang, J., Raza, W., Shen, Q. & Huang, Q. (2014). Recovery of several cell pellet-associated antibiotics produced by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Lett Appl Microbiol*, 59(2), 169-176. <https://doi.org/10.1111/lam.12260>
- Zhao, H., Shao, D., Jiang, C., Shi, J., Li, Q., Huang, Q., Rajoka, M. S. R., Yang, H. y Jin, M. (2017). Biological activity of lipopeptides from *Bacillus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101(15), 5951-5960. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8396-0>

- Zhao, Y., Selvaraj, J. N., Xing, F., Zhou, L., Wang, Y., Song, H., Tan, X., Sun, L., Sangare, L., Folly, Y. M. y Liu, Y. (2014). Antagonistic action of *Bacillus subtilis* strain SG6 on *Fusarium graminearum*. *PLoS One*, 9(3), e92486. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092486>
- Zhou, H., Ren, Z. H., Zu, X., Yu, X. Y., Zhu, H. J., Li, X. J., Zhong, J. y Liu, E. M. (2021). Efficacy of Plant Growth-Promoting Bacteria *Bacillus cereus* YN917 for Biocontrol of Rice Blast. *Front Microbiol*, 12, 684888. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.684888>
- Zhou, L., Wang, J., Wu, F., Yin, C., Kim, K. H. y Zhang, Y. (2022). Termite Nest Associated *Bacillus siamensis* YC-9 Mediated Biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Front Microbiol*, 13, 893393. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.893393>

7. Anexo 1. Medios de cultivo

YMA modificado

Se preparo a partir de extracto de levadura 1 g/L, manitol 10 g/L, acido glutámico 0.5 g/L y agar 14 g/L, sin cloruro de sodio, a pH 6.8.

YM modificado

Se preparo con extracto de levadura 1 g/L, manitol 10 g/L, acido glutámico 0.5 g/L; a un pH de 6.8.

Agar con carboximetil celulasa

Medio de crecimiento que contenía 10 g/L de carboximetil, 5 g/L de levadura, 5 g/L de peptona y 15 g/L de agar, a un pH de 6.8.

Agar almidón

Medio de crecimiento con los siguientes nutrientes: 2 g/L de almidón, 5 g/L de peptona y 15 g/L de agar, a un pH de 6.8.

Agar quitina

A partir de 1.5 g/L de KH_2PO_4 , 1.5 g/L de MgSO_4 , 20 g/L de agar, 20 g/L de peptona, en medio a 1% de quitina, a un pH de 6.8.