



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE
METABOLITOS PRODUCIDOS POR CEPAS DE *Bacillus subtilis***

**DETERMINATION OF THE ANTIFUNGAL ACTIVITY OF
METABOLITES PRODUCED BY STRAINS OF *Bacillus subtilis***

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

NICOLÁS AMAYA ZAMBRANO

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. NORMA ELENA ROJAS RUIZ

CODIRECTORA:
DRA. ABIGAIL MARTÍNEZ TORRES

MAYO 2023



Agradecimientos

Agradezco enormemente a mis asesoras, mentoras, guías y motivadoras, la Dra. Norma Elena Rojas Ruiz y la Dra. Abigail Martínez Torres, por su pasión a la ciencia, por todos los valiosos consejos y enseñanzas brindadas a lo largo de este periodo de licenciatura, por enseñarme a no rendirme, a ver las cosas siempre con un lado positivo y a dar lo mejor de mí siempre, muy agradecido de corazón.

Agradezco a los revisores de tesis el Dr. Carlos A. Contreras Torres y Dr. Candelario Vázquez Cruz, por su tiempo invertido en revisar este trabajo de investigación, por sus comentarios constructivos y sus valiosas sugerencias.

Agradezco a Juan Carlos Díaz Becerra por realizar el cepario de las bacterias aisladas de rizosfera de plantas medicinales, colección de donde se obtuvieron las cepas de *Bacillus*.

Agradezco al Dr. Antonino Báez Rogelio por su donación de las cepas de hongos, los cuales sirvieron para ensayos de antagonismo en esta investigación.

Agradecimientos

Agradezco a mi familia por el apoyo y ser un pilar en mi vida, a mi madre Rosaura, mi padre Nicolás, mis hermanos Alejandra y Julio, mi abuela Yolanda que siempre me inspiran a trabajar duro para cumplir mis objetivos, a mis can-hijas Soko y Pilly, gracias por acompañarme en las noches de vela, las amo.

Agradezco con todo mi corazón a mis amistades Adrián Mendoza, Saraluz Soto, Guadalupe Fierro, Juan Reneaum, Andrea Zaragoza, Jossvic Hernández, Alejandra Álvarez, Kevin Díaz, Araceli Fabián, Arturo Rivera, Jeremy, Ingrid, Joshu, Kasia y AleGaga quienes me acompañaron en este camino y siempre han estado ahí para apoyarme con risas, diversión, un consejo y palabras de aliento, ustedes han hecho de mi vida un lugar más feliz y estoy eternamente agradecido.

It feels so scary getting old

ÍNDICE

Resumen	6
Abstract	9
1. Introducción	11
1.1 Problemática actual de hongos	11
1.2 Antifúngicos provenientes de bacterias	12
2. Antecedentes	13
2.1 Control biológico	13
2.2 Género <i>Bacillus</i> como agente de control biológico	13
2.2.1 Bacteriocinas de <i>Bacillus</i>	15
2.2.2 Sideróforos de <i>Bacillus</i>	20
2.2.3 Enzimas líticas de <i>Bacillus</i>	21
2.2.4 Inductores de resistencia y crecimiento vegetal	21
2.3 <i>Bacillus subtilis</i>	22
2.3.1 Ecología	23
2.3.2 Requerimientos nutrimentales y crecimiento	24
2.3.3 Proceso de esporulación	24
2.4 <i>Fragaria x ananassa</i>	27
2.3.1 La fresa en México	30
2.3.2 Enfermedades fúngicas de <i>F. x ananassa</i>	32
2.5 <i>Bacillus subtilis</i> contra hongos fitopatógenos.	33
2.6 Metabolitos de <i>Bacillus subtilis</i>	36
2.6.1 Metabolitos secundarios no volátiles.....	37
2.6.2 Metabolitos secundarios volátiles	42
3. Justificación	44
Hipótesis	44
4. Objetivos	45
Objetivo general.....	45
Objetivos particulares	45
5. Materiales y métodos	46
5.1 Diagrama de trabajo.....	46
5.2 Cultivo de <i>Bacillus</i> spp.....	47

5.3	Cultivo de hongos fitopatógenos.....	49
5.4	Caracterización bioquímica de <i>Bacillus</i> spp.....	49
5.5	Extracción de ADN de <i>Bacillus</i> spp.	51
5.6	Ensayos de inhibición de <i>Bacillus</i> spp. contra hongos fitopatógenos.....	54
3.7	Bioensayos en <i>Fragaria x ananassa</i>	56
3.8	Análisis estadístico.....	59
6.	Resultados	60
6.1	Evaluación bioquímica.....	60
3.5	Extracción y amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S y análisis bioinformático de las secuencias.....	66
3.6	Evaluación de antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. y sus microfiltrado contra hongos fitopatógenos.....	68
3.7	Bioensayos en <i>Fragaria x ananassa</i>	73
4	Discusión	86
5	Conclusiones	88
6	Perspectivas	90
7	Bibliografía	90

Resumen

México se posiciona dentro de los 10 países a nivel mundial como productor y exportador de alimentos, la industria agrícola es una de las principales fuentes de ingresos económicos del país representando una participación en el producto interno bruto del 2.5% y se espera que incremente, sin embargo, anualmente se estima que ocurren pérdidas cercanas al 70% en campos de cultivo de frutas, verduras, cereales y hortalizas en consecuencia a enfermedades e infecciones de origen fúngico, el tratamiento actual para la mayoría de estos hongos fitopatógenos es el uso de fungicidas de naturaleza química que si bien tienen resultados favorables, ocasionan efectos nocivos en la biota, contaminación de suelo y agua, alteraciones en ciclos geoquímicos y daños a la salud del aplicador y consumidor, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas que sean amigables con el ambiente.

El presente estudio se enfocó en evaluar la actividad antagónica de tres cepas de *Bacillus subtilis* (49-1, 49-2 y 49-3) y sus microfiltrados contra hongos fitopatógenos, tanto en condiciones de laboratorio como en invernadero. Las cepas de *Bacillus subtilis* fueron aisladas de la rizosfera de plantas medicinales, el efecto antagónico en condiciones de laboratorio fue evaluado contra los hongos fitopatógenos *Aspergillus* spp., *Fusarium* spp., *Mucor* spp., *Fusarium moniliforme* y *Penicillium* spp., los cuales son de importancia agrícola, y son responsables de más del 50% de pérdidas en frutas y verduras.

Los ensayos de antagonismo realizados in vitro empleando a los microorganismos de las cepas 49-1, 49-2 y 49-3 mostraron que la cepa 49-1 presentó antagonismo contra los cinco hongos probados, con halos de inhibición de 30 mm contra *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. respectivamente, 28 mm contra *Mucor* sp., 20 mm contra *Aspergillus* sp. y 5 mm contra *Fusarium moniliforme*, la cepa 49-2 presentó inhibición contra tres hongos: *Fusarium* sp., *Mucor* sp. y *Penicillium* sp. con diámetros de inhibición de 24, 30 y 26 mm respectivamente, la cepa 49-3 presentó antagonismo contra los cinco hongos, siendo los mayores halos de inhibición 40

mm contra *Mucor* sp. y 32 mm contra *Penicillium* sp. Al realizar los ensayos de inhibición empleando sólo los microfiltrados de las cepas probadas, se encontró que los microfiltrados de la cepa 49-1 presentaron una inhibición ± 15 mm contra: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., y *Fusarium moniliforme*, los de 49-2 una inhibición de ± 15 mm contra: *Mucor* sp. y *Penicillium* sp. y los de 49-3 una inhibición de ± 20 mm contra *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Fusarium moniliforme* y *Penicillium* sp.

Finalmente se llevó a cabo un bioensayo en condiciones de invernadero infectando 100 plantas de Fresa (*Fragaria x ananassa*) con dos hongos fitopatógenos (50 plantas por cada hongo): *Fusarium moniliforme* y *Mucor* sp., las plantas fueron divididas en grupos de 10 a los cuales les fueron administradas los microfiltrados de las cepas 49-1 (tratamiento a), 49-2 (tratamiento b), 49-3 (tratamiento c), como control positivo se adicionó el fungicida comercial captan (tratamiento d) y para el control negativo solo se administró agua (tratamiento e), el ensayo se realizó por cuatro semanas. Los resultados indicaron que las plantas infectadas con el hongo *Fusarium moniliforme* a las cuales les fueron administrados los microfiltrados de las cepas 49-1, 49-2 y 49-3 tuvieron un porcentaje de supervivencia del 80%, las del tratamiento control captan sobrevivieron un 90% y las del grupo que sólo se les adiciono agua 20%. Con respecto a la altura de la planta al final del experimento, los resultados mostraron que las plantas de los grupos que fueron tratadas con los microfiltrados de las cepas de *B. subtilis* tuvieron una diferencia de altura de 5 cm, comparada con las del grupo captan y de 12 cm con las restantes del grupo de agua.

Los resultados de plantas infectadas con el hongo *Mucor* sp., a las cuales les fueron administrados los microfiltrados de las cepas 49-1, 49-2 y 49-3 tuvieron un porcentaje de supervivencia del 80%, las del tratamiento control con captan sobrevivieron en un 100% y las del grupo al que sólo se les adicionó agua 30%. Al medir la altura de la planta al final del experimento, se encontró que las plantas pertenecientes a los grupos que fueron tratadas con los microfiltrados de las cepas de *B. subtilis* tuvieron una diferencia de altura de 5 cm, comparada con las del grupo tratado con captan y de 10 cm con las plantas a las que sólo se les aplicó agua, por

lo que concluimos que los microfiltrados de las cepas probadas inhibieron el desarrollo de los hongos fitopatógenos, además de que se promovió el crecimiento vegetal.

Abstract

Mexico is positioned within the 10 countries worldwide as a producer and exporter of food, the agricultural industry is one of the main sources of economic income for the country, representing a participation in the gross domestic product of 2.5%, and it is expected to increase, nevertheless, annually it is estimated that losses close to 70% occur in fruit, vegetable, cereal and vegetable fields as a consequence of diseases and infections of fungal origin, the current treatment for most of these phytopathogenic fungi is the use of fungicides of chemical nature that, although they have favorable results, also induce negative effects on the biota and cause soil and water contamination, alterations in geochemical cycles and damage to the health of the applicator and consumer, so it is necessary to look for new alternatives that are friendly to the environment.

The present study focused on evaluating the antagonistic activity of three *Bacillus subtilis* strains (49-1, 49-2 and 49-3) and their microfiltrates against phytopathogenic fungi, both under laboratory and greenhouse conditions. The *Bacillus subtilis* strains were isolated from the rhizosphere of medicinal plants, the antagonistic effect was evaluated against the phytopathogenic fungi *Aspergillus* spp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Fusarium moniliforme* and *Penicillium* sp., which are fungi of agricultural importance, since they are responsible for more than 50% of losses in fruits and vegetables; antagonism tests were carried out for each fungus, testing the strain and the microfiltrate containing its extracellular metabolites.

The strain 49-1 presented antagonism against the five tested fungi, with inhibition halos of 30 mm against *Fusarium* sp. and *Penicillium* sp. respectively, 28 mm against *Mucor* sp. 20 mm against *Aspergillus* sp. and 5 mm contra *Fusarium moniliforme*, strain 49-2 showed inhibition against three fungi: *Fusarium* sp., *Mucor* sp. and *Penicillium* sp. with inhibition diameters of 24, 30 and 26 mm respectively, strain 49-3 presented antagonism against the five fungi, with the largest inhibition halos being 40 mm against *Mucor* sp. and 32 mm against *Penicillium* sp. The microfiltrates of 49-1 presented an inhibition halo of ± 15 mm against: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp.,

and *Fusarium moniliforme*, those of 49-2 exhibited an inhibition zone of ± 15 mm against: *Mucor* sp. and *Penicillium* sp. and those of 49-3 an inhibition of ± 20 mm against *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Fusarium moniliforme* and *Penicillium* sp.

Finally, a bioassay was carried out under greenhouse conditions infecting 100 strawberry (*Fragaria x ananassa*) plants with two phytopathogenic fungi (50 plants for each fungus): *Fusarium moniliforme* and *Mucor* spp., the plants were divided into groups of 10 at to which the microfiltrates of the strains 49-1 (treatment a), 49-2 (treatment b), 49-3 (treatment c) were administered, as positive control the commercial fungicide captan (treatment d) was added and as negative control, only water was administered (treatment e), the test was carried out for four weeks. The results indicated that the plants infected with the *Fusarium moniliforme* fungus to which the microfiltrates of strains 49-1, 49-2 and 49-3 were administered had a survival rate of 80%, those of the captan control treatment survived a 90% and those of the group that only were added water 20%. In regard to the height of the plant at the end of the experiment, the results showed that the plants of the groups that were treated with the microfiltrates of the *B. subtilis* strains had a difference in height of 5 cm, compared to those of the captan group. and 12 cm with the remains of the water group.

The results of plants infected with the fungus *Mucor* sp., to which the microfiltrates of strains 49-1, 49-2 and 49-3 were administered, had a survival percentage of 80%, those of the control treatment with captan survived 100% and those of the group to which only 30% water was added. The height of the plant at the end of the experiment showed that the plants of the groups that were treated with the microfiltrates of the *B. subtilis* strains had a difference in height of 5 cm, compared to those of the captan group and of 10 cm with the rest of the water group, so we conclude that the ultrafiltrates have an inhibitory effect against this fungus, in addition to promoting plant growth.

1. Introducción

1.1 Problemática actual de hongos

La rápida aparición de microorganismos patógenos resistentes a antimicrobianos, incluidos los hongos, representan una amenaza considerable para el control de enfermedades en animales y plantas, si bien este es un problema reconocido, la mayor parte de la atención pública y la investigación se ha centrado en las bacterias, en detrimento de la resistencia a los antimicóticos (Hendrickson *et al.*, 2019).

En las últimas décadas, la incidencia de infecciones provocadas por hongos en plantas ha ido en aumento y en consecuencia se ha reportado que destruyen un tercio de todos los cultivos alimentarios anualmente, las infecciones afectan a diversos cultivos y son causadas por distintos hongos: en el arroz (añublo del arroz causado por *Magnaporthe oryzae*), trigo (roya causada por *Puccinia Graminis*), maíz (carbón de la espiga causado por *Ustilago maydis*), papas (tizón tardío causado por *Phytophthora infestans*), jitomate (cladosporiosis afectando las hojas y tallo causado por *Cladosporium spp.*), fresa (podrición de raíz causado por *Rhizoctonia solani*), varían según la región, pero representan una amenaza actual y creciente para la seguridad alimentaria (Brdar *et al.*, 2021; Fisher *et al.*, 2012; Morales-Mora *et al.*, 2020)

La estrategia que se ha elegido para el control de los hongos en campos de cultivo es el uso de pesticidas, su empleo ha incrementado los rendimientos de cosecha, ayudado al control de patógenos y mejora en la calidad del producto (CEDRSSA, 2020) sin embargo, su uso indiscriminado ha traído más consecuencias ambientales que beneficios, como intoxicación humana, pérdida de especies nativas, efectos en la cadena trófica, contaminación de suelo y agua, desarrollo de cáncer, erosión de suelos, etc. (Hakeem *et al.*, 2016).

En México se calcula que existen alrededor de 1000 fungicidas que son aplicados en cantidades que van desde 395 hasta 13,163 ton al año (García-Gutiérrez & Rodríguez-Meza, 2012), por lo que es necesario buscar alternativas a estos fungicidas químicos que sean amigables con el ambiente y la salud.

1.2 Antifúngicos provenientes de bacterias

El manejo de infecciones fúngicas en plantas es una de las principales tareas de la agricultura en todo el mundo y las estrategias de protección son necesarias para el mayor rendimiento de cultivos de mejor calidad, la forma convencional de manejarlas es con la aplicación de fungicidas. Los principales fungicidas comerciales, tales como Bavistin, Clorotalonilo Malatión han sido reportados como eficaces, sin embargo, tienen un impacto peligroso en la salud humana, debido a que inducen toxicidad en el cuerpo, alteran el ciclo de vida de las células, producen especies reactivas de oxígeno lo que lleva a las células a apoptosis, por lo que es necesario la implementación de otras alternativas (Compant *et al.*, 2005; Huaping *et al.*, 2020).

La búsqueda de nuevos antifúngicos de origen natural y con un mínimo o nulo impacto en el ecosistema nos ha llevado a la búsqueda y uso de distintas especies bacterianas que produzcan metabolitos con actividad antifúngica, como: la bacilomicina D producida por *Bacillus vallismortii* que inhibe los síntomas y reduce la presencia de *Alternaria alternata* y *Fusarium Graminearum* en un 90 y 50% respectivamente en plántulas de trigo presentando toxicidad para los hongos (Zhao *et al.*, 2010), así como *Bacillus amyloliquefaciens* que sintetiza metabolitos lipopéptidos cíclicos que presentan inhibición contra *Fusarium oxysporum*, el cual causa el marchitamiento del pepino, los lipopéptidos actúan inhibiendo la formación de su biofilm (Xu *et al.*, 2013), estos metabolitos también han mostrado actividad contra *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani* en cultivos de chile habanero, actuando en la inhibición de crecimiento micelial (Mejía-Bautista *et al.*, 2016), en el caso de las bacterias del género *Bacillus* se ha mostrado la producción del ácido 3-feniláctico (PLA), un metabolito que ha sido reportado como inhibidor de hongos, por ejemplo: *Candida pulcherrima*, *C. parapsilosis* y *Rhodotorula mucilaginosa* (Gajbhiye & Kapadnis, 2016; Schwenninger *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2011).

2. Antecedentes

2.1 Control biológico

El control biológico se define como el uso de organismos vivos para suprimir las poblaciones de plagas o infecciones en plantas, las cuales son provocadas por un organismo con el objetivo de desarrollar una agricultura sostenible a un menor costo ecológico (Usta 2013). Las ventajas que ofrece este tratamiento a diferencia de los agroquímicos son:

- Beneficio ecológico al disminuir la carga ambiental y evitar daños en el ambiente.
- Objetivo específico, se diseña para afectar solo una plaga específica o una población de organismos en particular.
- Beneficio al consumidor, al ser específicos y degradarse en menor tiempo, además de que no se tienen reportes de presentar daños a la salud.
- Ayudan a tener un rendimiento mayor en la producción de campos de cultivo de forma sostenible.

Las estrategias de control biológico incluyen el uso de bioplaguicidas a base de compuestos de plantas, insectos para el control de nematodos, insectos depredadores para el control de plagas, que consuman las cosechas, bacterias que puedan controlar insectos plagas e infecciones fúngicas. A las bacterias empleadas en control biológico se les denomina: agentes de biocontrol antagónicos (BCA por sus siglas en inglés) debido a que producen metabolitos secundarios que poseen la capacidad de inhibir el crecimiento de agentes patógenos (Lahlali *et al.*, 2022).

2.2 Género *Bacillus* como agente de control biológico

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por Cohn (1872) y corresponde a bacterias en forma de bastón, filogenética y fenotípicamente heterogéneas (Hoppe,

1983) que cumplen con características en común como: crecimiento aerobio, respuesta positiva a la tinción de Gram, forma bacilar, la formación de endosporas y toxinas (Tejera *et al.*, 2011). Las especies del género *Bacillus* pertenecen al Reino Bacteria; Filo Firmicutes; Clase *Bacilli*; Orden *Bacillales*; Familia *Bacillaceae* y Género *Bacillus* (Maughan & Van der Auwera, 2011).

A la fecha el género incluye más de 336 especies, las cuales con base en estudios moleculares de la secuencia del ARNr 16S se han clasificado en cuatro grupos: a) el grupo “sensu lato” asociado a patogenicidad y elevada producción de esporas, este grupo incluye a *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*; b) los “*Bacillus sensu*” ambientales que son caracterizados por su presencia en distintos hábitats y una elevada producción de metabolitos secundarios como el grupo de *Bacillus subtilis*, *B.licheniformis*, *B. pumilus*; c) el género *PaeniBacillus* que incluye las especies *B. polymyxa* y *B. macerans*; y d) el grupo que incluye a *B. vietnamensis* y *B. coahuilensis* encontradas en ambientes desérticos y capaces de tolerar 10% de NaCl (Bergey, D. H., Krieg, N. R., & Holt, 2009; Parte, 2014; Tejera *et al.*, 2011; Villarreal-Delgado *et al.*, 2018)

La presencia de esporas en el género permite su capacidad de reproducción y de persistir en casi cualquier ambiente, siendo los suelos los principales lugares de los que se pueden aislar, además de que poseen la característica de ser saprófitas y por ende alimentarse de casi cualquier sustrato (H. A. Hong *et al.*, 2009), también la producción de toxinas y diversos metabolitos que inhiben el desarrollo de otros organismos, los convierte en un género de interés en la búsqueda de nuevos antimicrobianos.

En el caso del control de infecciones causadas por hongos, el género *Bacillus* ha destacado, debido a que cuenta con diversas especies cuyos metabolitos presentan inhibición contra al menos 1 hongo distinto como: *Bacillus safensis* contra *Magnaporthe oryzae* responsable del marchitamiento y putrefacción de las raíces del arroz (Rong *et al.*, 2020), *Bacillus velezensis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* causante de la podredumbre del mango (Jin *et al.*, 2020), *Bacillus velezensis* contra *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum*, *Monilinia fructicola*,

Magnaporthe oryzae, *Thanatephorus cucumeris* y *Sclerotinia sclerotiorum* responsables de la pérdida de diversos cultivos como mango, jitomate, maíz y cítricos (Torres *et al.*, 2020), *Bacillus methylotrophicus* contra *Botrytis cinérea* principal patógeno en la viticultura (Toral *et al.*, 2018), *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Fusarium oxysporum f. spp. niveum* responsable de daño vascular en sandías y plantas con elevado porcentaje de agua (Wu *et al.*, 2019), *Bacillus megaterium* contra *Rhizoctonia solani* responsable del marchitamiento de raíces (Hashem *et al.*, 2021) por mencionar algunos casos.

El efecto antagónico que posee el género *Bacillus* se debe a la producción de sustancias antimicrobianas, se tiene reportado que *Bacillus* spp. pueden biosintetizar dos tipos de sustancias antimicrobianas: una es la bacteriocina, que se sintetiza de forma ribosomal y la otra es un lipopéptido, que se sintetiza de forma no ribosomal (Arnison *et al.*, 2013; Ongena & Jacques, 2008), además de estas sustancias están reportados los sideróforos, enzimas líticas, toxinas e inductores de resistencia sistémica de plantas (Layton *et al.*, 2011).

2.2.1 Bacteriocinas de *Bacillus*

Las bacteriocinas son toxinas peptídicas que inhiben el crecimiento de bacterias, utilizando sistema de transporte específico de bacteriocina (como el ABC), además poseen una regulación específica de toxina, haciendo que su metabolismo no se vea afectado por la secreción de esta sustancia (Riley & Wertz, 2002).

Las bacteriocinas se dividen en dos grupos: las provenientes de bacterias de ácido láctico (BAL) que es el grupo más estudiado debido a su importancia alimentaria ya que son fácilmente encontradas en alimentos, el segundo grupo son las sustancias inhibidoras de tipo bacteriocina (SITB) referido a compuestos antimicrobianos del cual su naturaleza peptídica no ha sido confirmada o si es producida mediante una síntesis no ribosómica (Abriouel *et al.*, 2011) este último a pesar de no ser

caracterizado puede ser cuantificado y replicado, por lo que permitiría la utilización de nuevas sustancias a base de *Bacillus* (Md Sidek *et al.*, 2018).

La clasificación de bacteriocinas producidas por miembros del género *Bacillus* está basada en el tamaño y estructura del péptido, esta se resume en la tabla 1, siendo: Clase I, o lantibióticos, la cual contiene los aminoácidos lantionina y 3-metil-lantionina, estos a su vez, se pueden dividir en cuatro subclases, en relación con su estructura y tamaño del péptido. Por el contrario, las bacteriocinas de clase II no contienen estos aminoácidos modificados. Pueden subdividirse en tres grupos: (i) clase IIa, péptidos activos con secuencia consenso -Y-G-N-G-V-X-C- cerca del extremo N-terminal; (ii) clase IIb, bacteriocinas de dos péptidos en las que ambos componentes son necesarios para la actividad antimicrobiana, al igual que las otras clases son sintetizadas ribosomalmente, en un sistema regulatorio de tres componentes que consta de un feromona peptídica, una histidina asociada a la membrana proteína quinasa y reguladores de respuesta, además no requieren enzimas para su maduración.; y (iii) clase IIc, péptidos activados por tiol que requieren residuos de cisteína reducidos para su actividad. Las bacteriocinas de clase III son proteínas termolábiles de alta masa molecular (>30 kDa). Las bacteriocinas de clase IV son péptidos complejos que contienen restos de lípidos o carbohidratos esenciales para su actividad (Abriouel *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2014; Lee & Kim, 2011; Oppegård *et al.*, 2007).

Tabla 1. Clasificación de las bacteriocinas del género *Bacillus*. Elaboración propia.

Clase	Características	Modo de acción	Ejemplo	Referencia
I Lantibióticos	Péptidos modificados post traducción, que poseen los aminoácidos lantionina y 3- metil-lantionina así como residuos deshidratados formados por reacción enzimática,	Unión y/o interacción con componentes celulares vitales, como la pared celular, la membrana o los orgánulos intracelulares, formando poros en células diana, además debido a su carga (-) puede atraerse electrostáticamente a las membranas celulares, provocando daños.	Subtilina	(Lee & Kim, 2011)
I a Lantibióticos alargados de péptido único	<5 kDa, forman estructuras anulares y confieren estabilidad estructural al calor, pH y proteólisis.	Daños a la pared celular mediante la creación de poros y la inhibición de enzimas esenciales para el microorganismo.	Ericina S, ericina A.	(Simons <i>et al.</i> , 2020)
I b Lantibióticos de un solo péptido	Globulares e inflexibles, y estos péptidos poseen carga negativa.	Inhiben la secreción de enzimas enfocadas en la transcripción de ADN.	Lacticina 481, citolisina, salivaricina.	(Simons <i>et al.</i> , 2020)
I c	<10 kDa, son lantibióticos de dos componentes, como haloduracina	Daños a la pared celular mediante la creación de poros y la inhibición	Haloduracina, liquenicidina.	(Abriouel <i>et al.</i> , 2011)

Lantibióticos de dos péptidos	y los aminoácidos lantionina y 3-metillantionina, la carga depende de su medio.	de enzimas esenciales para el microorganismo, efecto negativo electrostático.		
I d Péptidos modificados post traducción	Posee regiones altamente conservadas en el péptido principal, así como en las secuencias del péptido líder.	Inhiben la secreción de enzimas enfocadas en la transcripción de ADN.	Subtilina A	(Abriouel <i>et al.</i> , 2011)
II Bacteriocinas peptídicas sin residuos modificados	0.77–10 kDa, péptidos no modificados y lineales, que son estables al calor y al pH	Desestabiliza el empaquetamiento de fosfolípidos de las membranas y causa la permeabilización de la membrana en concentraciones pico a nanomolares de péptidos.	Enterocinas	(Franz <i>et al.</i> , 2007; Nes <i>et al.</i> , 2010; Oppedgård <i>et al.</i> , 2007; Simons <i>et al.</i> , 2020).
II a	Poseen una estructura lineal con puentes bisulfuro y actividad anti-listeria en común, por lo que se denominan bacteriocinas antilisterias.		Coagulina, SRCAM 37, SRCAM 602, SRCAM 1580.	
II b	Bacteriocinas de dos péptidos (α/β) que se producen por igual y son necesarias para exhibir actividad antimicrobiana.		Lactococina G, lactococina Q y plantaricina NC8.	

II c	Bacteriocinas peptídicas no similares a la pediocina.		Cistibióticos y tiobióticos.	
II d	Bacteriocinas incluidas en el grupo clase II que no se incluyen en los subgrupos anteriores.		SmbAB	
III	Péptidos grandes (> 30 kDa), y pueden ser líticos o no líticos termolábiles.	Fuga de ATP intracelular de las células, lisis celular y despolarización de la membrana.	Millericina B.	(Alvarez-Sieiro <i>et al.</i> , 2016; Sun <i>et al.</i> , 2018)
IV	Péptidos que poseen contienen partes de lípidos o carbohidratos, además son sensibles a actividad enzimática.	Disrupción de membrana celular	Plantaricina S, leuconocina S.	(Simons <i>et al.</i> , 2020)

2.2.2 Sideróforos de *Bacillus*

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular (400–1000 kDa) secretadas por microorganismos en condiciones de deficiencia de hierro, con la capacidad de secuestrar a los iones Fe^{+3} de su entorno y crear así complejos metálicos ferri-sideróforos, este mecanismo es impulsado desde el citoplasma a través del sistema de proteínas transportadoras “tonB” que transducen energía necesaria del citosol hasta la membrana externa (Bleam, 2012; R. Saha *et al.*, 2013).

Los sideróforos pueden ser utilizados por los microorganismos dependiendo del receptor de membrana, siendo: a) utilizando al complejo Fe^{+3} – sideróforo en la membrana o b) reduciendo extracelularmente a complejos Fe^{+3} pueden ser: hidroxamatos, catecolatos y carboxilatos (Saha *et al.*, 2016) estos grupos han sido reportados por bacterias pertenecientes a *Bacillus*.

El grupo de hidroxamatos con estructura $\text{C}(=\text{O})\text{N}(\text{OH})\text{-R}$, donde R es un aminoácido o un derivado de este, al liberar O^{2+} se crean ligandos con el Fe^{+3} llamados “complejo octaédrico hexadentado”, lo que le da características de protección contra la hidrólisis y degradación enzimática en el medio ambiente, a la par de su actividad antimicrobiana y beneficiosa para la planta ayudando a su desarrollo vascular (Saha *et al.*, 2013; Winkelmann, 2007).

Los catecolatos son agentes quelantes que forman con el hierro un complejo octaédrico hexadentado, este complejo es el más común de encontrar en la naturaleza debido a la elevada cantidad de microorganismos que producen este sideróforo por ejemplo las bacterias: *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia carotovora*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* (Ali & Vidhale, 2013). El último grupo de los carboxilatos se une al hierro a través de grupos carboxilo e hidroxilo, como el ácido hidroxicarboxílico, este es producido principalmente por microorganismos ubicados en la rizosfera de plantas, es un tipo de ligando débil, donde se libera el hierro, así el hierro liberado puede

interactuar con las distintas proteínas bacterianas que lo usan como cofactor, llegando a su inactivación celular ((De Serrano, 2017; Sulochana *et al.*, 2014).

2.2.3 Enzimas líticas de *Bacillus*

Las enzimas obtenidas a partir de cepas de *Bacillus* son una fuente accesible a nivel industrial debido a la fácil reproducción del microorganismo productor y la seguridad que ofrecen al productor y consumidor, ya que son bacterias consideradas inocuas, un grupo que es de especial interés en el área de la agronomía son las enzimas líticas, que constituyen uno de los grupos de proteínas más diversos en términos de poseer propiedades antimicrobianas (Danilova & Sharipova, 2020).

Las enzimas líticas como las quitinasas, β -1,3-glucanasas, peroxidasas, proteasas y lipasas son antimicrobianos naturales que despolimerizan el peptidoglicano de la pared celular de las células bacterianas diana y provocan una lisis celular rápida, en hongos deterioran su pared celular afectando los enlaces glicosídicos de sus glicoproteínas y polisacáridos, provocando así la lisis y muerte celular (Chirakkal *et al.*, 2002; Fischetti, 2005; Jha *et al.*, 2014).

Las bacterias que producen quitinasas y β -1,3-glucanasas se consideran agentes de control biológico de varios hongos patógenos de plantas, diversas especies de *Bacillus* han sido reportadas como antagonistas típicos de hongos que deterioran madera y causantes de la putrefacción de raíces como *Rhizoctonia* y *Cladosporium*, además, se ha reportado el género *Bacillus* es capaz de producir un complejo de enzimas hidrolasas cuando crece en un medio de sustratos con quitina, lo que inducirá la aparición de alguna enzima como quitinasa, quitosanasas, laminarinasas, lipasa o proteasa (Bagyan & Setlow, 2002; Helistö *et al.*, 2001).

2.2.4 Inductores de resistencia y crecimiento vegetal

La inducción de crecimiento vegetal y de resistencia a patógenos por parte de las especies de *Bacillus* puede ser directa o indirecta. La forma directa la llevan a cabo fijando el nitrógeno, solubilizando minerales, promoviendo la producción de hormonas reguladoras y activación de mecanismos de defensa en plantas, estas por lo general la realizan especies bacterianas que se encuentran en la rizosfera de la planta. Caso contrario, la forma indirecta es la producción de endotoxinas que actúan como antagonistas de patógenos, como las proteínas Cry producidas por *Bacillus thuringiensis* (Kloepper *et al.*, 2004; Tejera *et al.*, 2011).

Los *Bacillus* son considerados como promotores del crecimiento vegetal debido a su obtención de resistencia sistémica inducida al mejorar la biosíntesis de hormonas vegetales (ácido giberélico y ácido indol-3-acético) que tienen una estrecha relación con la disponibilidad de nutrientes para las plantas, en el caso de *B. subtilis* se sabe que induce la síntesis de ácido jasmónico, etileno y el gen regulador NPR1 en plantas el cual promueve el crecimiento y restringe la muerte celular al formar condensados que se dirigen a sustratos específicos para degradarlos (M. S. García-Gutiérrez *et al.*, 2013; Hashem *et al.*, 2021; Zavaliev *et al.*, 2020).

2.3 *Bacillus subtilis*

Una de las especies del género de *Bacillus* que ha mostrado diversas aplicaciones en la agronomía y que resulta de interés biotecnológico es la bacteria *Bacillus subtilis* (su taxonomía se presenta en la tabla 2), la cual es Gram positiva, tiene forma de varilla, aerobia, es formadora de esporas, con un genoma de 4 214 630 pares de bases, contenido de guanina-citosina (GC) del 43.5%, codifica alrededor de 4100 proteínas, es fácilmente manipulable genéticamente hablando, responsable de la producción del 60% de las enzimas comercialmente disponibles, actúa en la producción de alimentos fermentados, detergentes, antibióticos, plaguicidas y sirve como organismo modelo para el estudio de agentes químicos, desarrollo de vacunas, promotor vegetal, por mencionar algunos (Aizawa, 2014; Bergey, D. H., Krieg, N. R., & Holt, 2009; Harwood *et al.*, 2013; Schaechter, 2009).

Tabla 2. Taxonomía de *Bacillus subtilis*.

Taxonomía	
Dominio:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Bacillaceae
Género:	<i>Bacillus</i>
Especie:	<i>Bacillus subtilis</i>

2.3.1 Ecología

B. subtilis se puede aislar de diversos entornos terrestres y acuáticos, como raíces de plantas, aguas residuales, diversos tipos de suelos y climas, mantos acuíferos y ríos, también se ha encontrado en tracto digestivo de animales incluido el de los humanos, lo que la convierte en una especie ubicua ampliamente adaptada para crecer en diversos entornos dentro de la biosfera, debido a la capacidad que posee de formar endosporas en respuesta a la disminución de nutrientes y estrés ambientales, estas esporas son fácilmente transportadas por el aire y dispersadas por el viento, llegando así a habitar y proliferar en diversos ecosistemas (Earl *et al.*, 2008; Joshi & Mcspadden Gardener, 2006; Martinez, 2013).

Uno de los principales ecosistemas en dónde más se han asilado *B. subtilis* es en la rizosfera de diversas plantas como el frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), soja (*Glycine max*), arroz (*Oryza sativa*), berenjena (*Solanum melongena*), tomate (*Solanum subsect. Lycopersicon*), lechuga (*Lactuca sativa* L.) por mencionar algunas especies, en todas las rizosferas de las plantas se encontró a *B. subtilis* con una predominancia sobre otras especies como *Serratia*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *PaeniBacillus*, *Flavobacterium*, *Erwinia*, *Enterobacter* (Angelina *et al.*, 2020; Earl *et*

al., 2008; Karnwal, 2017; Kumar *et al.*, 2012; E. A. H. Mohamed *et al.*, 2018; D. Saha *et al.*, 2012; Sivasakthi *et al.*, 2013).

2.3.2 Requerimientos nutrimentales y crecimiento

B. subtilis puede crecer en un medio mínimo que contenga los nutrientes básicos: como fuentes de carbono a partir de azúcares simples como glucosa, maltosa, fructosa, nitrógeno como aminoácidos esenciales o péptidos y fósforo o ésteres de fosfato, los medios en donde ha mostrado un crecimiento favorable son: Luria-Bertani (LB), Man, Rogosa y Sharpe (MRS), medio almidón, medio de esporulación Difco (DSM), medio glicerol, agar Müller-Hinton, medio Tris G y medio de leche (Harwood *et al.*, 2013; Hill *et al.*, 2018; Rojas-Ruiz *et al.*, 2015; Schaechter, 2009).

La importancia de la selección del medio de cultivo reside en que las células crecen más rápido y son hasta tres veces más grandes cuando se cultivan en un medio rico en nutrientes en comparación cuando se cultivan en un medio pobre en nutrientes, el tiempo de crecimiento de *B. subtilis* puede ser menor a 24 h y alcanzar la fase de esporulación en menos de 72 h, y en medios que no son ricos en nutrientes puede tardar 72 h en crecer y cerca de 2 semanas en llegar a la fase de esporulación (Gao *et al.*, 2017; Hill *et al.*, 2018; Kearns & Losick, 2005).

En cuanto a la temperatura que se requiere para su crecimiento puede oscilar entre 10 y 55 °C, con tasas de crecimiento más rápidas a 42 °C. Comienza la formación esporas a temperaturas de 38-44 °C, según la cepa y el medio. La mayoría de los estudios a nivel laboratorio utilizan 37°C, y se ha establecido como una temperatura promedio para la división y generación de esporas por parte de *B. subtilis*, con un tiempo de duplicación celular de unos 30 min en un medio rico en nutrientes (Schaechter, 2009).

2.3.3 Proceso de esporulación

Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* son Gram positivos y pueden formar esporas, *B. subtilis* produce esporas que también se denominan endosporas, las esporas son células metabólicamente latentes compuestas por un núcleo central parcialmente deshidratado (que contiene el genoma) rodeado por varias capas protectoras dispuestas concéntricamente que se desarrolla dentro de una célula madre, estas son resistentes a una variedad de factores ambientales como: el calor, los productos químicos nocivos, la radiación ultravioleta y la desecación (Mckenney *et al.*, 2013).

El propósito de la esporulación es producir un tipo de célula metabólicamente inactiva llamada “espora” que es capaz de sobrevivir en condiciones ambientales adversas hasta que se restablezcan las condiciones de crecimiento favorables, la formación de esporas tarda alrededor de 7 h a una temperatura de 37 °C y comienza después de las respuestas del estado de transición, como la competencia y la motilidad, y las bacterias que forman las esporas no son ni competentes ni móviles (Paredes-Sabja *et al.*, 2011).

La esporulación de *B. subtilis* (figura 1) comienza cuando una célula se divide asimétricamente elaborando un “tabique polar” que da como resultado dos compartimentos genéticamente idénticos pero morfológicamente distintos: la célula madre y la “pre-espora”; a continuación mediante un proceso de engullimiento en el extremo polar del tabique la célula madre traga la “pre-espora”, produciendo una pre-espora que reside como un orgánulo aproximadamente esférico, rodeado de membrana doble, dentro del citosol de la célula madre; la espora finalmente madura hasta convertirse en una célula latente parcialmente deshidratada que se libera al medio ambiente cuando la célula madre se somete a una lisis celular programada (Mckenney *et al.*, 2013; Piggot & Hilbert, 2004; Schaechter, 2009; I. S. Tan & Ramamurthi, 2014).

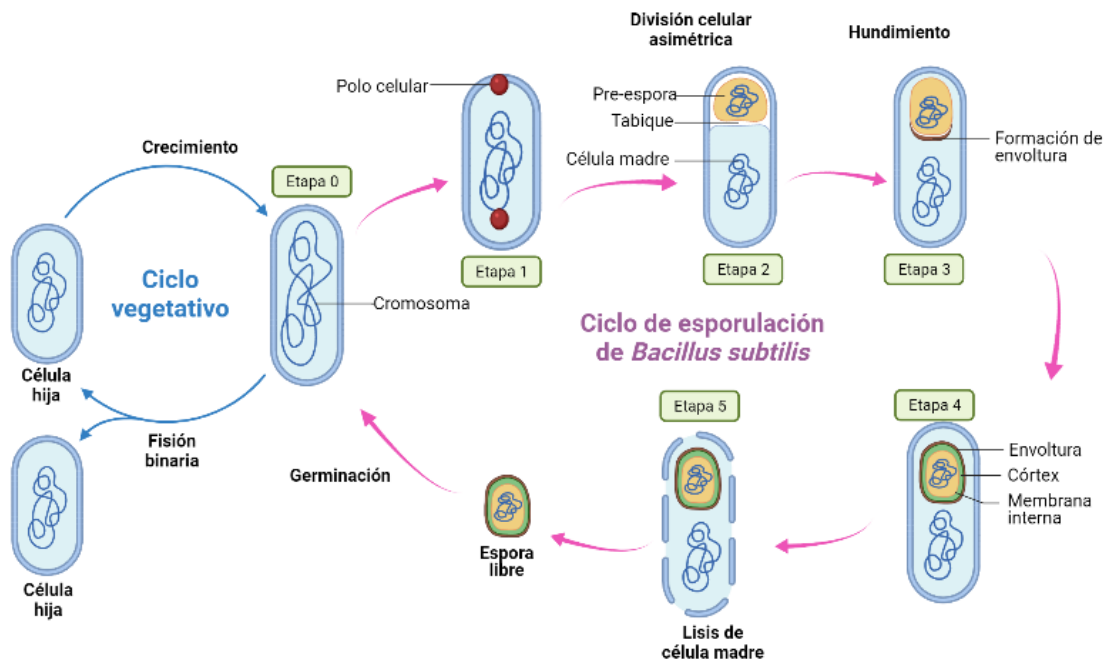


Figura 1. Ciclo de esporulación de *Bacillus subtilis*. Modificada de Mckenney *et al.*, 2013; Tan & Ramamurthi, 2014.

El proceso de esporulación puede ser dividido en seis etapas (figura 1):

- Etapa 0 decisión de esporular, en bacterias, la esporulación no ocurre de manera homogénea, sino que ocurre en subpoblaciones, debido a la cantidad de energía que consume el proceso, sucede cuando la célula alcanza un nivel de maduración o se encuentra bajo estrés ambiental, este está activa las cinasas sensoras de histidina (KinA, KinB y KinC), lo que da como resultado la activación del factor de transcripción Spo0A el cual inicia con la esporulación.
- Etapa 1 filamentación axial y aseguramiento del número correcto de copias cromosómicas, aquí los cromosomas duplicados (uno de madre y otro para la espora) forman una estructura llamada filamento axial, a la par se activa la proteína RacA, la cual es necesaria para anclar los dos cromosomas a los polos celulares para promover la segregación cromosómica.
- Etapa 2 tabique asimétrico, se activa una “cascada” de factores sigma específicos del compartimento que se inicia por la división asimétrica de la

célula, a división asimétrica de la célula en esporulación crea un esporangio compuesto por dos compartimentos, la célula madre más grande y la espora más pequeña, que finalmente se convierte en la espora.

- Etapa 3 hundimiento, el tabique polar se curva alrededor de la pre-espora a medida que la célula madre se la “traga”.
- Etapa 4 córtex, la pre-espora se convierte en una célula de doble membrana enlazada dentro de la madre, la primera capa siendo el córtex y la segunda la envoltura.
- Etapa 5 ensamblaje de envoltura, se forma la envoltura que protegerá a la espora del ambiente, está compuesta de cuatro capas distintas: la capa base, la capa interna, la capa externa y la corteza, y así finalmente es liberada la espora.(Ben-Yehuda *et al.*, 2005; Mckenney *et al.*, 2013; Piggot & Hilbert, 2004; I. S. Tan & Ramamurthi, 2014).

2.4 *Fragaria x ananassa*

La fresa (*Fragaria x ananassa*) es una de las principales frutas con mayor importancia comercial y es cultivada en diversos países siendo China, Estados Unidos de América, México, Turquía y Egipto, los que aportan más del setenta por ciento del volumen total de la producción de fresa en el mundo y su producción es el triple de la cantidad de todos los demás cultivos de bayas combinados (Liston *et al.*, 2014; Ramírez Padrón *et al.*, 2020).

La fresa es miembro de la familia Rosaceae y del género *Fragaria*, su taxonomía se presenta en la tabla 3, crece en ambientes a temperaturas de 22-25°C de día y 7-13°C de noche y a temperaturas de 13-22°C en invernaderos, el suelo requerido debe ser rico en humus y con un pH ligeramente ácido (5–6.5), su riego debe contar con drenaje y precipitaciones de 150 mm anualmente o riegos cada tercer día para mantener la tierra húmeda y en consistencia de humus, ya que esto mejora la fertilidad del suelo como el contenido de C y N, permeabilidad, capacidad de agua disponible para las plantas y porosidad que mejorara el flujo de aire entre la raíz y

el suelo (Lv *et al.*, 2021; Natsheh *et al.*, 2015; Pandey *et al.*, 2016; Sharma *et al.*, 2009).

Tabla 3. Taxonomía de *Fragaria x ananassa*. (Modificada de Huerta, 2016).

Taxonomía	
Superreino:	Eukaryota
Reino:	Plantae
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Rosales
Familia:	Rosaceae
Subfamilia:	Rosoideae
Tribu:	Potentilleae
Subtribu:	Fragariinae
Género:	<i>Fragaria</i>
Subgénero:	<i>Fragaria x ananassa</i>
Nombre local:	Fresa

Morfológicamente la planta es de tipo herbáceo y perenne (figura 2), con estolones que enraízan en el ápice y hojas compuestas trifoliadas, llega a una altura promedio de 50 cm con hojas en forma de racimos por grupos de 3 que pueden llegar a los 15 cm de largo y 10 cm de ancho, de forma ovalada, con bordes dentados y con tricomas. Su maduración inicia a las 12-16 semanas, en esta etapa produce frutos de 5 a 10 cm de largo, 2 a 3 cm de ancho con márgenes dentados, de color rojo y forma de corazón con una superficie rugosa (Ahn *et al.*, 2021; Hussain *et al.*, 2021; Kaushalya Madhavi *et al.*, 2021; Nielsen & Lovell, 2000).

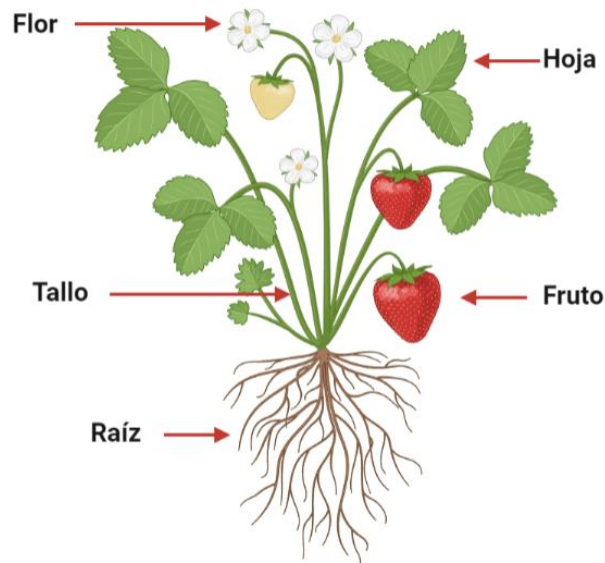


Figura 2. Morfología de la planta de fresa. Elaboración propia.

El desarrollo de fresa consta de tres etapas:

1. La vegetativa que abarca la siembra, la formación de brotes, yemas, desarrollo de hojas y partes vegetativas como estolón y nuevos brotes.
2. La reproductiva característica de la aparición del órgano floral y floración.
3. La productiva que abarca la formación y maduración del fruto, así como una etapa de reposo vegetativo, en total este proceso abarca unos 150 días aproximados y es replicable hasta unas 5 veces, teniendo así un tiempo de producción comerciable de dos años, en la figura 3 se resume su fenología.

Tabla 3. Taxonomía de *Fragaria x ananassa*. (Modificada de Huerta, 2016).

Taxonomía	
Superreino:	Eukaryota
Reino:	Plantae
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida

Subclase:	Rosidae
Orden:	Rosales
Familia:	Rosaceae
Subfamilia:	Rosoideae
Tribu:	Potentilleae
Subtribu:	Fragariinae
Género:	<i>Fragaria</i>
Subgénero:	<i>Fragaria x ananassa</i>
Nombre local:	Fresa

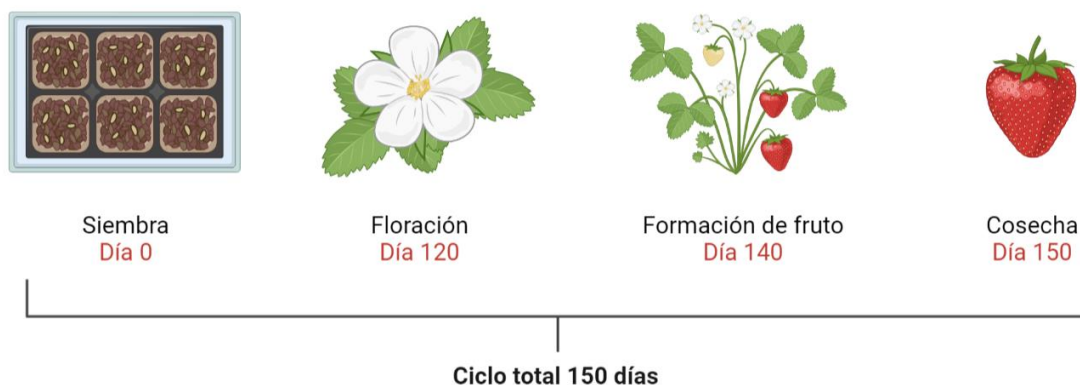


Figura 3. Fenología del cultivo de fresa. (Modificada de Loeza-Flores *et al.* , 2018)

2.3.1 La fresa en México

México se ha caracterizado por ser uno de los principales productores y exportadores de fresas en el mundo, tan solo en 2020 y 2021 se convirtió en el mayor exportador de fresas en el mundo alcanzando una producción de 93 mil 007 toneladas de fresa con ganancias de 851 millones de dólares y se estima que para 2024 haya un incremento del 21.25%, además de que se destinará más porcentaje de superficie utilizada para su cultivo, ya que actualmente sólo se destina un 2% de la superficie total para el cultivo de fresa, de acuerdo con SAGARPA 2021.

En México de acuerdo con los datos abiertos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP 2020) todos los estados y la ciudad de México son responsables de la producción y exportación de fresa en el mundo, los principales estados son: Michoacán, Baja California, Guanajuato, Jalisco, Baja California Sur, México, Aguascalientes, Tlaxcala, Oaxaca y Puebla, en la tabla 4 se presenta la cantidad en toneladas que estos estados produjeron en 2020 y en la figura 4 se presenta un mapa de la distribución geográfica de los principales estados productores de fresa en México.

Tabla 4. Producción obtenida en toneladas de fresa en los principales estados productores en México. Modificada de SIAP 2022.

Estado	Producción obtenida (t)
Baja California	105403
Guanajuato	99,448
Michoacán	12,524
Jalisco	3,885
Aguascalientes	3,038
México	3,031
Puebla	281
Tlaxcala	273
Chihuahua	74
Veracruz	17



Figura 4. Distribución geográfica de los principales estados productores de fresa en México. Tomado de SIAP 2020.

2.3.2 Enfermedades fúngicas de *F. x ananassa*

A pesar de la importancia económica de la fresa en México, aún existen problemas que afectan su cultivo, como el espacio destinado a su producción, problemas de riego, falta de infraestructura, aparición y propagación de plagas y enfermedades, lo que ocasiona un bajo rendimiento, daños en los frutos o muerte de la planta, las enfermedades causadas por hongos es el mayor problema que se presenta, ya que se reportan daños mayores al 70% en cultivos, representado pérdidas de millones de dólares (Asraoui et al., 2019; León López et al., 2018).

Algunos ejemplos de los hongos que afectan al cultivo de fresa son: *Botrytis cinerea* responsable de la enfermedad del moho gris (Asraoui et al., 2019), *Fusarium oxysporum* se transmite por el suelo a los cultivos y causa la enfermedad del marchitamiento que mata a los cultivares, además la planta presenta los síntomas cuando la planta se encuentra en fase de floración (Salazar et al., 2018), *Fusarium wilt* que provoca la fusariosis caracterizándose por darle un aspecto quemado a las

hojas y tallo (Tian *et al.*, 2019), *Pestalotiopsis spp.* que ataca el follaje y provoca daños en la corona de la planta (Ara *et al.*, 2017), *Rhizopus spp.* produce un moho que infecta al fruto y tiene una proliferación extremadamente rápida y de fácil contagio (Greenshields *et al.*, 2016; Meylani *et al.*, 2022), *Aspergillus spp.* y *Penicillium spp.* afectan el desarrollo floral, el transporte de agua y la maduración del fruto, pudriendo y marchitando el tallo (Greenshields *et al.*, 2016; Mariscal-Amaro *et al.*, 2017).

Para reducir las pérdidas causadas por enfermedades fúngicas fitopatógenas en la producción de fresas, los principales métodos son fungicidas de carácter químico, por ejemplo el tratamiento con bromuro de metilo, un fumigante que se encuentra restringido en muchos países debido a su naturaleza destructiva para la capa de ozono, o kresoxim-metil perteneciente al grupo de estrobilurinas que son tóxicos al contacto con la piel, produciendo dermatitis, además de que una exposición prolongada desarrolla enfermedades crónicas de la piel, alteraciones visuales, edema pulmonar, efectos cancerígenos y dependiendo de la dosificación pueden ser fatales, captan fungicida que pertenece a la familia de las ftalimidias y su uso está enfocado al tratamiento en campos de cultivo de fruta, sin embargo, su uso prolongado ha demostrado causar daños en el ADN humano, tales daños inducen estrés replicativo resultando en roturas en la doble cadena, provocando una mutación (Del Rosario Valera *et al.*, 2018; Fernandez-Vidal *et al.*, 2019; S. Hong *et al.*, 2022).

2.5 *Bacillus subtilis* contra hongos fitopatógenos.

La elevada producción de metabolitos provenientes de *B. subtilis* ha llevado a su investigación en diversas áreas, se han reportado estudios en los que se demostraron beneficios que esta cepa provocaba en la rizosfera de la planta como un agente de control biológico y promotor de crecimiento vegetal, lo que condujo a las primeras investigaciones sobre su potencial antifúngico a finales de la década de los años 70 y a principios de los años 80, Ahmad (1977) mostró que filtrados de

B. subtilis provocaron la inhibición de *Aspergillus niger*, de igual manera Besson *et al.*, (1976) encontró y caracterizó metabolitos producidos por distintas cepas de *B. subtilis*, tales como: los antifúngicos bacilomicina B, bacilomicina R y eumicina los cuales provocaron un halo de inhibición promedio de 20 mm a una concentración de 50 µg/ml, los cuales fueron efectivos contra el hongo *Penicillium chrysogenum*, Cubeta *et al.*, (1986) estudiaron la relación que tenía una cepa de *Bacillus subtilis* con las semillas de soja y como eran protegidas contra hongos, en este estudio se encontraron que los filtrados de *B. subtilis* inhibían el crecimiento y la formación del estroma de *Phomopsis spp.*, y el resultado fue atribuido a algún antifúngico producido que fue excretado.

La caracterización fisicoquímica, genética, dosificación, y mecanismos de acción de los metabolitos secundarios producidos por *B. subtilis* que poseen actividad antifúngica, fueron abordados en un estudio con la cepa NCIMB 12376, en el cual se reportó que cultivando a *B. subtilis* en un medio PDA adicionado con hierro se favoreció la producción de metabolitos volátiles, debido a que las concentraciones de hierro fueron óptimas para la producción de sideróforos los cuales son perjudiciales contra los patógenos vegetales transmitidos por el suelo como *Rhizoctonia solani* y *Pythium ultimum* (Fiddaman & Rossall, 1993).

Gong y colaboradores en 2006 probaron la actividad contra diversos hongos de la cepa PY-1 la cual fue aislada de campos de algodón y cultivada en medio líquido KMB (medio Kings B), al alcanzar la fase de esporulación sus metabolitos demostraron inhibir a: *Alternaria kikuchiana* 29%, *Aspergillus niger* 26%, *Bipolaris maydis* 24%, *Exserohilum turcicum* 33%, *Fusarium oxysporum* 32%, *Gibberella zeae* (Schw.) 27%, *Penicillium digitatum* Sacc. 30%, *Pestalotia funeal* 12%, *Pyricularia oryzae* 23% y *Trichoderma viride* 25%, por la técnica de HPLC se extrajeron los metabolitos y fueron cuantificados por ionización por electropulverización, se hallaron cinco isómeros de iturina A (lipopéptido cíclico), que pueden modificar la permeabilidad de la membrana y la composición lipídica, e inhibir el crecimiento del micelio y la esporulación de los hongos.

La bacteria *B. subtilis* subsp. *Inaquosorum* ha sido encontrada en diversos ambientes, en un estudio realizado en 2018 fue aislado de ambiente urbanos (salida de aire de edificios departamentales), , se investigó su potencial antifúngico contra los hongos *Alternaria alternata*, *Sordaria fimicola*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium sp*, *Fusarium sp*, *Geotrichum sp*, *Rhodotorula sp*, *Trichoderma sp* y *Zygorhynchus sp*, los resultados indicaron una inhibición con promedio de 20% en cada caso, esto se debe a la presencia de fengicinas un grupo lipopéptidos, además de los antimicrobianos bacilisina, subtilosina, aurantinina y sublancina (Knight *et al.*, 2018).

En un estudio realizado por Meena y colaboradores en 2020 la cepa LP15 aislada de la rizosfera de chícharo, cultivada en medio LB se caracterizó por la producción de lipopéptidos y estos se evaluaron contra los hongos *Mucor spp.* y *Aspergillus niger*, en cada uno se presentó una inhibición del 75.1% y 41.9% respectivamente, esta actividad podría deberse a la naturaleza anfifílica de la surfactina LP el metabolito aislado se une a la membrana fúngica por interacción hidrofóbica provocando su lisis.

Actualmente se cuenta con medios de cultivo selectivos para el crecimiento de *B. subtilis* con el objetivo de obtener metabolitos específicos, por ejemplo para el caso de los lipopéptidos se utiliza el medio Landy, característico por poseer diversas sales, se utilizaron agitación y temperaturas mayores a los 35°C para la producción de lipopéptidos, los cuales fueron extraídos mediante ultrafiltración y se probaron contra el hongo *Venturia inaequalis* responsable de la putrefacción de la manzana, el lipopéptido obtenido fue la fengicina con una concentración inhibidora media máxima (IC50) de 0.03 mg/l, esta afectó morfológicamente a las hifas y esporas del hongo, llevándolo a una muerte celular (Desmyttere *et al.*, 2019).

En un estudio empleando la cepa Z-14 la cual fue aislada de la rizosfera de campos de cultivo de avena y crecida en agar nutritivo, se usó una ultrafiltración y recolectaron las proteínas con actividad antifúngica, encontrándose pepsina, tripsina, proteinasa K y cada una fue probada contra *Fusarium proliferatum*, *Verticillium dahliae*, *Bipolaris papendorfii* y *Fusarium oxysporum*, utilizando una

alícuota de 30 μ l se presentó un halo de inhibición promedio de 13 mm de diámetro (X. Zhang *et al.*, 2020).

En 2021 Pang y colaboradores aislaron la cepa SH21 de una pasta de soja, la cual fue cultivada en medio LB líquido y llevado a la fermentación aerobia para obtener las esporas y producción de proteínas, la proteína que se encontró en mayor concentración fue la quitinasa, al realizar las pruebas de inhibición se encontraron alteraciones en las hifas de *Fusarium solani*, así como depresión, engrosamiento de la pared celular y desintegración citoplasmática una concentración de 68 μ g/ml.

Como se ha evidenciado, *Bacillus subtilis* es una fuente de una variedad de metabolitos secundarios con actividad antifúngica que inhiben diversos hongos de interés agronómico, al caracterizarlos, se pueden conocer los mecanismos de acción contra hongos fitopatógenos y evaluar su potencial como agentes de control biológico.

2.6 Metabolitos de *Bacillus subtilis*

Los metabolitos son productos y/o intermediarios producidos o utilizados durante el metabolismo celular, pueden tener una multitud de funciones, incluida la conversión de energía, la señalización, la influencia epigenética, la actividad de cofactor, la conversión de productos, liberación de sustancias y activación de transcriptomas. Dependiendo de su producción y el rol que cumplen en el metabolismo son divididos en primarios y secundarios (Ruiz *et al.*, 2010).

Los metabolitos primarios son componentes esenciales para el funcionamiento del proceso fisiológico, el crecimiento, desarrollo y reproducción del organismo, son formados durante la fase de crecimiento como resultado del metabolismo energético, incluyen aminoácidos, nucleótidos y productos finales de fermentación como etanol y ácidos orgánicos; los metabolitos secundarios son pequeñas moléculas orgánicas que normalmente no son esenciales para el crecimiento ni

desarrollo del organismo productor, pero que contribuyen a su aptitud en la evolución y ayudan a la supervivencia del microorganismo en la naturaleza, son producidos durante la última fase de crecimiento, por lo tanto, el metabolismo secundario a menudo es provocado por el agotamiento de un nutriente, o por la adición de un inductor y/o por una disminución en la tasa de crecimiento (Lu & Craig, 2012; Singh *et al.*, 2017).

Los principales metabolitos secundarios de *B. subtilis* son mayoritariamente sintetizados ribosomalmente 16S (Kai, 2020) y debido a sus propiedades fisicoquímicas, los metabolitos secundarios se agrupan en compuestos volátiles y no volátiles, los compuestos no volátiles comprenden lipopéptidos, policétidos y péptidos, los compuestos volátiles comprenden hidrocarburos, cetonas, alcoholes, compuestos nitrogenados, azufrados, terpenos y otros (Kaspar *et al.*, 2019; Rowan, 2011).

2.6.1 Metabolitos secundarios no volátiles

2.6.1.1 Lipopéptidos cíclicos

Los lipopéptidos cíclicos (LC) son moléculas de diversas longitudes (C6-C18), compuestas de una cola lipídica unida a un oligopéptido corto ciclado para formar una lactona o un anillo de lactama, mediante dos aminoácidos en la cadena peptídica o entre un aminoácido y un grupo amino o hidroxilo que lleva un grupo de ácido graso, pueden poseer configuración D o L en los aminoácidos en la porción peptídica, la mayoría de los lipopéptidos cíclicos de *B. subtilis* se agrupan en las familias de surfactina, iturina y fengicina, de acuerdo con su estructura peptídica (Bionda *et al.*, 2013; Kaspar *et al.*, 2019; Schneider *et al.*, 2014).

La estructura de la surfactina se muestra en la figura 5, son sustancias anfipáticas que contienen grupos hidrófobos y polares, compuestos de siete aminoácidos y diferentes ácidos grasos 3-hidroxi, siendo el componente principal el ácido 3-hidroxi-

13-metil-mirístico, es utilizada como antimicrobianos y su eficacia reside en su capacidad de permeabilización de la membrana, inhibición de la producción de biopelículas y producen estrés celular en microorganismos, se produce de forma independiente del ácido nucleico mediante el uso de grandes complejos enzimáticos llamados complejo de surfactina sintetasa (Henkel & Hausmann, 2019; Hu *et al.*, 2019; Kraas *et al.*, 2010; Vedaraman & Venkatesh, 2011)

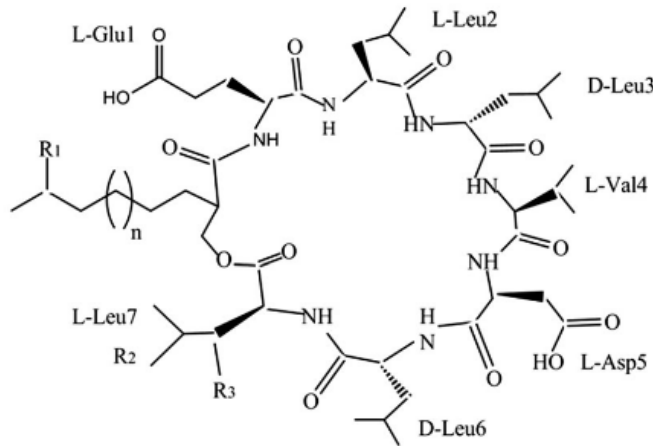


Figura 5. Estructura de la surfactina. Tomado de Kraas *et al.*, 2010.

Las iturinas son una familia de LC no ribosómicos de siete residuos de aminoácido α y uno β , están representados por la iturina A (figura 6) , la micosubtilina y la bacilomicina, son heptapéptidos con un ácido graso β -amino que muestran una fuerte actividad antifúngica contra *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Bipolaris maydis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, por mencionar algunos, la producción de este metabolito es inducida por inanición y es regulada por los genes spo0A asociados con la esporulación, su mecanismo fungicida se debe a la supresión de la germinación de los hongos y la inactivación de su esporulación (Kaspar *et al.*, 2019; Mongkoltharuk, 2012; Romero *et al.*, 2007; Wan *et al.*, 2021).

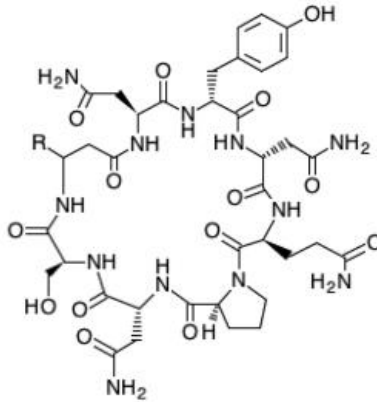


Figura 6. Estructura de la iturina A. Tomado de Mongkoltharuk, 2012.

Las fengicinas son lipopéptidos activos con estructura de un ácido graso β -hidroxi unido a una parte peptídica que comprende 10 aminoácidos (figura 7), donde 8 de ellos están organizados en estructura acíclica, son menos tóxicos para las plantas y de los LC son los que poseen una mayor actividad antifúngica, actúa haciendo más permeable la membrana plasmática, limitando así los filamentos del hongo, también provoca una separación de fases en la bicapa lipídica, de igual manera se ha observado en microscopio que cuando los hongos son tratados con fengicina sus hifas aparecen hinchadas, toscas e irregulares, con surcos distorsionados y ondulaciones, también se ha mostrado que las proteínas del núcleo, el citoplasma, las mitocondrias, la membrana plasmática y el citoesqueleto experimentan un cambio significativo en su abundancia provocando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y llevando a un estrés celular al hongo (Deleu *et al.*, 2008; Geissler *et al.*, 2017; L. Zhang & Sun, 2018).

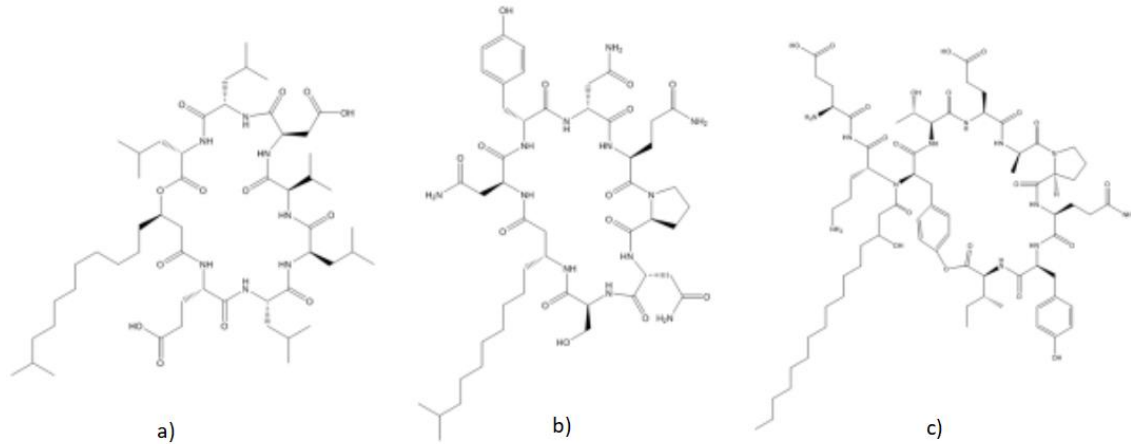


Figura 7. Estructuras de los lipopéptidos cíclicos de *Bacillus subtilis*, a) surfactina, b) iturina A, c) fengicina. Tomado de Geissler *et al.*, 2017.

2.6.1.2 Lipopéptidos lineares

Los lipopéptidos lineares son secuencias que incorporan una cadena del grupo acilo unida a un extremo N-terminal, la importancia de la cadena acilo reside en que actúa como un ancla de membrana, aumentando o disminuyendo la afinidad de la membrana, y en consecuencia, la actividad antimicrobiana, en hongos se unen al fosfatidilinositol presente en la membrana e inhiben la síntesis de 1,3-β-D-glucano, un homopolisacárido componente de la pared celular en hongos fitopatógenos, los principales lipopéptidos de este grupo son las gageostatinas A, B y C (figura 8), con siete residuos de aminoácidos, presentan actividad antibacteriana y antifúngica principalmente contra *Fusarium oxysporum* (Oliveras *et al.*, 2018; Semreen *et al.*, 2018; Tareq *et al.*, 2014).

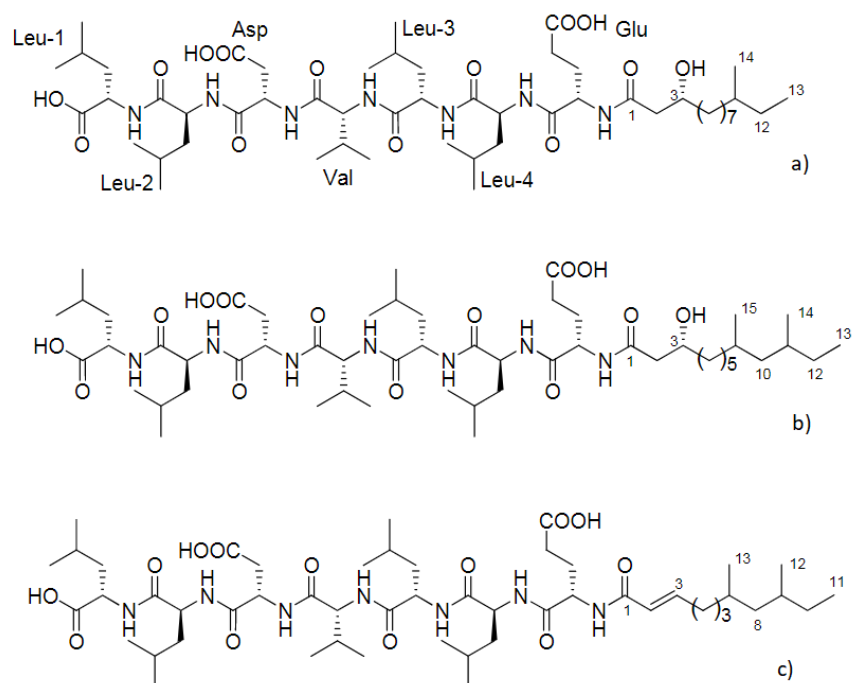


Figura 8. Gageostatinas A, B y C. Tomado de Tareq *et al.*, 2014.

2.6.1.3 Dihidroisocumarinas

La estructura de las dihidroisocumarinas se muestra en la figura 9, son compuestos orgánicos fenólicos pertenecientes a la familia de isocumarinas que se caracterizan por tener un anillo de lactona, *B. subtilis* fue reportado primera vez productora de estos compuestos al sintetizar isopropil-8-hidroxi-3,4-dihidroisocumarinas, que llevan una cadena lateral de aminoácido o amida altamente funcionalizada, la cual permite la producción de homólogos de compuestos de interés farmacéutico, ayudando a la obtención y mejora de nuevas rutas sintéticas, de igual manera debido a su grupo metoxi aromático presenta actividades antimicrobianas, debido a que este reaccionaría con enzimas de la membrana celular, causando un estrés eléctrico sobre esta, la producción de estos compuestos se debe a los genes *amiA-O* presentes en *Bacillus* (Limaye *et al.*, 2015; Mao *et al.*, 2020; Qing *et al.*, 2021; N. Tan *et al.*, 2017)

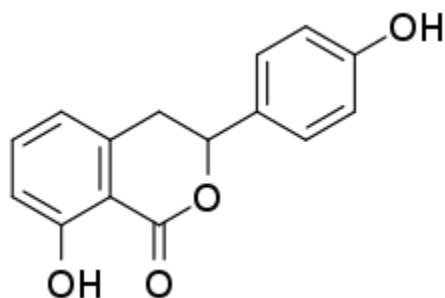


Figura 9. Estructura de las dihidroisocumarinas. Tomado de Limaye *et al.*, 2015.

2.6.2 Metabolitos secundarios volátiles

La producción de metabolitos volátiles en *Bacillus* spp. dependerá de las condiciones durante su desarrollo como nutrientes, temperatura, disponibilidad de oxígeno, esto llevará a la expresión de ciertos genes que deriva a la producción de distintos metabolitos secundarios que responderán en función de las necesidades o estrés en el que se encuentre *B. subtilis*, esta diversificación y producción de metabolitos secundarios volátiles se debe también a la multicelularidad que posee *B. subtilis*, ya que exhibe una variedad de comportamientos multicelulares que incluyen diferentes tipos de motilidad, esporulación, formación de biopelículas, etapa de crecimiento oligotrófico, en una revisión elaborada por Kai (2020) se reportó que se han encontrado 231 metabolitos secundarios volátiles diferentes en 26 aislados de *B. subtilis*, los cuales son mostrados en la figura 10, los metabolitos en mayor cantidad son los compuestos nitrogenados con 32 compuestos, seguido de hidrocarburos con 32, aromáticos 32, cetonas 27, alcoholes 26, ácidos 16, aldehídos 15, ésteres 15, compuestos azufrados 8, silicona 7, otros 5, éteres 4, compuestos halogenados, naftalenos 4, inorgánicos 2 y piranonas con 2 compuestos (Kai, 2020).

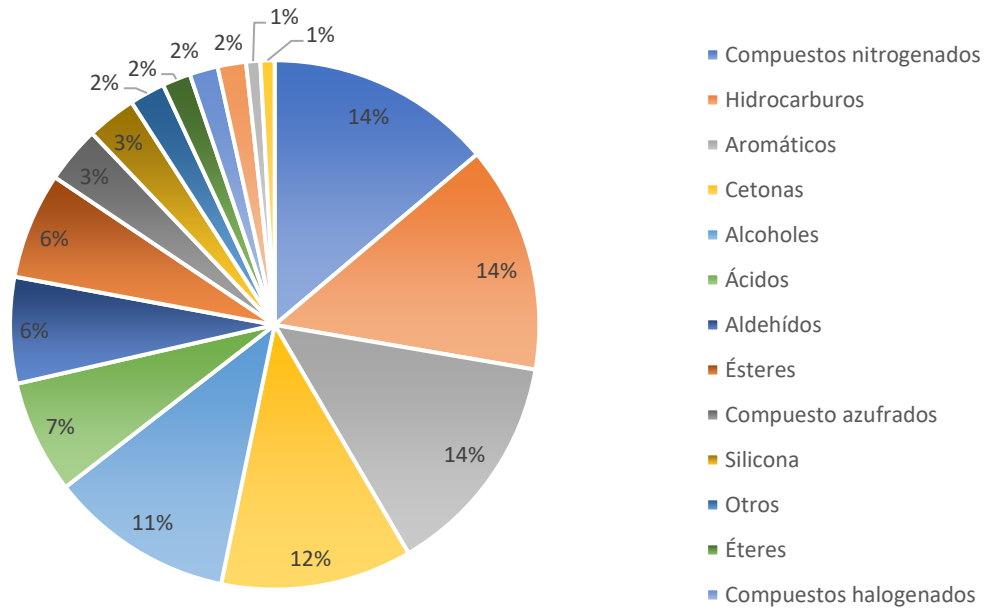


Figura 10. Metabolitos volátiles reportados en *Bacillus subtilis*. Modificado de Kai (2020).

3. Justificación

Se ha observado alta incidencia de infecciones fúngicas en los cultivos intensivos de plantas de interés agrícola, por lo que ha prosperado el uso de sustancias antifúngicas de tipo sintético. Sin embargo, el uso de estas sustancias puede dañar la salud de los productores, los consumidores y afectar el medio ambiente. A nivel Biotecnológico se ha explorado la posibilidad de hallar bacterias como agentes de control de hongos fitopatógenos, porque estas bacterias pueden sintetizar varias sustancias del metabolismo secundario con actividad antifúngica. En la BUAP se han aislado bacterias del género *Bacillus* spp. las cuales la literatura reporta como posibles antagonistas de hongos, se propone explorar la posibilidad de uso de tres cepas de *Bacillus* spp. como agentes de control de infecciones fúngicas en cultivos de fresa confinados en invernaderos de Atlixco, Puebla.

Hipótesis

Las cepas de *Bacillus* spp. 49-1, 49-2 y 49-3 aisladas de la rizosfera de plantas medicinales producirán metabolitos secundarios con capacidad antifúngica contra hongos fitopatógenos de interés agronómico.

4. Objetivos

Objetivo general

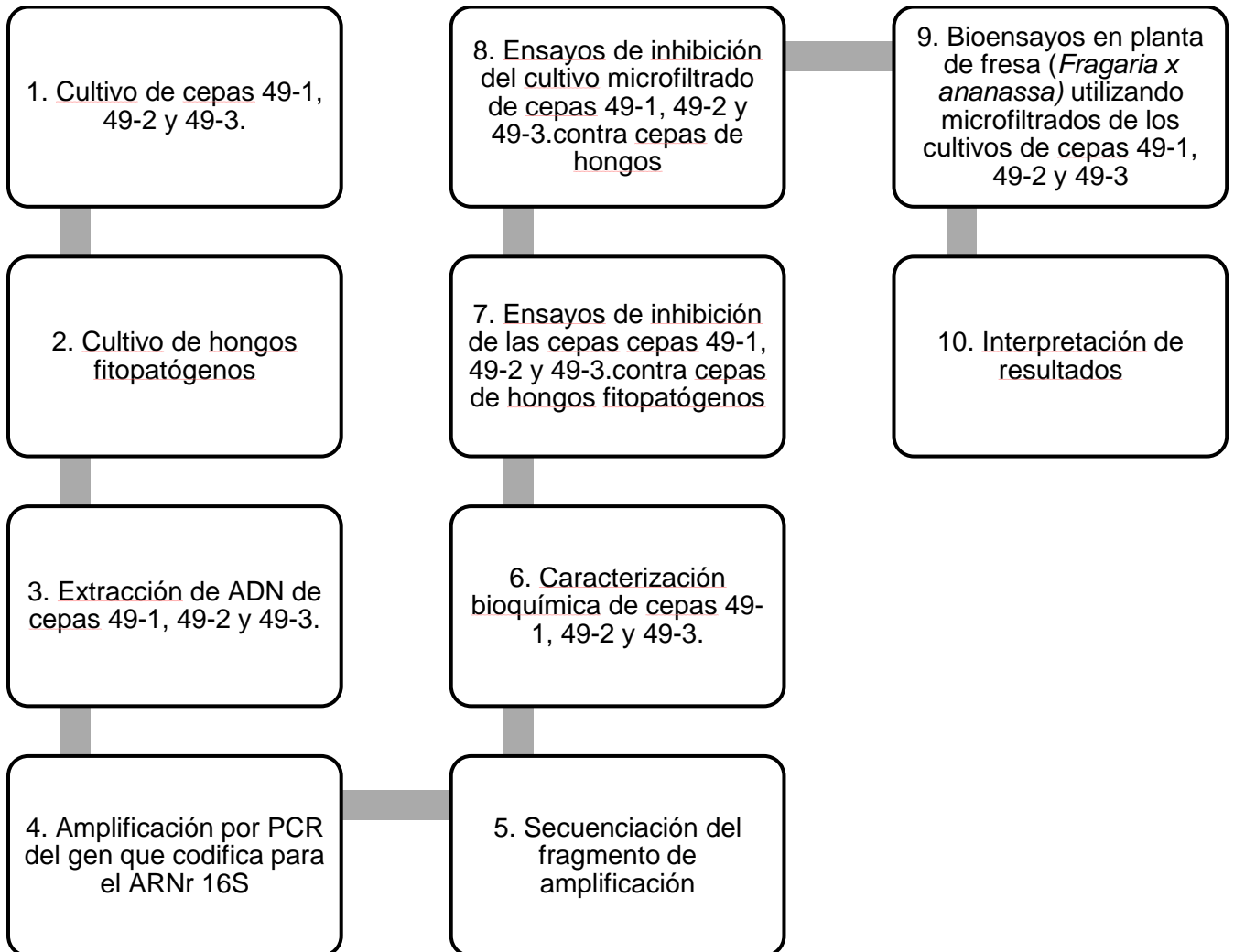
- Determinar la actividad antifúngica de microfiltrados producidos por cepas de *Bacillus* spp.

Objetivos particulares

- Determinar la capacidad antifúngica de tres cepas de *Bacillus* spp. contra cinco tipos de hongos fitopatógenos, en cultivos elaborados in vitro.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios presentes en los microfiltrados de cepas de *Bacillus* spp. contra hongos fitopatógenos.
- Evaluar la capacidad antifúngica de los microfiltrados de cultivos de *Bacillus* spp. en experimentos de infección fúngica de fresa en condiciones de invernadero.

5. Materiales y métodos

5.1 Diagrama de trabajo



5.2 Cultivo de *Bacillus* spp.

5.2.1 Cepas utilizadas

Las cepas que se utilizaron en este proyecto fueron proporcionadas por el laboratorio 402 del EMA 6 de Ciudad Universitaria – BUAP, pertenecientes a la colección de microorganismos aislados de rizosfera de plantas medicinales de la Dra. Norma Elena Rojas Ruiz. Por análisis previos de antagonismo (Rojas Ruiz, comunicación personal) se seleccionaron tres distintas cepas de *Bacillus* spp.: 49-1, 49-2 y 49-3.

5.2.2 Medio de cultivo

Se usaron dos medios de cultivo, el medio LB para crecimiento en placas y el medio líquido TrisG para favorecer la esporulación de *Bacillus* spp. la composición se resume en la tabla 5.

Tabla 5. Composición química de medios de cultivo utilizados para *Bacillus* spp.

Medio de cultivo	Composición química
LB	Peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5 %, NaCl 0.5 %, agar 1.5% (opcional para medio gelificado), pH=7.0
TrisG	CaCl ₂ .H ₂ O 0.008%, FeSO ₄ .7H ₂ O 0.00025%, CuSO ₄ .5H ₂ O 0.0005%, ZnSO ₄ .7H ₂ O 0.0005 %, MnSO ₄ .H ₂ O 0.005 %, MgSO ₄ 0.02%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2%, Glucosa 0.2%, Tris 50 mM pH=7.5, Extracto de levadura 0.15%, K ₂ HPO ₄ 0.05%, agar 1.5% (opcional para medio gelificado).

5.2.3 Condiciones de cultivo de cepas de *Bacillus* spp.

Las cepas fueron cultivadas en placas Petri con medio LB y TrisG mediante la técnica de estría cruzada y fueron incubadas a 30°C por 24h. Para la obtención de cultivos en fase de esporulación se inocularon tubos falcón de 50 ml conteniendo

15 ml de medio TrisG con un asada del cultivo a partir de medio sólido de las cepas de *B. subtilis*, los tubos fueron incubados con agitación a 30°C por 72h.

5.2.4 Tinciones diferenciales

Para la caracterización morfológica microscópica de la cepa, se realizaron tres tipos de tinciones: de Gram, verde de malaquita y azul de metileno.

- La tinción de Gram se hizo de acuerdo al protocolo (Brucker, 1986):
 1. Se realizó un frotis de las cepas en un portaobjetos.
 2. Se fijó las muestras por calor.
 3. Se agregó el colorante cristal violeta y esperar un minuto.
 4. Se Enjuagó con agua.
 5. Se agregó lugol y espero un minuto.
 6. Se agregó alcohol acetona y espero entre 5 y 30 segundos (las bacterias Gram negativas se decoloran, las Gram positivas no).
 7. Se enjuagó con agua.
 8. Se agregó safranina y esperar un minuto. Este colorante dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas.
 9. Se lavó levemente con agua.

- La tinción de verde malaquita para la observación de esporas se hizo de acuerdo con el método Schaeffer-Fulton:
 1. Se realizó un frotis de los organismos en portaobjetos.
 2. El frotis seSecó al aire y se fijó con calor.
 3. Se agregó al frotis solución de verde malaquita (tinción para la espora).
 4. Se calentó el portaobjetos hasta ebullición durante 5 minutosSe lavó con agua destilada.
 5. Se adicionó safranina durante 30 segundos.
 6. Se enjuagó el frotis con agua destilada.
 7. Finalmente, la preparación se secó al aire y examinó bajo el microscopio.

- La tinción con azul de metileno se hizo de acuerdo al protocolo (Oktari *et al.*, 2017):
 1. Se realizó un frotis de los microorganismos en portaobjetos.
 2. Se secó al aire y fijar con calor el frotis.
 3. Se agregó al frotis os gotas de la solución de azul de metileno.
 4. Se cubrió con cubreobjetos.
 5. Se examinó bajo el microscopio.

5.3 Cultivo de hongos fitopatógenos

5.3.1 Cepas utilizadas

Las cepas que se utilizaron en este trabajo fueron proporcionadas por el laboratorio de producción de biológicos 409-EMA6 BUAP, siendo las cepas: *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.*, *Mucor sp.*, *Fusarium moniliforme* y *Penicillium sp.*

5.3.2 Medio de cultivo

Para el crecimiento de cultivo de los hongos se utilizó el medio agar papa dextrosa (PDA) con la siguiente modificación, se utilizó agua de papas naturales hervidas como fuente de almidón, teniendo la formulación final:

- Solución líquida de papa dextrosa casera (obtenida de sopa de papa) 100%
- Dextrosa 4%
- Agar 1.5% (opcional para medio sólido)

5.4 Caracterización bioquímica de *Bacillus* spp.

5.4.1 Prueba amilasa

Para la prueba enzimática de amilasas se preparó medio de cultivo almidón de acuerdo con la siguiente formulación:

- Almidón 15%
- Agar 1.5%

Posteriormente se realizó el siguiente protocolo:

1. Se inoculó una sola muestra del organismo que se analizará por sembrado masivo en placa medio almidón.
2. Se incubó las placas inoculadas con bacterias durante 48 horas a 32°C.
3. Después de la incubación, se inundó la superficie de las placas con solución de yodo con un cuentagotas durante 30 segundos.
4. Se retiró el exceso de yodo.
5. Finalmente se examinó la zona clara alrededor de la línea de crecimiento bacteriano.

5.4.2 Prueba proteasas

1. Se utilizó el medio comercial nutriente de gelatina con la composición: Digerido enzimático de gelatina (5%), extracto de carne (3%), gelatina (120%), por 1000 ml, pH= 6.8.
2. En tubos de ensayo de 15 ml se vertieron 5 ml del medio de cultivo gelatina.
3. Inoculó la gelatina en profundidad con un asa bacteriológica de un cultivo de 24 horas.
4. Los tubos fueron incubados a 35°-37°C durante un máximo de 10 días.
5. Se observó la licuefacción a baja temperatura.

5.4.3 Prueba hidrolisis de fosfolípidos

Para la prueba de fosfolipasas se preparó el medio de cultivo yema de huevo de acuerdo con la formulación:

- Triptona 0.5%
- Extracto de levadura 0.25%
- Glucosa 0.1 %
- Yema de huevo diluida en agua destilada 5%
- Agar 1.5%

El protocolo utilizado fue:

1. Se inoculó 1 gota de 100 μ L de *Bacillus* spp. en el centro del medio agar yema de huevo.
2. Las cajas Petri fueron incubadas Incubó a 37°C por 48 horas.
3. Se observó algún precipitado opalescente.

3.4.4 Prueba de catalasas

En un cultivo de *Bacillus* spp. en medio agar LB con 24 h de crecimiento se añadieron 5 gotas de peróxido de hidrógeno en el centro de la caja Petri para evaluar su actividad bioquímica.

3.4.5 Pruebas API

El índice de perfil analítico (Analytical Profile Index, API) es una manera de clasificar las bacterias y caracterizarlas bioquímicamente, según su actividad enzimática, se realizaron pruebas que fueron seleccionadas para el género *Bacillus* empleando el sistema API siguiendo las especificaciones del proveedor.

5.5 Extracción de ADN de *Bacillus* spp.

5.5.1 Para la extracción de ADN genómico se utilizó el método Fenol-Cloroformo Alcohol Isoamílico:

1. A partir de cultivo en placa de 8 horas se tomó una colonia e inoculó en medio LB líquido.
2. Se incubó con agitación a 200 revoluciones por minuto (rpm) y 30°C durante 6 horas.
3. Se colocó 1.5 mL del cultivo en 2 tubos Eppendorf y centrifugó a 11 000 rpm durante 5 min, desechó sobrenadante.
4. Se agregaron a pastilla 150 μ L de buffer de lisis y 30 μ L de lisozima.
5. Se incubaron los tubos por 10 min a 37°C, para completar la lisis se adicionaron 22 μ L de sarcosil al 20%.

6. Los tubos se invirtieron suavemente, posteriormente se agregó 1 volumen de fenol y se mezcló por inmersión.
7. Los tubos fueron centrifugados por 5 min a 11 000 rpm y se transfirió la fase acuosa a otro tubo.
8. Se adicionó 1 volumen de fenol y mezcló por inversión durante 5 min.
9. Se centrifugó por 5 min a 11 000 rpm y transfirió la fase acuosa a otro tubo.
10. Se adicionó 1 volumen de cloroformo y se homogenizó por inversión
11. Se centrifugó 5 min a 11 000 rpm.
12. Se transfirió la fase acuosa y se adicionó un volumen de cloroformo, los tubos se agitaron y fueron centrifugados por 5 min a 11 000 rpm.
13. La solución de ADN se colocó en hielo y se adicionó 0.1 volumen de acetato de sodio al 10% 3M pH7 y 1 volumen de etanol frío.
14. La mezcla se centrifugó a 11 000 rpm por 5 min.
15. La pastilla de ADN se lavó con etanol al 70% y se re-suspendió en 20 µL de agua libre de nucleasas.
16. El ADN se almacena a -20°C.

Electroforesis en gel de agarosa

Posteriormente se realizó una electroforesis para visualizar el ADN genómico en un gel de agarosa al 0.8%, el cual fue teñido con 1 µL de agente intercalante Smartglow Loading Dye por cada 3 µL de muestra de ADN y se utilizó el marcador de talla molecular 1KB Plus DNA Ladder, el ADN genómico fue visualizado empleando un transiluminador Maestrogene.

5.5.2 PCR para amplificar el gen que codifica el ARN 16S

La reacción de cadena en polimerasa (PCR) se realizó para un volumen final de 25 µL utilizando los componentes presentados en la tabla 6.

Se utilizaron los oligonucleótidos utilizados por (Márquez *et al.*, 2014 con las secuencias:

TXBA1: 5'AGAGTTTGATCATGGCTCA3'

TXBA 101: 5'AGGAGGTGATCCAACCGCA3'.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

- La etapa de desnaturalización tuvo una duración de 1:30 minutos a 94°C y una etapa de mantenimiento de 30 segundos a 94°C
- La etapa de hibridación tuvo una duración de 45 segundos a 55°C
- La etapa de elongación tuvo una duración de 2 minutos a 72°C y
- Una etapa de mantenimiento de 4 minutos a 72°C.
- En total fueron realizados 25 ciclos de PCR.

Tabla 6. Componentes para la reacción de PCR de 25 y 50 µL.

Componente	Reacción de 25 µL	Reacción de 50 µL
Taq Buffer Accuris con magnesio	2.5 µL	5 µL
dNTP's	0.5 µL	1 µL
Primer TXBA 1 (forward)	0.5 µL	1 µL
Primer TXBA 101 (reverse)	0.5 µL	1 µL
Taq polimerasa	0.5 µL	1 µL
Agua libre de nucleasas	19 µL	38 µL
ADN genómico	1 µL	3 µL

Finalizada la amplificación se realizó una electroforesis para visualizar el amplificado que codifica para el ARNr 16S con un tamaño de 1500 pb.

Posteriormente se realizaron reacciones de 50 microlitros con la finalidad de enviar a secuenciar el fragmento amplificado.

5.5.3 Purificación de los fragmentos amplificados por PCR

Se realizó una purificación de productos amplificados por PCR con el fin de enviar a secuenciación, se utilizó el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System de PROMEGA y se siguieron las especificaciones del proveedor.

5.5.4 Secuenciación de ADN e identificación por la técnica MALDI-TOF.

Los fragmentos purificados fueron enviados a secuenciar al laboratorio de LANGEBIO del CINVESTAV.

Paras las cepas 49-2 y 49-3 se fueron enviadas al laboratorio Asesores especializados en laboratorios 21 poniente para la identificación por la técnica MALDI-TOF.

5.5.5 Análisis bioinformático

Con la finalidad de identificar a los organismos, se compararon las secuencias obtenidas con las de microorganismos relacionados taxonómicamente en la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI, del inglés) utilizando la herramienta BLASTn (BLAST nucleotide) (Altschul et al., 1990). A partir de los resultados se colectaron secuencias de microorganismos taxonómicamente relacionados dentro de la base de datos “Nucleotide” del NCBI, seleccionando secuencias que habían sido publicadas en artículos relacionados descripción de la taxonomía del género *Bacillus*, el conjunto de secuencias fue alineado con el programa Seaview (Galtier et al., 1996). La reconstrucción filogenética se realizó por el método de máxima verosimilitud, usando el programa MEGA 11 software (Tamura et al., 2021).

5.6 Ensayos de inhibición de *Bacillus* spp. contra hongos fitopatógenos

5.6.1 Preparación de factores de dilución de los hongos fitopatógenos

Para los ensayos de inhibición se realizó una dilución de un cultivo de cada hongo siguiendo los pasos:

1. Se tomó 1 ml de cultivo líquido de papa dextrosa y vertió en tubo con 9 ml de agua destilada estéril (factor de dilución 1x10).
2. Se tomó 1 ml del tubo 1x10 y verter en un tubo con 9 ml de agua destilada estéril.
3. Se repitió con cada uno hasta alcanzar el nivel de turbidez de la muestra sea comparable con el estándar 0.5 de la escala McFarland.
4. Se realizó el mismo procedimiento con cada hongo.

5.6.2 Conteo de esporas en cámara de Neubauer

Con un factor de dilución comparado con el de 0.5 de la escala de McFarland se hará un conteo de esporas en la cámara de Neubauer siguiendo los siguientes pasos:

1. Se limpió la cámara de Neubauer y el cubreobjetos con EtOH al 70% y se colocó la cubierta de vidrio en el área central de la cámara.
2. Se tomaron 10 µL de la disolución y se colocó la punta de la pipeta contra el borde del cubreobjetos y se expulsó lentamente el líquido hasta que la cámara de recuento se llenó.
3. En enfoque 40X se contaron las esporas de cada muestra
4. Utilizando la ecuación:

$$\frac{\text{Células}}{\text{mm}^3} = \text{No. de células contadas} \left(\frac{1}{\text{factor de dilución}} \right)$$

Contaron el número de células.

5.6.3 Extracción de microfiltrado de cepas 49-1, 49-2 y 49-3 en medio líquido TrisG

Se utilizó un sistema de microfiltración, a partir de un medio TrisG líquido de *B. subtilis* con una semana de incubación se filtró su sobrenadante:

1. 10 ml de cultivo líquido a 72 h de incubación se filtraron utilizando un papel filtro de tamaño de poro 1 µm y diámetro 47 mm.

2. El microfiltrado se pasó por un sistema de Filtros de jeringa PTFE, membrana, 25 μm de diámetro y 0.22 μm de tamaño de poro.
3. Para confirmar la esterilidad, la muestra se incubó por 24 h a 35°C y posterior se sembró por técnica de sembrado masivo una muestra de 10 μL del extracto en cajas Petri de LB.

5.6.4 Ensayo de inhibición

El ensayo de inhibición se hizo de acuerdo con lo siguiente:

1. En una placa Petri de medio LB se inoculó una gota de 10 μL de la concentración correspondiente al 0.5 de la escala McFarland del hongo y se esparció usando un asa bacteriológica de vidrio.
2. La caja se incubo a temperatura ambiente durante 1 hora, con la finalidad de proporcionar ventaja al crecimiento del hongo.
3. Transcurrida 1 hora se colocó en el centro de la caja Petri una gota de 10 μL del microfiltrado y en otra caja, una gota de 10 μL del cultivo líquido de *Bacillus* spp.
4. Repitió para cada hongo y cepa bacteriana.
5. Las cajas Petri fueron incubadas durante 7 días a temperatura ambiente, se realizaron observaciones cada 24 h durante este tiempo.

3.7 Bioensayos en *Fragaria x ananassa*

3.7.1 Condiciones de cultivo de plántulas de fresa

Se obtuvieron un total de 100 plántulas de fresa del vivero “creciendo tu negocio” ubicado en las coordenadas (18.921958269868817, -98.44166888169394) con un tiempo de 14 días, una vez obtenidas se colocaron en bolsas negras individuales de 15x25 cm, se llenó de tierra negra tipo humus comprada en el mismo vivero y se mantuvieron en dos invernaderos de 1.75x1 m y 1.90x 1 m con 5 niveles y con una cobertura de plástico respectivamente, cada uno con 50 plantas y se mantuvieron en aclimatación por otros 10 días con un riego de 40 ml de agua cada tercer día, las

características del mantenimiento del invernadero se presentan en la tabla 7. A la tierra y agua suministrada se les midió el valor de pH utilizando un potenciómetro portátil marca ISOLAB. El registro de humedad y temperatura se midió utilizando un Termómetro Higrómetro Digital marca Uplayteck.

Tabla 7. Características de mantenimiento del invernadero

Factor	Valor
pH de tierra	6.4
pH de agua de riego	6.8
Temperatura dentro del invernadero	21 °C
% Humedad dentro del invernadero	62 %
Temperatura exterior	25°C
% Humedad exterior	54 %
Entrada de luz	Sí, 4 h diarias
Aireación	No

3.7.2 Pruebas de patogenicidad in vivo en *F. x ananassa*

3.7.2.1 Cultivo de hongos fitopatógenos

Para el bioensayo se trabajaron dos hongos: *Fusarium moniliforme* y *Mucor sp.*, dichos hongos se cultivaron en medio líquido PDA y se incubaron con agitación a 35°C por 7 días, posterior se realizaron diluciones en tubos de cristal con agua destilada estéril hasta llegar al valor 0.5 de la escala de McFarland para realizar bioensayos.

3.7.2.2 Cultivo de *Bacillus* spp.

Se cultivaron las cepas 49-1, 49-2 y 49-3 en 200 ml de medio líquido TrisG por duplicado y se incubaron con agitación a 35°C por 10 días, pasado los 10 días, a los inóculos se realizaron tinciones de Gram y fueron sembrados en cajas Petri de agar TrisG para verificar la pureza del cultivo líquido.

3.7.2.3 Microfiltración de *Bacillus* sp.

Para la microfiltración del medio se utilizó un sistema de filtración Nalgene® vacuum filtration system capacidad de 500 ml con filtros de membrana Whatman de 0.22 μm conectada a una bomba de vacío Robinair modelo 15115, el sobrenadante se recolectó en matraces de 500 ml estériles. Posteriormente se realizó un cultivo del microfiltrado en cajas Petri de TrisG para verificar su esterilidad.

3.7.2.4 Inoculación de hongos en plantas

Se utilizó el método de inoculación por aspersión en interiores (Khanal *et al.*, 2021), con un inóculo de 0.5 ml (conteniendo 107 esporas/ml), disuelto en 4.5 ml de agua destilada estéril y se asperjaron los 5 ml en cada planta, 2.5 ml en hoja y 2.5 ml en raíz. En total 50 plantas fueron inoculadas con *Mucor* sp. (figura 14) y las otras 50 plantas se inocularon con *Fusarium moniliforme* siguiendo la misma distribución que la mostrada para *Mucor* sp.

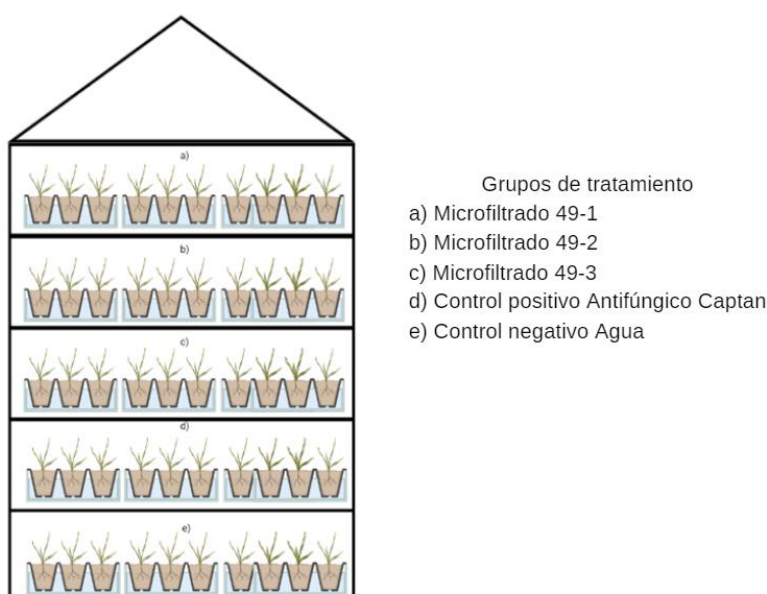


Figura 14. Distribución de fresas de plantas infectadas con *Mucor* spp. en invernadero interior.

3.7.2.5 Inoculación de microfiltrados de *Bacillus* spp. en plantas

Pasadas 24 h de la inoculación de los hongos, se inoculó el microfiltrado de las cepas por el método de aspersión en interiores utilizando 5 ml del filtrado de cada

cepa, adicional de un grupo control positivo con un antifúngico comercial y un grupo control negativo utilizando agua. La división de tratamientos fue la siguiente:

- a) Microfiltrado de la cepa 49-1: 10 plantas
- b) Microfiltrado de la cepa 49-2: 10 plantas
- c) Microfiltrado de la cepa 49-3: 10 plantas
- d) Antifúngico comercial "Captan": 10 plantas
- e) Control negativo agua: 10 plantas

Dicha división se utilizó para ambos grupos de hongos.

Para la aplicación del antifúngico comercial Captan, se preparó siguiendo las instrucciones del proveedor.

Y todos los grupos se monitorearon cada 24 h.

3.8 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los experimentos de inhibición fúngica, promoción del crecimiento de las plantas y porcentaje de plantas marchitas fueron determinados empleando un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y las diferencias significativas entre los valores medios se determinaron mediante las pruebas Post Hoc de Tukey- Kramer utilizando RStudio para Windows. Se utilizó un nivel de significación de $p < 0.05$ para determinar las diferencias significativas de los datos.

6. Resultados

6.1 Evaluación bioquímica

Las cepas de 49-1, 49-2 y 49-3 fueron cultivadas en cajas Petri, observándose la morfología característica de las colonias de microorganismos del género *Bacillus* (figura 15) en medio TrisG, se realizaron tinciones de Gram, azul de metileno y verde de Malaquita y pruebas bioquímicas de producción de enzimas. Las tinciones de azul de metileno permitieron observar la morfología bacteriana y la formación de espora, las tinciones de Gram (figura 16) realizadas en las tres cepas indicaron que son bacterias Gram positivas, ya que poseen una membrana citoplasmática y una pared celular gruesa de capa de peptidoglucano. La segunda tinción con verde de malaquita (figura 17) nos muestra la fase de esporulación de la cepa 49-1 a 48 h de incubación en agitación a temperatura de 28°C, se observó la presencia de esporas y su localización en algunas células vegetativas en proceso de esporulación, en la imagen 17 se aprecia que las esporas fueron traslucidas y conservaron el color del verde de malaquita, y las células fueron teñidas de color rojo pardusco o rosado.

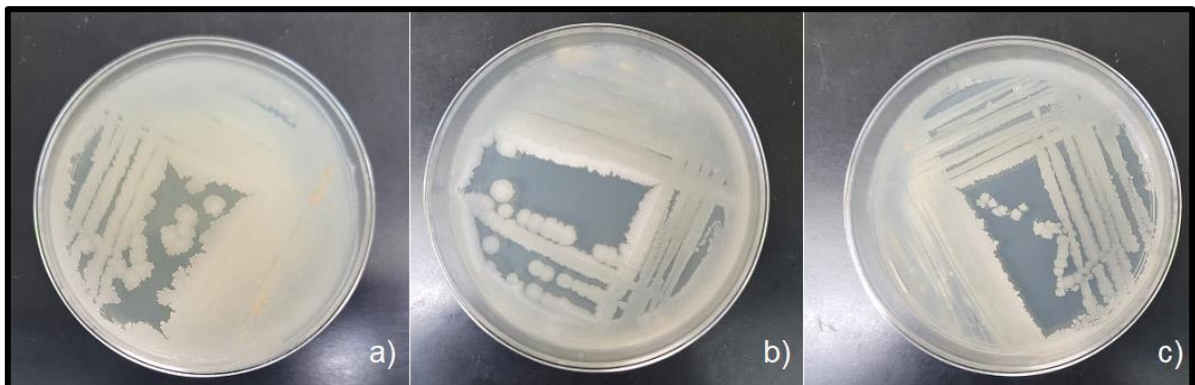


Figura 15. Cultivo de cepas de *Bacillus* spp. en medio TrisG. a) cepa 49-1. b) cepa 49-2. c) cepa 49-3.

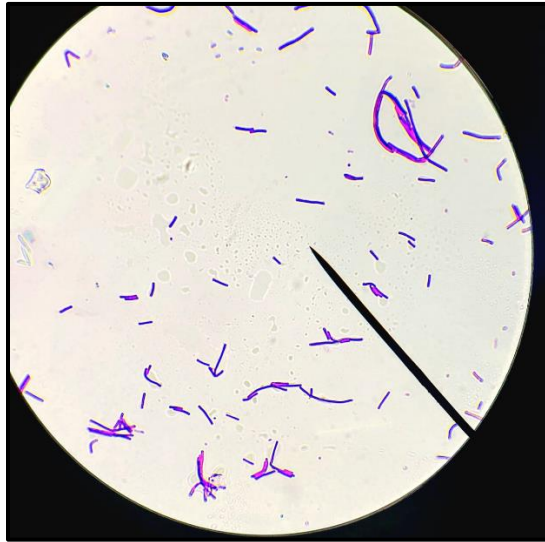


Figura 16. Tinción de Gram de cepa 49-2, se observan bacilos Gram positivos.

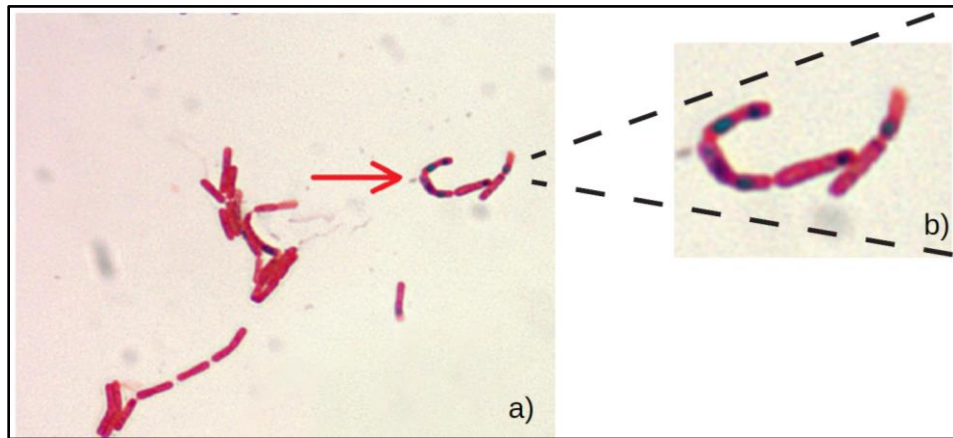


Figura 17. Tinción de esporas de *Bacillus sp.* utilizando verde de malaquita. a) Micrografía a 100X, se observan células vegetativas teñidas de rojo y las esporas en verde. b) Magnificación de una sección de la imagen para mejor apreciación.

6.1.1 Pruebas bioquímicas

6.1.1.1 Prueba de producción de amilasas

Las pruebas de amilasa se realizaron a las cepas 49-1, 49-2 y 49-3 respectivamente para la detección de amilasas de acuerdo con el protocolo descrito en metodología, en la figura 18 se presenta el resultado del experimento, donde se puede observar una zona translúcida en cada placa, debido a la degradación de almidón, lo que indica la secreción de amilasas por parte de las tres cepas.

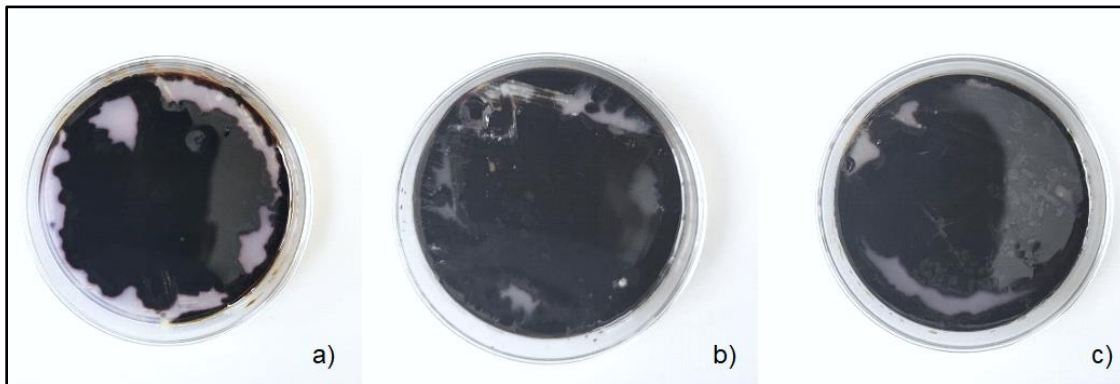


Figura 18. Evaluación de producción de amilasas en *Bacillus* spp. a) cepa 49-1; b) cepa 49-2; c) cepa 49-3.

3.4.5.1 Prueba de producción de proteasas

La presencia de proteasas se reporta en las tres cepas (figura 19), la excreción de esta enzima se aprecia por la hidrolización de la gelatina. En el inciso d) se aprecia que el control negativo mantiene su consistencia sólida a baja temperatura y sin crecimiento bacteriano, mientras que las imágenes a)-c) se aprecia que se encuentran en forma líquida a baja temperatura y con crecimiento de las cepas 49-1, 49-2 y 49-3.

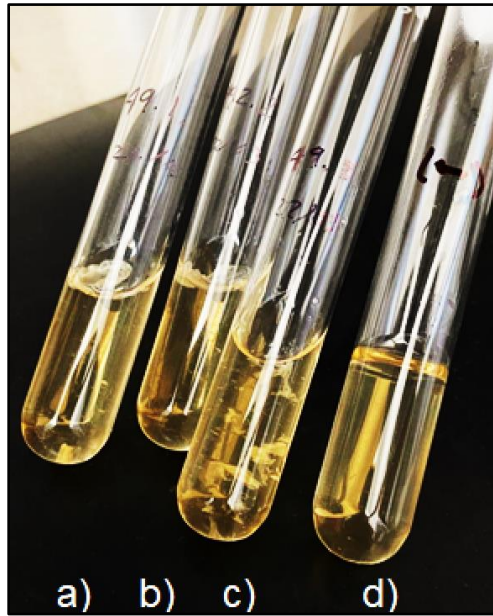


Figura 19. Evaluación de proteasas en *Bacillus* sp. a) cepa 49-1; b) cepa 49-2; c) cepa 49-3; d) control negativo.

3.4.5.2 Prueba de hidrolisis de fosfolípidos

Se identificó la presencia de fosfolipasas producidas usando el medio de cultivo de yema de huevo, la yema de huevo tiene una composición lipídica de 65% triglicéridos, 30% fosfolípidos y 5% colesterol (Anton, 2013), por lo que fue empleada para evidenciar la presencia de lipasas en las cepas, transcurrido el tiempo de incubación de 24 h a 30°C, en la figura 20 se aprecia la hidrolización del medio de cultivo de yema de huevo, la ruptura de este medio indica la presencia de fosfolipasas, en las tres cepas se muestra su actividad.

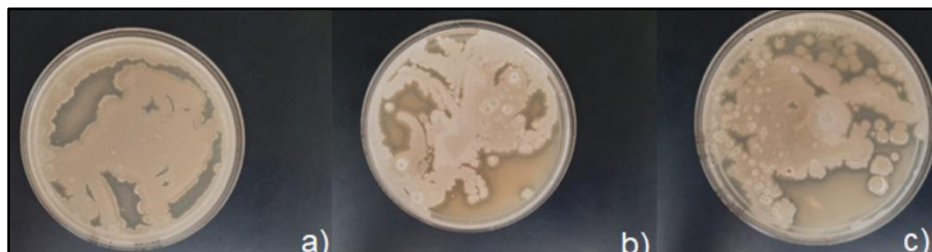


Figura 20. Evaluación de fosfolipasas en *Bacillus* sp. a) cepa 49-1; b) cepa 49-2; c) cepa 49-3.

3.4.5.3 Prueba de producción de catalasas

La evaluación enzimática de catalasas es una característica de bacterias aerobias, estas descomponen el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El desprendimiento de burbujas procedentes del oxígeno indica que la prueba es positiva, los resultados de esta prueba se presentan en la figura 21. En la imagen se aprecia la descomposición del peróxido de hidrógeno, la presencia de burbujas en las tres placas indica la presencia de catalasas por parte de las cepas.

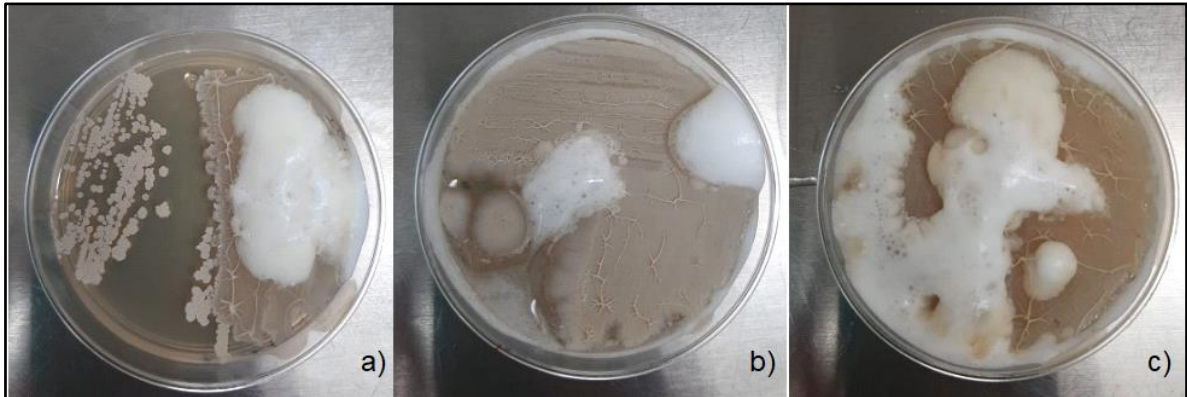


Figura 21. Evaluación de catalasas en *Bacillus* sp. a) cepa 49-1; b) cepa 49-2; c) cepa 49-3.

Los resultados de la evaluación enzimática de las cepas de *Bacillus* sp., se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Evaluación enzimática de las cepas de *Bacillus* sp.

Prueba bioquímica	49-1	49-2	49-3
Amilasas	+	+	+
Proteasas	+	+	+
Fosfolipasas	+	+	+
Catalasas	+	+	+

Nitrato reductasa	+	+	+
Triptofanasas	-	-	-
Ureasas	-	-	-
Glucosa oxidasa	+	+	+
Manitol deshidrogenasa	+	-	-
Lactasa	+	+	+
Sacarasa	+	+	+
Maltasa	+	+	+
Salicinasa	+	+	+
Arabinosa-isomerasa	+	+	+
β -glucosidasa	-	-	-
Lipasas	+	+	+
β -1,4-glucosidasa	+	-	-
Manosa-isomerasa	-	-	-
Melezitosa deshidrogenasa	+	+	+
α -galactosidasa	-	-	+
Succinato deshidrogenasa	-	-	-
Ramnosidasa	-	-	-
Trehalasa	+	+	+
Arginina dihidrolasa	+	+	+
β -galactosidasa	+	+	+
Disacaridasas	+	+	+

El resultado positivo y negativo de las cepas 49-1, 49-2 y 49-3 a las pruebas bioquímicas sometidas, coincide con la actividad enzimática reportada para el género *Bacillus*.

3.5 Extracción y amplificación por PCR del gen que codifica para el ARNr 16S y análisis bioinformático de las secuencias

3.5.4 Extracción de ADN genómico

Se extrajo el ADN genómico de las tres cepas de *Bacillus* sp., en la figura 22 se observa el gel de agarosa, observando bandas brillantes, de una cantidad suficiente para poder realizar la amplificación correspondiente.

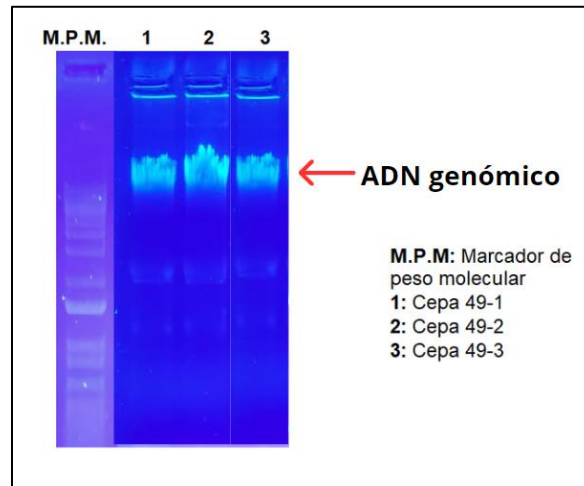


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% del ADN genómico de las cepas de *Bacillus* sp.

3.5.5 Amplificación por PCR del gen que codifica al ARNr 16S

Se realizó la técnica de PCR para amplificar el gen que codifica para el ARNr 16S de las cepas 49-1, 49-2 y 49-3, los productos de amplificación fueron observados en gel de electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (figura 23), el tamaño de los amplificados es de aproximadamente 1 500 pb, posteriormente se realizó una reacción de amplificación en 50 μ L (figura 23) para tener mayor cantidad del amplificado y enviar a secuenciar.

3.5.6 Purificación por columna de los productos de PCR

Los productos de amplificación por PCR fueron purificados con promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit, los fragmentos fueron verificados mediante una electroforesis al 0.8%, estos se presentan en la figura 23.

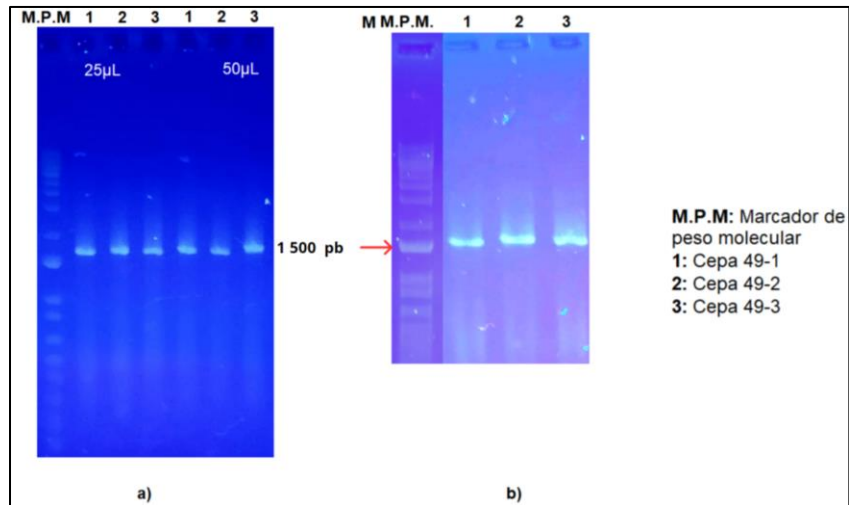


Figura 23. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. a) Amplificación del gen codificante ARNr 16S en 25 y 50 µL b). Amplificados purificados por columna.

3.5.7 Análisis bioinformático del gen que codifica para el ARNr 16S

EL fragmento amplificado por PCR del gen que codifica para el ARNr de la cepa 49-1 fue enviada a secuenciar al laboratorio LANGEBIO del CINVESTAV Unidad Irapuato. Con la secuencia de ADN se realizó un alineamiento en la plataforma NCBI mediante la opción BLAST, posicionando al microorganismo en cercanía de microorganismos del género *Bacillus*.

En la topología construida mediante máxima verosimilitud, el microorganismo se agrupó en un solo clado con las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, confirmando que la cepa 49.1 pertenece al género *Bacillus*.

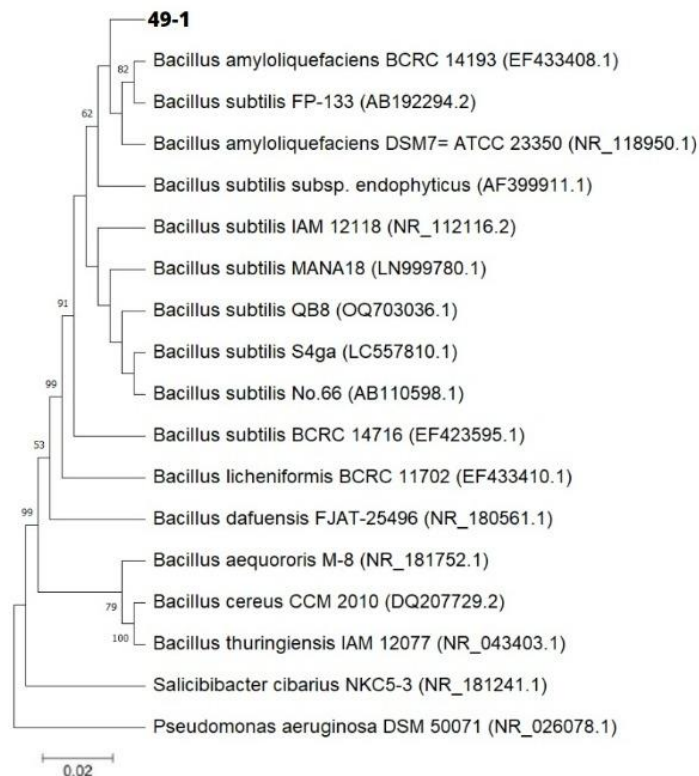


Figura 24. Construcción filogenética de secuencias del gen ARNr 16S de microorganismos del género *Bacillus*. Árbol de máxima verosimilitud, basado en las secuencias parciales del gen ARNr 16S, usando como grupo externo a *Pseudomonas aeruginosa*. Los números en los nodos indican los valores de Bootstrap con 500 repeticiones, mostrando los valores mayores a 50.

El análisis de identificación de los microorganismos 49-2 y 49-3 mediante la técnica de MALDI-TOF, indicó que pertenecen a las especies *Bacillus subtilis* y a *Bacillus amyloliquefaciens* respectivamente.

3.6 Evaluación de antagonismo de *Bacillus* spp. y sus microfiltrado contra hongos fitopatógenos

Se probaron las tres cepas de *Bacillus* spp. y sus microfiltrados contra cinco hongos fitopatógenos distintos: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Fusarium moniliforme* y *Penicillium* sp., los ensayos se realizaron en cultivos masivos de cada

uno de los hongos a los que se agregaron 10µL de cultivo de *Bacillus* sp. en medio TrisG con 48 h de crecimiento, para los ensayos con el microfiltrado se realizaron cultivos masivos de cada uno de los hongos y se colocaron gotas de 10µL de los microfiltrados en el centro de los cultivos de hongos, las cajas Petri fueron incubadas durante 96 horas, en la tabla 9 se muestra un resumen de qué cepas y extractos presentaron inhibición y en la tabla 10 se presentan las dimensiones del halo de inhibición en milímetros (mm). La cepa 49-1 presento antagonismo contra los cinco hongos, con halos de inhibición de 30 mm contra *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. respectivamente y 28 mm contra *Mucor* sp., la cepa 49-2 presentó inhibición contra tres hongos: *Fusarium* sp., *Mucor* sp. y *Penicillium* sp. con diámetros de inhibición de 24, 30 y 26 mm respectivamente, la cepa 49-3 presento inhibición contra los cinco hongos, siendo los mayores halos de inhibición 40 mm contra *Mucor* sp. y 32 mm contra *Penicillium* sp. Los microfiltrados de 49-1 presentaron una inhibición ± 15 mm contra: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., y *Fusarium moniliforme*, los de 49-2 una inhibición de ± 15 mm contra: *Mucor* sp. y *Penicillium* sp. y los de 49-3 una inhibición de ± 20 mm contra *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Fusarium moniliforme* y *Penicillium* sp.

3.6.1 Ensayos de antagonismo de la cepa 49-1 contra hongos fitopatógenos

En los ensayos de evaluación de la actividad antagónica con la cepa 49-1 contra los cinco hongos fitopatógenos, se observó que esta cepa presenta actividad antifúngica contra los cinco hongos *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Fusarium moniliforme* y *Penicillium* sp., sin embargo, su microfiltrado sólo presentó inhibición contra *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. y *Fusarium moniliforme* Figura 25.

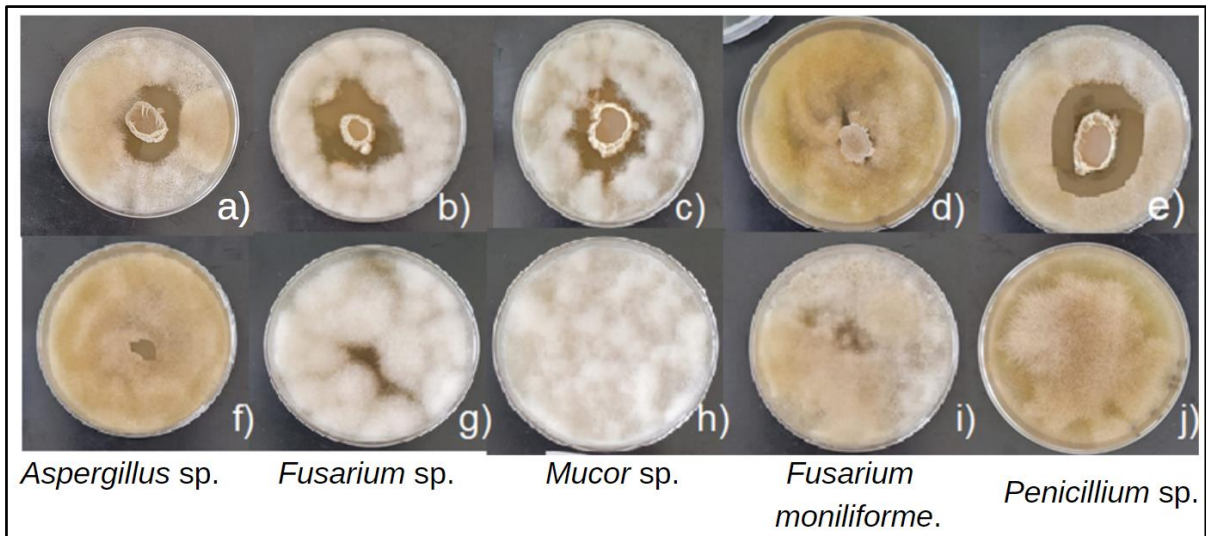


Figura 25. Ensayos de antagonismo de la cepa 49-1 contra los hongos fitopatógenos. a)-e) Inóculo del cultivo en medio TrisG, f)-j) microfiltrado del microorganismo en medio TrisG. a) y f) inhibición contra *Aspergillus* sp., b) y g) inhibición contra *Fusarium* sp., c) inhibición contra *Mucor* sp., d) y i) inhibición contra *Fusarium moniliforme* e) inhibición contra *Penicillium* sp.

3.6.2 Ensayos de antagonismo de la cepa 49-2 contra hongos fitopatógenos

La evaluación de los ensayos de antagonismo de la cepa 49-2 contra los 5 hongos fitopatógenos se muestra en la figura 26, se observó que tanto la cepa como el microfiltrado presentan actividad antifúngica contra tres hongos, lo cual se aprecia por el halo de inhibición en presencia de la cepa antagonista y la ausencia de crecimiento cuando se adicionó el microfiltrado.

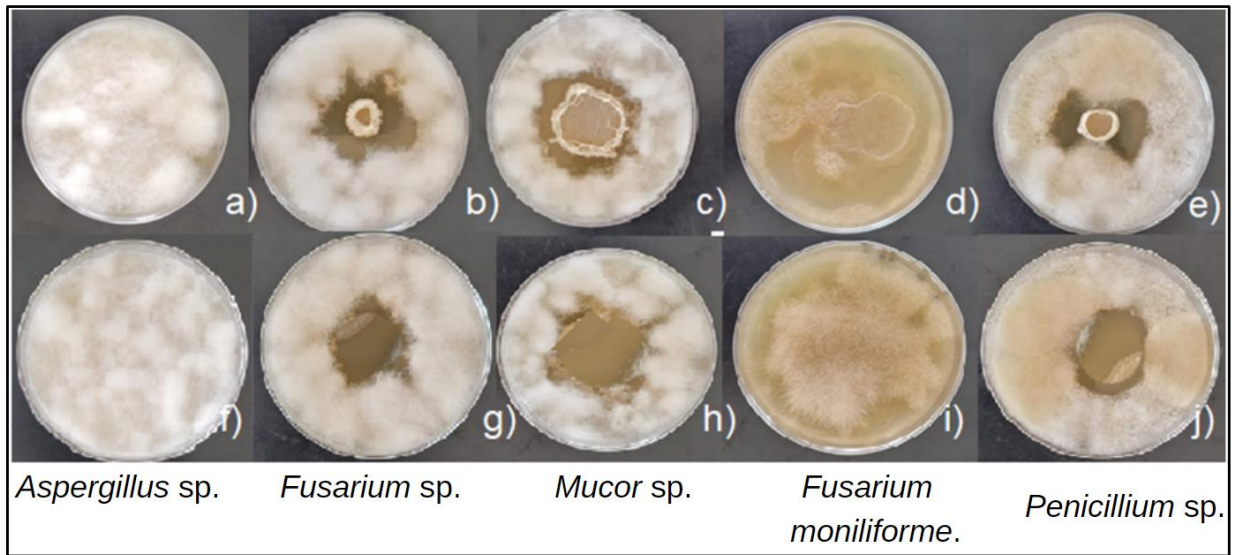


Figura 26. Ensayos de antagonismo de la cepa 49-2 contra los hongos fitopatógenos. a)-e) Inoculo del cultivo en medio TrisG, f)-j) Microfiltrado del microorganismo en medio TrisG. a) y f) sin inhibición contra *Aspergillus* sp., b) y g) inhibición contra *Fusarium* sp., c) y h) inhibición contra *Mucor* sp., d) y i) sin inhibición contra *Fusarium moniliforme* e) y j) inhibición contra *Penicillium* sp.

3.6.3 Ensayos de antagonismo de la cepa 49-3 contra hongos fitopatógenos

La evaluación de la cepa 49-3 contra los hongos fitopatógenos probados se muestra en la figura 27, como se observa en la figura, esta cepa presenta actividad antifúngica contra los cinco hongos, siendo esta cepa y la 49-1 las que muestran mayor efecto.

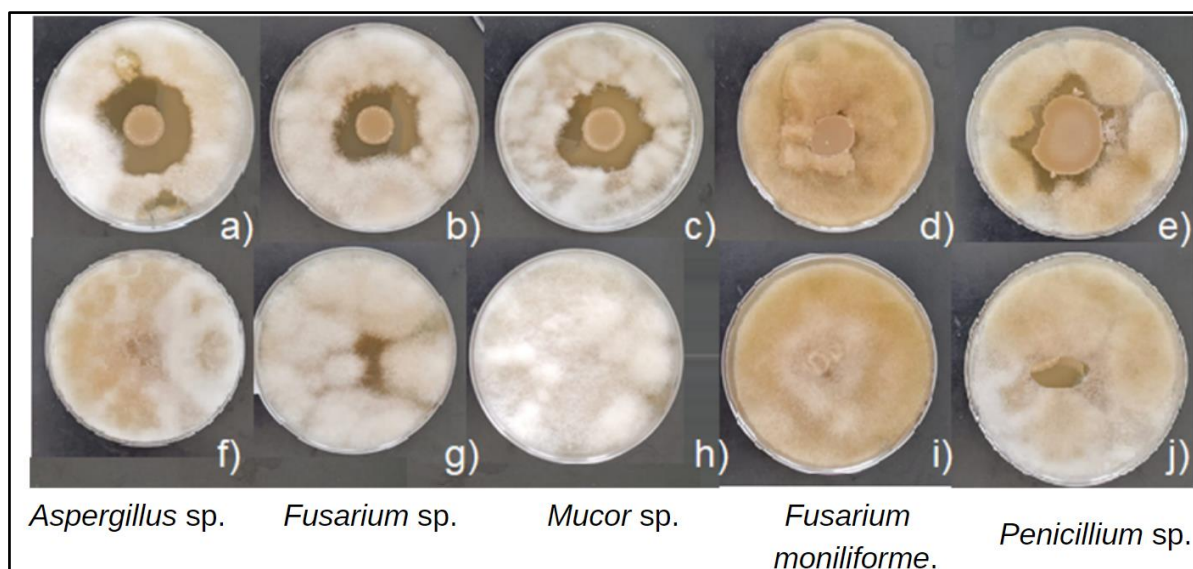


Figura 27. Ensayos de antagonismo de la cepa 49-3 contra los hongos fitopatógenos. a)-e) Inoculo del cultivo en medio TrisG, f)-j) Microfiltrado del microorganismo en medio TrisG. a) y f) inhibición contra *Aspergillus* sp., b) y g) inhibición contra *Fusarium* sp., c) inhibición contra *Mucor* sp., d) e i) inhibición contra *Fusarium moniliforme* e) y j) inhibición contra *Penicillium* sp.

Tabla 9. Resultados de muestra de inhibición de las cepas de *Bacillus* spp. y sus microfiltrados contra los hongos fitopatógenos.

Cepas	Hongos				
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Mucor</i> sp.	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Penicillium</i> sp.
49-1	+	+	+	+	+
49-2	-	+	+	-	+
49-3	+	+	+	+	+
Microfiltrado 49-1	+	+	-	-	+
Microfiltrado 49-2	-	+	+	-	+

Microfiltrado 49-3	+	+	-	+	+
--------------------	---	---	---	---	---

(+) presentan inhibición; (-) no presenta inhibición.

Las cepas con mayor actividad antagónica fueron 49-1 y 49-3 efectivas para inhibir a los cinco hongos fitopatógenos, en el caso de los microfiltrados, el de la 49-3 es efectivo contra cuatro hongos a excepción de *Mucor* sp.

Tabla 10. Halos de inhibición en milímetros (mm) presentados en el ensayo de *Bacillus* spp, y sus microfiltrados contra hongos fitopatógenos.

HONGOS	Halo de inhibición (mm)					
	Cepas			Microfiltrados		
	49-1	49-2	49-3	49-1	49-2	49-3
<i>Aspergillus</i> sp.	20	-	15	10	-	10
<i>Fusarium</i> sp.	30	24	25	20	22	15
<i>Mucor</i> sp.	28	30	40	-	28	-
<i>Fusarium moniliforme</i>	5	-	5	-	-	5
<i>Penicillium</i> sp.	30	26	32	5	25	10

La cepa con mayor inhibición fue la 49-3 contra el hongo *Mucor* sp., con un halo de inhibición de 40 mm, en el caso de los microfiltrados la mayor inhibición fue el 49-2 contra el hongo *Mucor* sp., con un halo de inhibición de 28 mm, el menor halo de inhibición de las cepas fue el de la 49-1 contra el hongo *Fusarium moniliforme*, respectivamente el microfiltrado de la cepa 49-3 contra el mismo hongo, en ambos casos el halo de inhibición fue de 5 mm.

3.7 Bioensayos en *Fragaria x ananassa*

3.7.1 Actividad de los microfiltrados de las cepas de *Bacillus* spp. contra *Fusarium moniliforme* en planta de fresa

El bioensayo fue llevado a cabo por 4 semanas inoculando 50 plantas de fresa con el hongo fitopatógeno *F. moniliforme*, se manejaron cinco grupos con 10 plantas

cada uno: tres grupos fueron tratados con los microfiltrados de las cepas 49-1, 49-2 y 49-3, un grupo con un antifúngico comercial captan y otro grupo con agua, los resultados se presentan en las figuras 30-33, en la semana 1 (figura 28) los cuatro grupos control no mostraron una diferencia significativa, cada una presentaba daños en la hoja en donde se realizó la inoculación por rocío con el hongo, en esa semana no se presentaron pérdidas de ningún ejemplar, los grupo control, la raíz se presentó saludable durante este periodo y tamaño de las hojas no tuvieron diferencia significativa.



Figura 28. Plantas de fresa a la semana 1 inoculadas con *Fusarium moniliforme*. a) tratamiento con microfiltrado cepa 49-1. b) tratamiento con microfiltrado cepa 49-2. c) tratamiento con microfiltrado cepa 49-3. d) tratamiento con Captan. e) tratamiento con agua.

En la semana 2 (figura 29) los grupos inoculados con las cepas 49-1, 49-2 y 49-3 a), b) c) y d) siendo este último el control positivo del tratamiento con captan continuaron su desarrollo de manera homogénea, con un crecimiento ± 2 cm de altura de tallo y una disminución gradual en daños visibles por la infección, sin embargo, en el grupo e) ya se habían perdido ejemplares, su crecimiento era menor al resto de los grupos, presentaba un mayor índice de marchitamiento en las hojas y raíz.

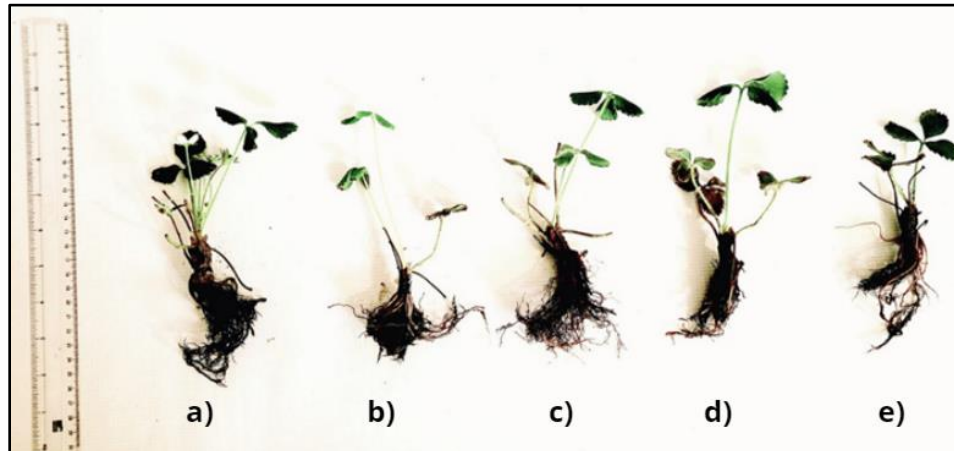


Figura 29. Plantas de fresa a la semana 2 inoculadas con *Fusarium moniliforme*. a) tratamiento con microfiltrado cepa 49-1. b) tratamiento con microfiltrado cepa 49-2. c) tratamiento con microfiltrado cepa 49-3. d) tratamiento con Captan. e) tratamiento con agua.

En la semana 3 (figura 30) el grupo a) y c) presentó la primer pérdida de un ejemplar, sin embargo habiendo un porcentaje de supervivencia del 90%, el grupo a) empezó una etapa de floración en 2 ejemplares, caso contrario a los demás grupos, en esta etapa el crecimiento de los cuatro grupos a)-c) continuo sin problema y contaba con una diferencia de ± 3 cm comparado con el grupo d) y de ± 5 cm en comparación con el grupo e), en este grupo ya se había presentado pérdida de 5 ejemplares y el resto mostraba daños notorios en hojas, raíz y tallo, además de que el crecimiento había disminuido considerablemente.

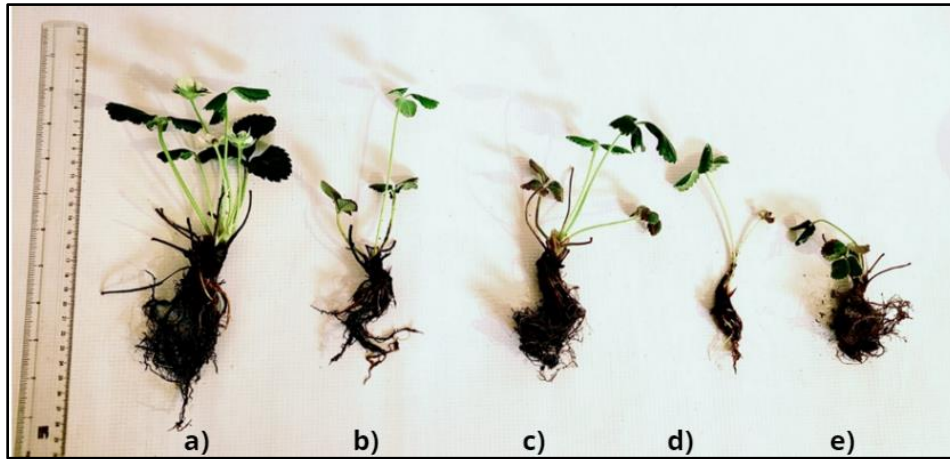


Figura 30. Plantas de fresa a la semana 3 inoculadas con *Fusarium moniliforme*. a) tratamiento con microfiltrado cepa 49-1. b) tratamiento microfiltrado con cepa 49-2. c) tratamiento con microfiltrado cepa 49-3. d) tratamiento con Captan. e) tratamiento con agua.

Finalmente, al culminar la semana 4 (figura 31) el grupo a) inoculado con el microfiltrado de la cepa 49-1 presentaba 6 plantas en etapas de floración y 2 produciendo frutos, a diferencia del resto de los grupos, las plantas tratadas con esta cepa, fueron las únicas que reportaron este comportamiento de floración y desarrollo del fruto, el grupo b) tratado con el microfiltrado de cepa 49-2 fue quien mayor crecimiento en tallo presentó respecto al resto de los grupos, con una diferencia de ± 2 cm respecto al grupo a) y c), una diferencia de ± 5 cm respecto al grupo d) y finalmente una diferencia de ± 8 cm respecto al grupo e). Los grupos tratados con los microfiltrados 49-1, 49-2 y 49-3 en general presentaron un mayor desarrollo respecto al grupo d) tratado con Captan y al grupo e) al que sólo se le adicionó agua. Al final del bioensayo de las plantas del grupo d) sólo sobrevivieron únicamente 2 plantas en condiciones deplorables, con infección en toda la planta, sin crecimiento alguno, y daños visibles en la corona de la planta.

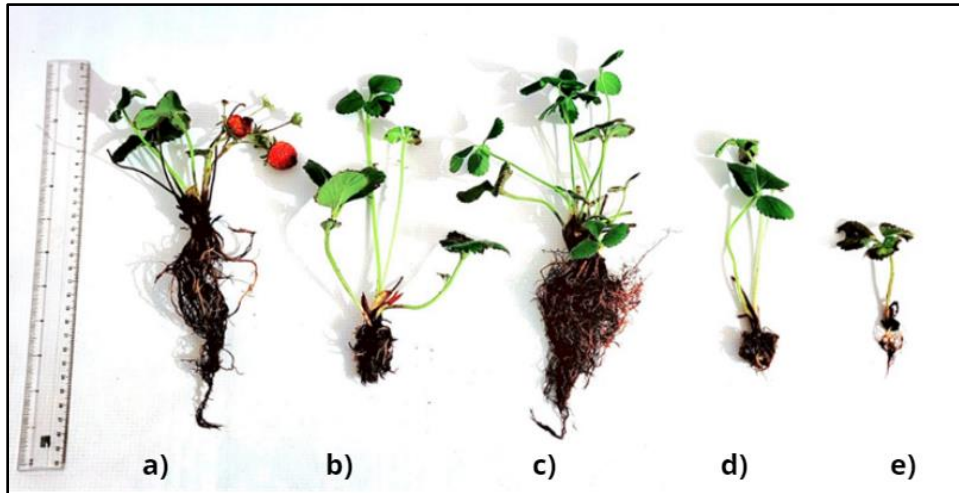


Figura 31. Plantas de fresa a la semana 4 inoculadas con *Fusarium moniliforme*. a) tratamiento con microfiltrado cepa 49-1. b) tratamiento con microfiltrado cepa 49-2. c) tratamiento con microfiltrado cepa 49-3. d) tratamiento con Captan. e) tratamiento con agua.

3.7.2 Actividad de los microfiltrados de las cepas de *Bacillus* sp. contra *Mucor* sp. en planta de fresa

El bioensayo con el hongo *Mucor* sp. fue realizado empleando 50 plantas, con 5 grupos de 10 plantas cada uno y con los tratamientos: microfiltrados 49-1, 49-2 y 49-3, el antifúngico captan y agua (tratamientos a, b, c, d y e respectivamente) durante 4 semanas. Al término de la semana 1 (figura 32) los cinco grupos presentaron daños en la hoja de donde se inoculó el hongo, la longitud de las plántulas era similar en todos los grupos, sin pérdidas o variaciones significativas entre los grupos.

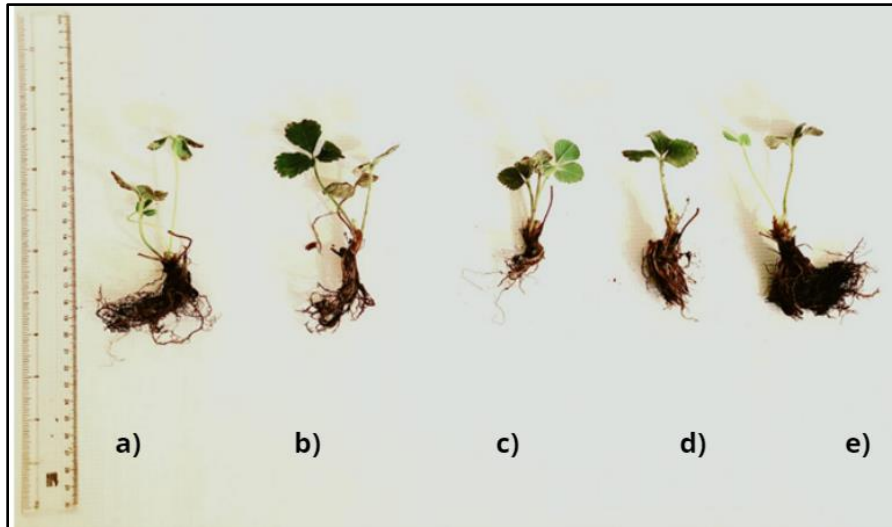


Figura 32. Plantas de fresa a la semana 1 inoculadas con *Mucor* sp. a) tratamiento con microfiltrado cepa 49-1. b) tratamiento con microfiltrado cepa 49-2. c) tratamiento con microfiltrado cepa 49-3. d) tratamiento con Captan. e) tratamiento con agua.

En la semana 2 (figura 33) los grupos a)-d) continuaron con un desarrollo homogéneo, el daño era en la hoja infectada, a excepción del grupo e) el cual, aunque continuaba con 10 plantas, no mostró crecimiento en sus ejemplares, la infección se expandió a tallo y raíz y no hubo aumento en la dimensión de los tallos, además de que la raíz se notaba deteriorada.

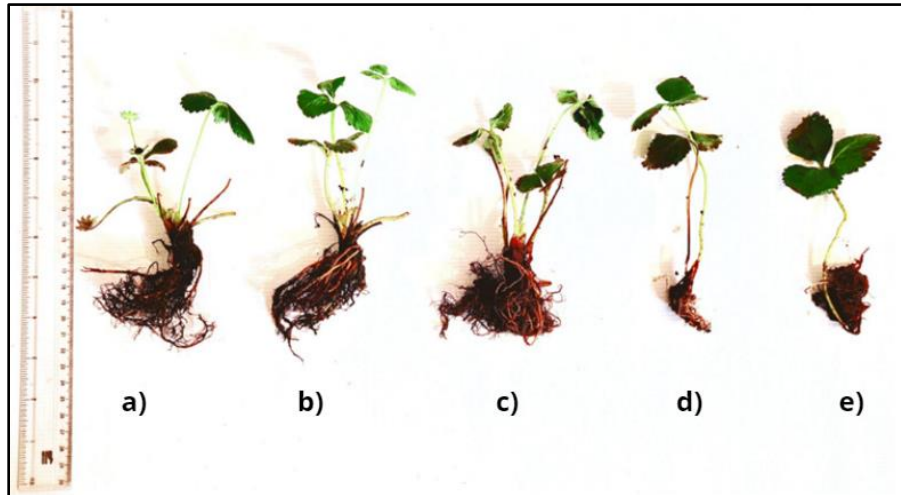


Figura 33. Plantas de fresa a la semana 2 inoculadas con *Mucor* sp. a) tratamiento con microfiltrado cepa 49-1. b) tratamiento con microfiltrado cepa 49-2. c) tratamiento con microfiltrado cepa 49-3. d) tratamiento con Captan. e) tratamiento con agua.

En la semana 3 (figura 34) el grupo a) tratamiento con la cepa 49-1 contaba con la pérdida de dos ejemplares, el resto de las plantas presentaban daños en la zona de la infección, sin embargo no se mostraban daños en tallo o raíz y algunas comenzaron con la formación de botones, los grupos b) y c) tratamiento con la cepa 49-2 y 49-3 respectivamente contaban de igual manera con la pérdida de un ejemplar, el resto de las plantas presentaban indicios de expansión de la infección en otras hojas y ligeramente raíz, sin embargo, el crecimiento de las pertenecientes al grupo c) era ligeramente mayor que al resto de los grupos (± 1.5 cm), el grupo d) no presentaba ninguna pérdida ni indicios de infección en el resto de la planta, sin embargo, su crecimiento era menor que el resto de los grupos a)-c), finalmente, el grupo e) ya contaba con la pérdida de 7 ejemplares, las que sobrevivían contaban con pérdida de hojas, marchitamiento en tallo y se notaban daños en la raíz.

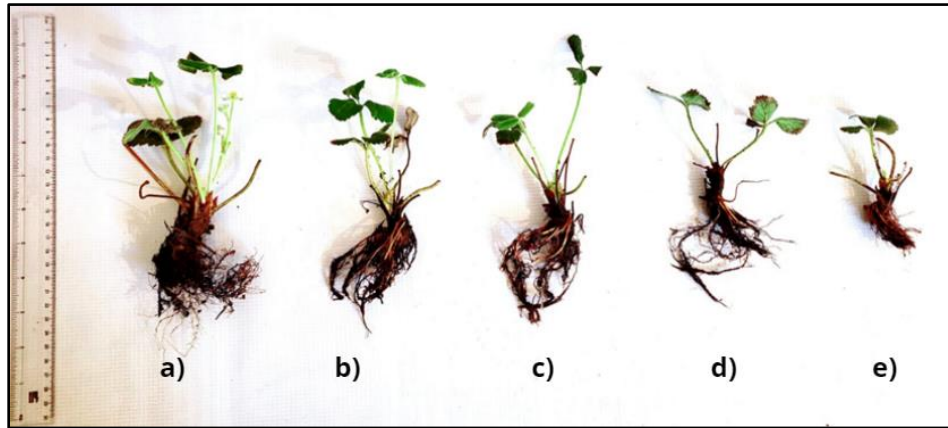


Figura 34. Plantas de fresa a la semana 3 inoculadas con *Mucor* sp. a) tratamiento con microfiltrado cepa 49-1. b) tratamiento con microfiltrado cepa 49-2. c) tratamiento con microfiltrado cepa 49-3. d) tratamiento con Captan. e) tratamiento con agua.

Al finalizar la cuarta semana (figura 35), el grupo a) contaba con la formación de frutos en 4 plantas, 4 en floración y no aumentaron las pérdidas, el grupo b) finalizó con 7 plantas con un crecimiento de raíz mayor comparado al resto de los otros grupos, el grupo c) fue el cual tuvo un mayor crecimiento de tallo comparado con todos los grupos habiendo una diferencia de ± 2 cm respecto con a) y b), de ± 5 cm con el grupo d) y ± 7 cm respecto al grupo e), el grupo c) no presentó ninguna pérdida de plantas, sin embargo, su crecimiento fue reducido respecto a los grupos a)-c), finalmente el grupo e) quedó con 2 plantas en mal estado, deterioradas y prácticamente sin crecimiento comparado a la primera semana del experimento. En la tabla 10 se presenta el porcentaje de supervivencia obtenido al final del experimento en cada grupo.

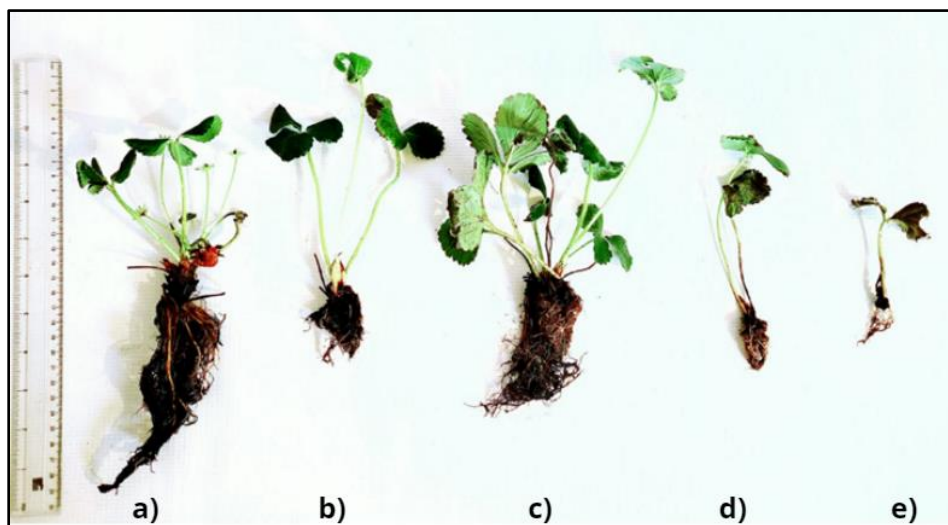


Figura 35. Plantas de fresa a la semana 4 inoculadas con *Mucor* sp. a) tratamiento con microfiltrado cepa 49-1. b) tratamiento con microfiltrado cepa 49-2. c) tratamiento con microfiltrado cepa 49-3. d) tratamiento con Captan. e) tratamiento con agua.

Tabla 10. Porcentaje de sobrevivencia a las 4 semanas de las plantas de fresa (*Fragaria x ananassa*) en los diferentes tratamientos

Grupo	Porcentaje de sobrevivencia	
	<i>Fusarium moniliforme</i>	<i>Mucor</i> spp.
49-1	80%	80%
49-2	70%	80%
49-3	80%	90%
Captan	90%	100%
Agua	20%	30%

La tasa de sobrevivencia-al final del experimento fue evaluada, los microfiltrados de las cepas tuvieron un porcentaje mayor o igual al 70% de sobrevivencia en el grupo inoculado con el hongo *Fusarium moniliforme*, el grupo inoculado con el hongo *Mucor* sp., las cepas tuvieron un porcentaje de sobrevivencia 80%, contando únicamente con una perdida en el grupo del microfiltrado de la cepa 49-3. Respectivamente en ambos grupos el antifúngico comercial Captan tuvo un

porcentaje de supervivencia mayor o igual al 90%. Y los grupos tratados con agua contaron un porcentaje menor o igual al 30%, estos resultados muestran que nuestros microfiltrados presentan una efectividad similar al antifúngico comercial, teniendo una diferencia de ± 2 plantas perdidas por cada grupo perteneciente al microfiltrado.

La evaluación final de crecimiento fue llevada en todos los grupos, en la figura 36 se muestra el gráfico comparativo de la longitud final en cm de las plantas inoculadas con *Fusarium moniliforme*, en dicho gráfico se observa que las plantas tratadas con los microfiltrados de las cepas de *B. subtilis* tuvieron un mayor crecimiento respecto a los otros dos grupos, de igual manera en la figura 37 se presenta el gráfico comparativo de las plantas inoculadas con *Mucor* sp., al igual que en las plantas tratadas con *Fusarium moniliforme* observamos un aumento de longitud en nuestros grupos de *B. subtilis*. Se observa que las plantas inoculadas con la el microfiltrado de la cepa 49-1 fueron las de mayor crecimiento respectos a los otros grupos, las plantas tratadas con los microfiltrados 49-2 y 49-3 tuvieron crecimientos similares y de igual manera mayor a los grupos tratados con captan y agua, en el caso de las plantas tratadas con captan tuvo un crecimiento moderado, finalmente las plantas del grupo control tratadas sólo con agua no tuvieron un crecimiento significativo respecto a los demás.

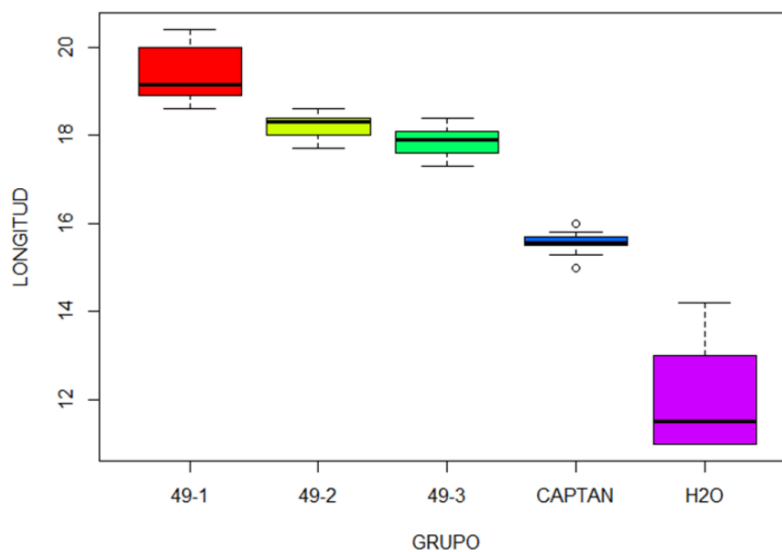


Figura 36. Longitud en cm de las plantas en los distintos tratamientos infectadas con *Fusarium moniliforme* a las 4 semanas.

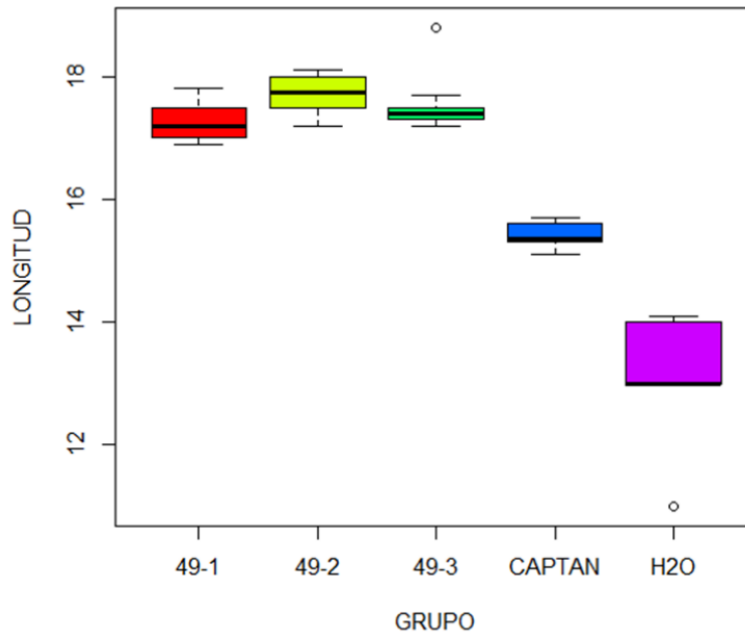


Figura 37. Longitud en cm de las plantas en los distintos tratamientos infectadas con *Mucor* sp. a las 4 semanas

El número de tallos generados en las plántulas fue considerado, en la figura 38 se presenta el gráfico comparativo de los grupos infectados con *F. moniliforme* y en la figura 39 los grupos de *Mucor* sp., en ambos gráficos se observa que el grupo tratado con el microfiltrado 49-3 obtuvo una mayor producción de tallos (10) a comparación de los demás grupos (4), sin embargo, los grupos 49-1 y 49-2 también presentaron un número de tallos mayor al de los grupos control (7).

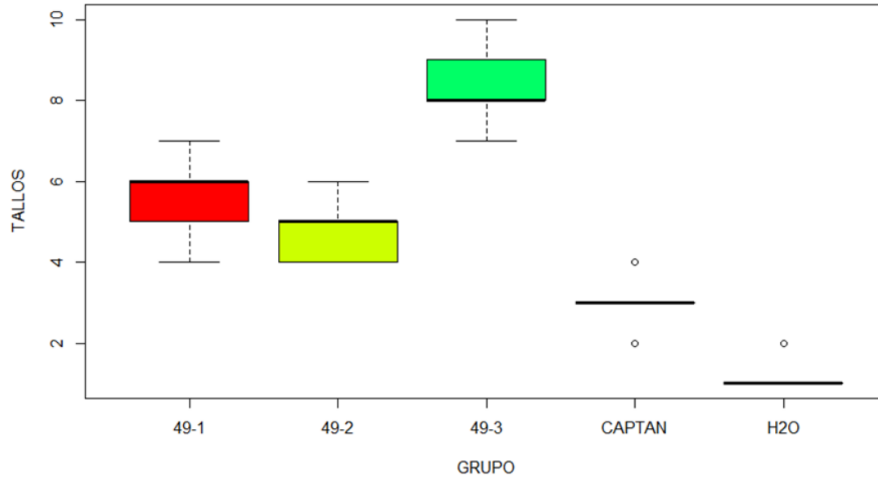


Figura 38. Número de tallos de las plantas infectadas con *Fusarium moniliforme* en los diferentes tratamientos a las 4 semanas.

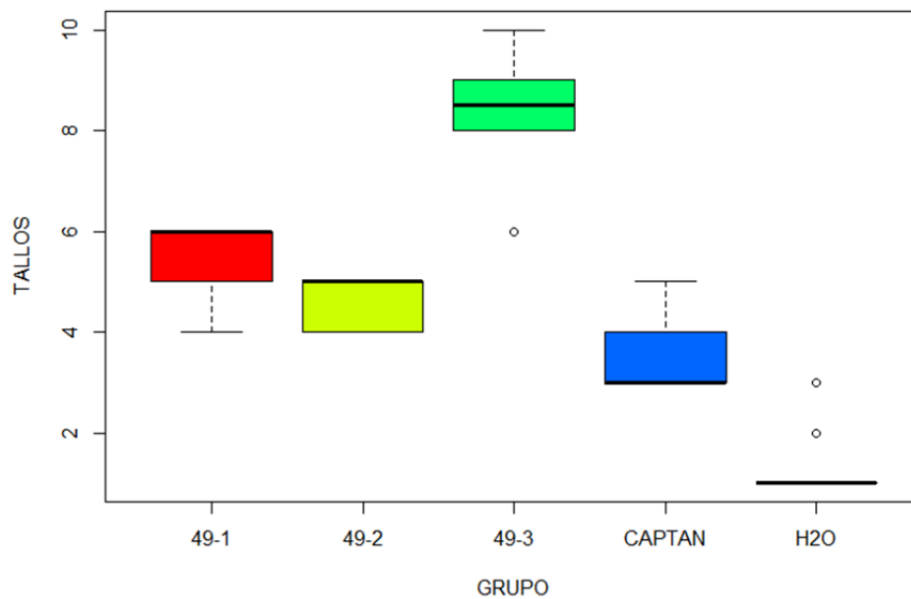


Figura 39. Número de tallos de las plantas infectadas con *Mucor* sp. en los diferentes tratamientos a las 4 semanas.

Como se observa en la figura 37 y 38, en el caso de los grupos tratados con la cepa 49-1 comenzó una fase de producción de fruto, lo cual no sucedió con en los demás tratamientos, su representación gráfica se muestra en la figura 40 para el caso de las plantas infectadas con *Fusarium moniliforme* y figura 41 para *Mucor* sp.

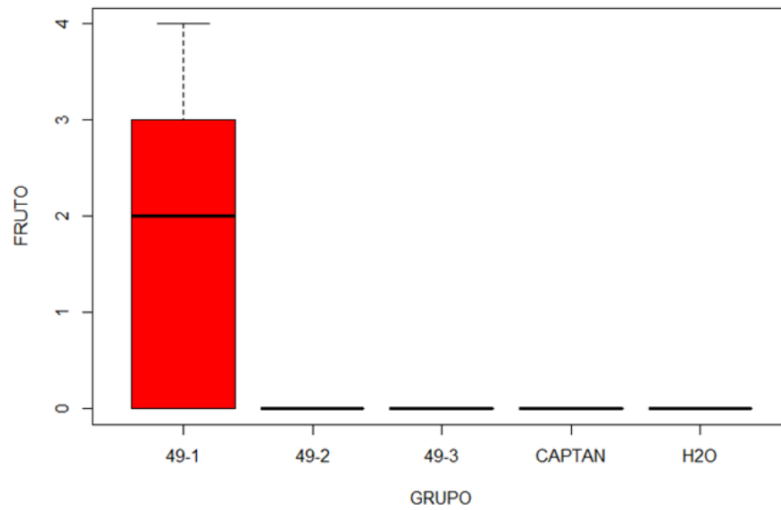


Figura 40. Número de frutos producidos al finalizar las cuatro semanas en plantas de fresa infectadas con *Fusarium moniliforme*.

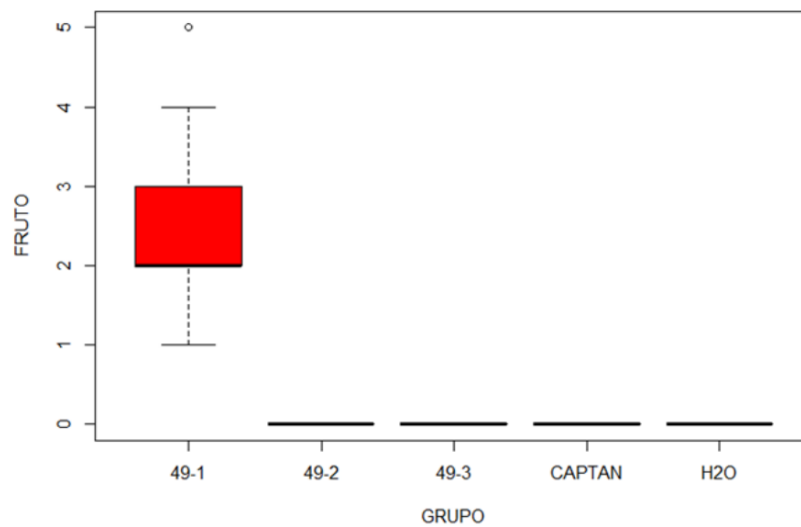


Figura 41. Número de frutos producidos al finalizar las cuatro semanas en plantas de fresa infectadas con *Mucor* sp.

4 Discusión

El empleo de marcadores moleculares como el gen que codifica para el ARNr 16S son utilizados con frecuencia para la identificación molecular de diversas bacterias aisladas a partir de muestras ambientales (Marizzoni *et al.*, 2020; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2016). En el presente proyecto al realizar el análisis bioinformático de la secuencia del gen que codifica para el ARNr 16S de la cepa aislada de rizósfera de planta medicinal 49-1, comparándola con las secuencias de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), se evidenció la cercanía de los aislados con especies del género *Bacillus*. En la topología construida mediante máxima verosimilitud, el microorganismo se agrupó en un solo clado con las especies *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, confirmando que la cepa 49-1 pertenece al género *Bacillus*, sin embargo no fue posible confirmar su especie, por lo que sería necesario realizar otro tipo de análisis, por ejemplo de polimorfismos. En estudios previos se ha reportado que el ARNr 16S es insuficiente para diferenciar a las especies del clado, debido a que está altamente conservado (Patel *et al.*, 2020; Fan *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2007).

Las pruebas bioquímicas realizadas en esta investigación corroboraron la pertenencia al género *Bacillus*; en los estudios realizados por Franco-Sierra y colaboradores (2020) se describe actividad enzimática de especies de *B. subtilis* que coincide en su totalidad con nuestras cepas 49-1, 49-2 y 49-3.

Se ha reportado en la literatura la eficacia *B. subtilis* como agente de control biológico de hongos fitopatógenos, su éxito radica en la elevada producción de metabolitos de índole fungicida, siendo los lipopéptidos y sideróforos los principales antimicrobianos reportados (Krishnan *et al.*, 2019).

En el bioensayo, el análisis estadístico ANOVA demostró que las cepas 49-1, 49-2 y 49-3 poseen un efecto antagonista y protector contra los hongos *Fusarium moniliforme* y *Mucor sp.*, en el ensayo realizado contra *F. moniliforme* las tres cepas lograron proteger por arriba del 70% de las plantas, comparado con un 20% de nuestro control negativo y un 90% del positivo, además, los grupos de la cepas de

B. subtilis mostraron un efecto de promotor vegetal, teniendo un crecimiento de ± 4.2 cm respecto al grupo captan y una diferencia ± 7 cm respecto al grupo de agua, mostrando un claro efecto antagónico de este microfiltrado libre de células en las condiciones probadas, por lo que los metabolitos producidos por esta bacteria son liberados al medio de cultivo. En el bioensayo de *Mucor* sp. las cepas bacterianas lograron proteger a las plantas teniendo una eficacia del 70% en el caso de la 49-2, del 80% para la 49-1 y del 90% para la 49-3, comparado al 100% del control captan y del 30% del grupo agua, al ser el porcentaje de supervivencia mayor al 50% en ambos bioensayos se infiere la eficacia de antagonismo y protección en las plantas al ser presentadas ante un fitopatógeno, de igual manera en este bioensayo se comparó la longitud final, siendo favorable para las plantas inoculadas con el microfiltrado de nuestras cepas bacterianas, teniendo una diferencia de ± 3 cm respecto al grupo captan y de ± 5.6 cm respecto al grupo de agua.

Se ha documentado que los lipopéptidos que inhiben el desarrollo de *Mucor* sp. son la fengicina e iturina, los cuales son asociados a la inhibición del micelio, ataques en su metabolismo que provoca un desbalance de nutrientes y afectan a las esporas, la producción de estos lipopéptidos se ha reportado estar en función de los componentes del medio de cultivo, de acuerdo con Sun y colaboradores (2019) el mejor cultivo para favorecer la producción de estos metabolitos en cepas de *Bacillus* spp. es un medio elevado en azúcares y sales, ya que se favorece la activación del operón *srfA*, responsable de la producción de lipopéptidos (Cossus *et al.*, 2021), en este proyecto se utilizó el medio TrisG el cual es un medio cuya composición química es principalmente compuesta por sales y glucosa como fuente de carbono.

En este trabajo se mostró un efecto promotor de crecimiento vegetal de los microfiltrados de las cepas de *Bacillus subtilis* probadas, lo cual puede deberse a que esta especie puede ser responsable de incrementar la disposición de nutrientes disponibles en el suelo. Blake y colaboradores (2021) reportaron que el uso de *Bacillus subtilis* mejoró el intercambio de nitrógeno, hierro y fósforo, esto utilizando mecanismos de homeostasis debido a la producción de sideróforos y espermidina, metabolitos que esta cepa produce y favorecen el crecimiento vegetal. En ambos

bioensayos se observó que el número de tallos fue variable en cada uno de los tratamientos, el número de tallos pertenecientes al grupo de microfiltrado de 49-3 fue mayor a comparación de todos los demás, teniendo un aproximado de ± 7 tallos con respecto a los grupos captan y agua y de ± 3 tallos respecto a los grupos 49-1 y 49-2, esto concuerda con los resultados de Blake y colaboradores (2021) donde se mostró que *B. subtilis* es responsable de la producción de citoquininas y una alta acumulación de este compuesto en las plantas conlleva al desarrollo de tejidos conductores vegetales como xilemas y floemas, por lo que en los microfiltrados de la cepa 49-3 podría haber la presencia de citoquininas.

El caso de los grupos tratados con el microfiltrado de la 49-1 se presentó una etapa de floración y producción de fruto temprana, evento que no ocurrió en ningún otro grupo, en las plantas tratadas con la cepa 49-1, presentaban flores e indicios de frutos a las 4 semanas del experimento, casos similares han sido reportados por Samaras y colaboradores (2021) en planta de jitomate, donde a las 5 semanas del experimento plantas inoculadas con una cepa de *B. subtilis* empezaron una etapa de floración, los artículos reportan que la presencia de las fitohormonas auxina y etileno, que son reguladas por los genes AUX/LAX y ARF en la bacteria, promueven el crecimiento vegetal y conducen a una maduración sexual en las plantas, explicando así la floración temprana y el crecimiento (Samaras *et al.*, 2021).

5 Conclusiones

Mediante el uso de las técnicas microbiológicas, bioquímicas y por secuenciación del gen que codifica para el ARNr 16S fue posible identificar al aislados 49-1 y mediante MALDI TOF a las cepas 49-2 y 49-3 de la colección de bacterias de rizosfera de plantas medicinales, como pertenecientes al género *Bacillus* spp.

En este trabajo se determinó que las cepas aisladas al ser cultivadas en condiciones restrictivas con respecto a los nutrientes como es el caso del empleo del medio TrisG, se favoreció el inicio de la fase estacionaria en los cultivos y la producción de

metabolitos secundarios a las 48h, a diferencia del medio líquido LB donde alcanzó dicha fase a las 72 h.

En los ensayos in vitro, la cepa 49-1 presento inhibición contra los cinco hongos *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Fusarium moniliforme* y *Penicillium* sp. con valores de 20, 30, 28, 5 y 30 mm respectivamente. Su microfiltrado presentó inhibición contra sólo 3 hongos: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp. con valores de 10, 20 y 5 mm respectivamente.

La cepa 49-2 presento inhibición contra tres hongos: *Fusarium* sp., *Mucor* sp. y *Penicillium* sp. con valores de 24, 30 y 26 mm respectivamente, su microfiltrado presento inhibición contra los mismos hongos, y mostraron resultados similares siendo 25, 20 y 25 mm respectivamente.

La cepa 49-3 presentó inhibición contra los cinco hongos *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., *Fusarium moniliforme* y *Penicillium* sp. con valores de 15, 25, 40, 4 y 32 mm respectivamente, su microfiltrado presenta inhibición contra *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Fusarium moniliforme* y *Penicillium* sp. con valores de 10, 15, 5 y 10 mm respectivamente, siendo este microfiltrado el que presento antagonismo contra cuatro de cinco hongos probados.

Los microfiltrados de las tres cepas de *Bacillus* spp. 49-1, 49-2 y 49-3 previenen e inhiben el desarrollo de *Mucor* sp. en ensayos in vivo en plantas de fresa, además de promover el crecimiento vegetal.

El microfiltrado de la cepa 49-1 promovió el desarrollo de flores y fruto en plantas de fresa a las 4 semanas de crecimiento.

6 Perspectivas

- Caracterización química de los microfiltrados de las cepas.
- Realizar pruebas de antagonismo contra otros hongos fitopatógenos.
- Realizar pruebas de antagonismo combinando las tres cepas y sus microfiltrados.
- Caracterización molecular de los genes implicados en la síntesis de la producción de estos metabolitos en *Bacillus*.
- Realizar pruebas de antagonismo de las cepas contra bacterias patógenas.
- Caracterizar el mecanismo de protección de *Bacillus* en plantas.

7 Bibliografía

Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. Ben, & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201–232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>

Ahmad, M. S. (1977). Improvement of a Jifungal and antibacterial antibiotic producing strain of *Bacillus subtilis* AFCl-69 by radiation and chemical nrtagen. Part of a coordinated programme on radiation biology (No. IAEA-R--1457-F). *International Atomic Energy Agency*.

Ahn, M. G., Kim, D. S., Ahn, S. R., Sim, H. S., Kim, S., & Kim, S. K. (2021). Characteristics and Trends of Strawberry Cultivars throughout the Cultivation Season in a Greenhouse. *Horticulturae*, 7(2), 30. <https://doi.org/10.3390/horticulturae7020030>

Aizawa, S.-I. (2014). *Bacillus subtilis* — The Representative of Gram-Positive Bacteria. *The Flagellar World*, 22–23. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-417234-0.00004-9>

Ali, S. S., & Vidhale, N. N. (2013). Review Article Bacterial Siderophore and their

- Application : A review. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 2(12), 303–312.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(7), 2939–2951. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7343-9>
- Angelina, E., Papatheodorou, E. M., Demirtzoglou, T., & Monokrousos, N. (2020). Effects of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* Inoculation on Attributes of the Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Soil Rhizosphere Microbial Community: The Role of the Management System. *Agronomy*, 10(9), 1428. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091428>
- Anton, M. (2013). Egg yolk: Structures, functionalities and processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(12), 2871–2880. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6247>
- Ara, M. T., Monzur, S., Saand, M. A., & Islam, R. (2017). The first report of *Pestalotiopsis* spp. causing crown rot disease on strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) in Bangladesh and evaluation of fungicide activity. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 11(4), 350–358. <https://doi.org/10.12692/ijb/11.4.350-358>
- Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Camarero, J. A., Campopiano, D. J., Challis, G. L., Clardy, J., Cotter, P. D., Craik, D. J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P. C., Entian, K.-D., Fischbach, M. A., Garavelli, J. S., ... Van Der Donk, W. A. (2013). Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.*, 30(1), 108–160. <https://doi.org/10.1039/c2np20085f>
- Asraoui, M., Zanella, F., Marcato, S., Squartini, A., Amzil, J., Hamdache, A.,

- Baldan, B., & Ezziyyani, M. (2019). Bacillus amyloliquefaciens Enhanced Strawberry Plants Defense Responses, upon Challenge with Botrytis cinerea. In *Advances in Intelligent Systems and Computing* (Vol. 911). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11878-5_5
- Bagyan, I., & Setlow, P. (2002). Localization of the cortex lytic enzyme CwlJ in spores of Bacillus subtilis. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1219–1224. <https://doi.org/10.1128/jb.184.4.1219-1224.2002>
- Ben-Yehuda, S., Fujita, M., Liu, X. S., Gorbatyuk, B., Skoko, D., Yan, J., Marko, J. F., Liu, J. S., Eichenberger, P., Rudner, D. Z., & Losick, R. (2005). Defining a centromere-like element in Bacillus subtilis by identifying the binding sites for the chromosome-anchoring protein RacA. *Molecular Cell*, 17(6), 773–782. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.02.023>
- Bergey, D. H., Krieg, N. R., & Holt, J. G. (2009). Family I. Bacillaceae. In *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (BMSAB)* (Second, pp. 20–32). <https://www.springer.com/series/4157>
- Besson, F., Peypoux, F., Michel, G., & Delcambe, L. (1976). Characterization of iturin a in antibiotics from various strains of Bacillus subtilis. *The Journal of Antibiotics*, 29(10), 1043–1049. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.29.1043>
- Bionda, N., Pitteloud, J.-P., & Cudic, P. (2013). Cyclic lipodepsipeptides: a new class of antibacterial agents in the battle against resistant bacteria. *Future Medicinal Chemistry*, 5(11), 1311–1330. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.86>
- Bleam, W. F. (2012). Natural Organic Matter and Humic Colloids. *Soil and Environmental Chemistry*, 209–256. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-415797-2.00006-6>
- Bosshard, P. P., Abels, S., Zbinden, R., Böttinger, E. C., & Altwegg, M. (2003). Ribosomal DNA Sequencing for Identification of Aerobic Gram-Positive Rods in the Clinical Laboratory (an 18-Month Evaluation). *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4134–4140. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.9.4134-4140.2003>

- Brdar, S., Panić, M., Hogeveen-Van Echtelt, E., Mensink, M., Grbović, Ž., Woltering, E., & Chauhan, A. (2021). Predicting sensitivity of recently harvested tomatoes and tomato sepals to future fungal infections. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02302-2>
- Brucker, M. C. (1986). Gram staining A Useful Laboratory Technique. *Journal of Nurse-Midwifery*, 31(3), 156–158. [https://doi.org/10.1016/0091-2182\(86\)90154-0](https://doi.org/10.1016/0091-2182(86)90154-0)
- CEDRSSA. (2020). *Impacto del uso de plaguicidas en el sector agropecuario*. [http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/54IMPACTO DE LOS PLAGUICIDAS.pdf](http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/54IMPACTO%20DE%20LOS%20PLAGUICIDAS.pdf)
- Chirakkal, H., O'Rourke, M., Atrih, A., Foster, S. J., & Moir, A. (2002). Analysis of spore cortex lytic enzymes and related proteins in *Bacillus subtilis* endospore germination. *Microbiology*, 148(8), 2383–2392. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-8-2383>
- Chitarra, G. S., Breeuwer, P., Nout, M. J. R., Van Aelst, A. C., Rombouts, F. M., & Abee, T. (2003). An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. *Journal of Applied Microbiology*, 94(2), 159–166. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01819.x>
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., & Cle, C. (2005). *Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases : Principles , Mechanisms of Action , and Future Prospects Downloaded from <http://aem.asm.org/> on September 28 , 2012 by SERIALS CONTROL Lane Medical Library Use of Plant Growth-Promo*. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951>
- Cubeta, M. A.; Hartman, G. L.; Sinclair, J. B. (1986). Interaction Between *Bacillus subtilis* and Fungi Associated with Soybean Seeds. *Plant Disease (USA)*, 69(6), 506–509.
- Danilova, I., & Sharipova, M. (2020). The practical potential of bacilli and their enzymes for industrial production. *Frontiers in Microbiology*, 11(August).

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01782>

De Serrano, L. O. (2017). Biotechnology of siderophores in high-impact scientific fields. *Biomolecular Concepts*, 8(3–4), 169–178. <https://doi.org/10.1515/bmc-2017-0016>

Del Rosario Valera, M., Alvariño, L., & Iannacone, J. (2018). TOXICIDAD DEL FUNGICIDA KRESOXIM - METIL SOBRE SIETE BIOINDICADORES DE CALIDAD AMBIENTAL. *The Biologist*, 16(2).
<https://doi.org/10.24039/rtb2018162259>

Deleu, M., Paquot, M., & Nylander, T. (2008). Effect of Fengycin, a Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*, on Model Biomembranes. *Biophysical Journal*, 94(7), 2667–2679. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.114090>

Desmyttere, H., Deweer, C., Muchembled, J., Sahmer, K., Jacquin, J., Coutte, F., & Jacques, P. (2019). Antifungal activities of *Bacillus subtilis* lipopeptides to two *venturia inaequalis* strains possessing different tebuconazole sensitivity. *Frontiers in Microbiology*, 10(OCT), 1–10.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02327>

Dunlap, C. A., Kim, S.-J., Kwon, S.-W., & Rooney, A. P.. (2016). *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenom. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), 1212–1217. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000858>

Earl, A. M., Losick, R., & Kolter, R. (2008). Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology*, 16(6), 269–275.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>

Fan, B., Blom, J., Klenk, H. P., & Borriss, R. (2017). *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group B. amyloliquefaciens” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in microbiology*, 8, 22.

- Fernandez-Vidal, A., Arnaud, L. C., Maumus, M., Chevalier, M., Mirey, G., Salles, B., Vignard, J., & Boutet-Robinet, E. (2019). Exposure to the Fungicide Captan Induces DNA Base Alterations and Replicative Stress in Mammalian Cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *60*(3), 286–297. <https://doi.org/10.1002/em.22268>
- Fiddaman, P. J., & Rossall, S. (1993). The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, *74*(2), 119–126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb03004.x>
- Fischetti, V. A. (2005). Bacteriophage lytic enzymes: Novel anti-infectives. *Trends in Microbiology*, *13*(10), 491–496. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.08.007>
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., Mccraw, S. L., & Gurr, S. J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature*, *484*(7393), 186–194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>
- Franz, C. M. A. P., Van Belkum, M. J., Holzappel, W. H., Abriouel, H., & Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiology Reviews*, *31*(3), 293–310. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00064.x>
- Galtier, N., Gouy, M., & Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Computer applications in the biosciences : CABIOS*, *12*(6), 543–548. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/12.6.543>
- Gajbhiye, M. H., & Kapadnis, B. P. (2016). Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants. *Biocontrol Science and Technology*, *26*(11), 1451–1470. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1213793>
- Gao, Z., Wu, H., Shi, L., Zhang, X., Sheng, R., Yin, F., & Gooneratne, R. (2017). Study of *Bacillus subtilis* on growth performance, nutrition metabolism and intestinal microflora of 1 to 42 d broiler chickens. *Animal Nutrition*, *3*(2), 109–113. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.02.002>

- García-Gutiérrez, C., & Rodríguez-Meza, G. D. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai*, 1–10. <https://doi.org/10.35197/rx.08.03.e2.2012.01.cg>
- García-Gutiérrez, M. S., Ortega-Álvaro, A., Busquets-García, A., Pérez-Ortiz, J. M., Caltana, L., Ricatti, M. J., Brusco, A., Maldonado, R., & Manzanares, J. (2013). Synaptic plasticity alterations associated with memory impairment induced by deletion of CB2 cannabinoid receptors. *Neuropharmacology*, 73, 388–396. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.05.034>
- Geissler, M., Oellig, C., Moss, K., Schwack, W., Henkel, M., & Hausmann, R. (2017). High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) for the simultaneous quantification of the cyclic lipopeptides Surfactin, Iturin A and Fengycin in culture samples of *Bacillus* species. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1044–1045, 214–224. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.11.013>
- Gong, M., Wang, J.-D., Zhang, J., Yang, H., Lu, X.-F., Pei, Y., & Cheng, J.-Q. (2006). Study of the Antifungal Ability of *Bacillus subtilis* Strain PY-1 in Vitro and Identification of its Antifungal Substance (Iturin A). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 38(4), 233–240. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00157.x>
- Greenshields, M., Cunha, B., Coville, N., Pimentel, I., Zawadneak, M., Dobrovolski, S., Souza, M., & Hümmelgen, I. (2016). Fungi Active Microbial Metabolism Detection of *Rhizopus* spp. and *Aspergillus* spp. Section Nigri on Strawberry Using a Set of Chemical Sensors Based on Carbon Nanostructures. *Chemosensors*, 4(3), 19. <https://doi.org/10.3390/chemosensors4030019>
- Hakeem, K. R., Akhtar, M. S., & Abdullah, S. N. A. (2016). Effects of Pesticides on Environment. *Plant, Soil and Microbes: Volume 1: Implications in Crop Science*, 1–366. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3>
- Harwood, C. R., Pohl, S., Smith, W., & Wipat, A. (2013). *Bacillus subtilis*. Model Gram-Positive Synthetic Biology Chassis. In *Methods in Microbiology* (1st ed.,

Vol. 40). Copyright © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417029-2.00004-2>

Hashem, A. H., Abdelaziz, A. M., Askar, A. A., Fouda, H. M., Khalil, A. M. A., Abd-El salam, K. A., & Khaleil, M. M. (2021). Bacillus megaterium-Mediated Synthesis of Selenium Nanoparticles and Their Antifungal Activity against Rhizoctonia solani in Faba Bean Plants. *Journal of Fungi*, 7(3), 195.

<https://doi.org/10.3390/jof7030195>

Helistö, P., Aktuganov, G., Galimzianova, N., Melentjev, A., & Korpela, T. (2001).

Lytic enzyme complex of an antagonistic Bacillus spp. X-b: Isolation and purification of components. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 758(2), 197–205.

[https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00181-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00181-5)

Hendrickson, J. A., Hu, C., Aitken, S. L., & Beyda, N. (2019). Antifungal

Resistance: a Concerning Trend for the Present and Future. *Current Infectious Disease Reports*, 21(12). <https://doi.org/10.1007/s11908-019-0702-9>

Henkel, M., & Hausmann, R. (2019). Diversity and Classification of Microbial

Surfactants. In *Biobased Surfactants: Synthesis, Properties, and Applications* (Second Edi). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00002-2)

[6.00002-2](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812705-6.00002-2)

Hill, N. S., Zuke, J. D., Buske, P. J., Chien, A.-C., & Levin, P. A. (2018). A nutrient-dependent division antagonist is regulated post-translationally by the Clp proteases in Bacillus subtilis. *BMC Microbiology*, 18(1).

<https://doi.org/10.1186/s12866-018-1155-2>

<https://doi.org/10.1186/s12866-018-1155-2>

Hong, H. A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E., & Cutting, S. M. (2009).

Defining the natural habitat of Bacillus spore-formers. *Research in Microbiology*, 160(6), 375–379.

<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.06.006>

Hong, S., Kim, T. Y., Won, S.-J., Moon, J.-H., Ajuna, H. B., Kim, K. Y., & Ahn, Y. S.

(2022). Control of Fungal Diseases and Fruit Yield Improvement of Strawberry Using Bacillus velezensis CE 100. *Microorganisms*, 10(2), 365.

<https://doi.org/10.3390/microorganisms10020365>

- Hoppe, B. (1983). Die Biologie der Mikroorganismen von F. J. Cohn (1828-1898): Entwicklung aus Forschungen über mikroskopische Pflanzen und Tiere. *Sudhoffs Archiv*, 67(2), 158–189. <http://www.jstor.org/stable/20776858>
- Hu, F., Liu, Y., & Li, S. (2019). Rational strain improvement for surfactin production: enhancing the yield and generating novel structures. *Microbial Cell Factories*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1089-x>
- Huaping T., Zhiwei B., Cuiyuan J., Wenyu M., Zhengwei F. Yuanxiang J., (2020). Toxic effects and mechanisms of three commonly used fungicides on the human colon adenocarcinoma cell line Caco-2. *Environmental Pollution*, 263(), 114660–. doi:10.1016/j.envpol.2020.114660
- Huerta, D. R. (2016). *Efecto antifúngico de antocianinas de frutos de fresa vs hongos fitopatógenos*. 1–82.
- Hussain, S. Z., Naseer, B., Qadri, T., Fatima, T., & Bhat, T. A. (2021). Fruits Grown in Highland Regions of the Himalayas. *Fruits Grown in Highland Regions of the Himalayas*, 219–228. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-75502-7>
- Jha, S., Jha, C. K., Modi, H. A., & Saraf, M. (2014). Microbial chitinases: Manifestation and prospective. *Microbes in Process, December*, 147–162.
- Jin, P., Wang, H., Tan, Z., Xuan, Z., Dahar, G. Y., Li, Q. X., Miao, W., & Liu, W. (2020). Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 163, 102–107. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.11.004>
- Joshi, R., & Mcspadden Gardener, B. B. (2006). Identification and Characterization of Novel Genetic Markers Associated with Biological Control Activities in *Bacillus subtilis*. *Phytopathology®*, 96(2), 145–154. <https://doi.org/10.1094/phyto-96-0145>
- Kai, M. (2020). Diversity and Distribution of Volatile Secondary Metabolites Throughout *Bacillus subtilis* Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 11(April).

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00559>

- Karnwal, A. (2017). Isolation and identification of plant growth promoting rhizobacteria from maize (*Zea mays* L.) rhizosphere and their plant growth promoting effect on rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Protection Research*, 57(2), 144–151. <https://doi.org/10.1515/jppr-2017-0020>
- Kaspar, F., Neubauer, P., & Gimpel, M. (2019). Bioactive Secondary Metabolites from *Bacillus subtilis*: A Comprehensive Review. *Journal of Natural Products*, 82(7), 2038–2053. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00110>
- Kaushalya Madhavi, B. G., Khan, F., Bhujel, A., Jaihuni, M., Kim, N. E., Moon, B. E., & Kim, H. T. (2021). Influence of different growing media on the growth and development of strawberry plants. *Heliyon*, 7(6), e07170. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07170>
- Kearns, D. B., & Losick, R. (2005). Cell population heterogeneity during growth of *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 19(24), 3083–3094. <https://doi.org/10.1101/gad.1373905>
- Khanal, R., Choo, T. M., Xue, A. G., Vigier, B., Savard, M. E., Blackwell, B., Wang, J., Yang, J., & Martin, R. A. (2021). Response of Barley Genotypes to *Fusarium* Head Blight under Natural Infection and Artificial Inoculation Conditions. *The Plant Pathology Journal*, 37(5), 455–464. <https://doi.org/10.5423/ppj.oa.06.2021.0094>
- Kim, Y.-O., Park, I.-S., Kim, D.-J., Nam, B.-H., Kim, D.-G., Jee, Y.-J., & An, C.-M. (2014). Identification and characterization of a bacteriocin produced by an isolated *Bacillus* spp. SW1-1 that exhibits antibacterial activity against fish pathogens. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 57(5), 605–612. <https://doi.org/10.1007/s13765-014-4174-1>
- Kloepper, J. W., Ryu, C.-M., & Zhang, S. (2004). Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology*, 94(11), 1259–1266. <https://doi.org/10.1094/phyto.2004.94.11.1259>

- Knight, C. A., Bowman, M. J., Frederick, L., Day, A., Lee, C., & Dunlap, C. A. (2018). The first report of antifungal lipopeptide production by a *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* strain. *Microbiological Research*, 216, 40–46. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.08.001>
- Kraas, F. I., Helmetag, V., Wittmann, M., Strieker, M., & Marahiel, M. A. (2010). Functional dissection of surfactin synthetase initiation module reveals insights into the mechanism of lipoinitiation. *Chemistry and Biology*, 17(8), 872–880. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.06.015>
- Krishnan, N., Velramar, B., & Velu, R. K. (2019). Investigation of antifungal activity of surfactin against mycotoxigenic phytopathogenic fungus *Fusarium moniliforme* and its impact in seed germination and mycotoxicosis. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 155, 101–107. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.01.010>
- Kumar, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 167(8), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002>
- Lahlali, R., Ezrari, S., Radouane, N., Kenfaoui, J., Esmaeel, Q., El Hamss, H., Belabess, Z., & Barka, E. A. (2022). Biological Control of Plant Pathogens: A Global Perspective. *Microorganisms*, 10(3), 596. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030596>
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales Ramírez Msc, L. C., & Sánchez Leal Msc, L. C. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*, 9(16), 177. <https://doi.org/10.22490/24629448.501>
- Lee, H., & Kim, H.-Y. (2011). Lantibiotics, Class I Bacteriocins from the Genus *Bacillus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3), 229–235. <https://doi.org/10.4014/jmb.1010.10017>
- León López, L., Guzmán-Ortiz, D. L. A., García Berumen, J. A., Chávez

- Marmolejo, C. G., & PeñA-Cabriales, J. J. (2018). Consideraciones para mejorar la competitividad de la región “El Bajío” en la producción nacional de fresa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(4), 673–686.
<https://doi.org/10.29312/remexca.v5i4.929>
- Limaye, R. A., Joseph, A. R., Natu, A. D., & Paradkar, M. V. (2015). Convenient Syntheses of 3-Aryl-3,4-Dihydroisocoumarins. *Journal of Chemical Research*, 39(4), 191–194. <https://doi.org/10.3184/174751915x14258938697567>
- Liston, A., Cronn, R., & Ashman, T. (2014). *Fragaria* : A genus with deep historical roots and ripe for evolutionary and ecological insights. *American Journal of Botany*, 101(10), 1686–1699. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400140>
- Loeza, J. (2018). Manual de producción de fresa en Coalcomán Michoacán. *Tecnologico Nacional de Mexico*, 1–53.
<https://www.itscoalcoman.edu.mx/content/descargas/vinculacion/MANUAL PARA CULTIVO DE FRESA EN COALCOMAN.pdf>
- Lu, C., & Craig. (2012). Metabolic Regulation of Epigenetics. *Cell Metabolism*, 16(1), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.06.001>
- Lv, Y., Li, Y., Liu, X., & Xu, K. (2021). Effect of soil sulfamethoxazole on strawberry (*Fragaria ananassa*): Growth, health risks and silicon mitigation. *Environmental Pollution*, 286(May), 117321.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117321>
- Mao, Z., Xue, M., Gu, G., Wang, W., Li, D., Lai, D., & Zhou, L. (2020). Lophiostomin A–D: new 3,4-dihydroisocoumarin derivatives from the endophytic fungus *Lophiostoma* spp. Sigrf10. *RSC Advances*, 10(12), 6985–6991. <https://doi.org/10.1039/d0ra00538j>
- Mardanovna, A. M., Fanisovna Hadieva, G., Tafkilevich Lutfullin, M., Valer’Evna Khilyas, I., Farvazovna Minnullina, L., Gadelevna Gilyazeva, A., Mikhailovna Bogomolnaya, L., & Rashidovna Sharipova, M. (2017). <i>Bacillus subtilis Strains</i> with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi. *Agricultural Sciences*, 08(01), 1–20. <https://doi.org/10.4236/as.2017.81001>

- Mariscal-Amaro, L. A., Rivera-Yerena, A., Dávalos-González, P. A., & Ávila-Martínez, D. (2017). Situación actual de hongos asociados a la secadera de la fresa (*Fragaria xananassa* Duch.) en Guanajuato, México. *Agrociencia*, *51*(6), 673–681.
- Marizzoni, M., Gurry, T., Provasi, S., Greub, G., Lopizzo, N., Ribaldi, F., Festari, C., Mazzelli, M., Mombelli, E., Salvatore, M., Mirabelli, P., Franzese, M., Soricelli, A., Frisoni, G. B., & Cattaneo, A. (2020). Comparison of Bioinformatics Pipelines and Operating Systems for the Analyses of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences in Human Fecal Samples. *Frontiers in Microbiology*, *11*(June). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01262>
- Márquez, V. M. P., Ochoa, J. L., Cruz, C. V., Alonso, P. S., Olmedo-Alvarez, G., P, S. V., & Abascal, E. N. (2014). Isolation of *actinobacillus pleuropneumoniae* from layer hens showing clinical signs of infectious coryza. *Avian Diseases*, *58*(4), 638–641. <https://doi.org/10.1637/10798-021314-Case.1>
- Martinez, R. M. (2013). *Bacillus subtilis*. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* (Vol. 1). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00125-X>
- Maughan, H., & Van der Auwera, G. (2011). *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*, *11*(5), 789–797. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>
- Mckenney, P. T., Driks, A., & Eichenberger, P. (2013). The *Bacillus subtilis* endospore: assembly and functions of the multilayered coat. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(1), 33–44. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2921>
- Md Sidek, N. L., Halim, M., Tan, J. S., Abbasiliasi, S., Mustafa, S., & Ariff, A. B. (2018). Stability of Bacteriocin-Like Inhibitory Substance (BLIS) Produced by *Pediococcus acidilacticus* 10 at Different Extreme Conditions. *BioMed Research International*, *2018*, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2018/5973484>
- Meena, K. R., Sharma, A., Kumar, R., & Kanwar, S. S. (2020). Two factor at a time approach by response surface methodology to aggrandize the *Bacillus subtilis*

- KLP2015 surfactin lipopeptide to use as antifungal agent. *Journal of King Saud University - Science*, 32(1), 337–348.
<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.05.025>
- Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H.-P., & Göker, M.. (2014). Taxonomic use of DNA G+C content and DNA–DNA hybridization in the genomic age. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(Pt_2), 352–356.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.056994-0>
- Mejía-Bautista, M. A., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J. M., & Reyes-Ramírez, A. (2016). Actividad in vitro de *Bacillus* spp. en la inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani* aislado de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agrociencia*, 50(8), 1123–1135.
- Meylani, V., Natawijaya, D., Saepudin, A., Suriani, N. L., & Sunita, K. (2022). Natamycin Treatment for Control of *Rhizopus* Mold on Strawberries (*Fragaria Virginiana*). *KnE Life Sciences*. <https://doi.org/10.18502/kls.v7i3.11161>
- Mohamed, E. A. H., Farag, A. G., & Youssef, S. A. (2018). Phosphate Solubilization by *Bacillus subtilis* and *Serratia marcescens* Isolated from Tomato Plant Rhizosphere. *Journal of Environmental Protection*, 09(03), 266–277. <https://doi.org/10.4236/jep.2018.93018>
- Mohamed, R., Fernández, J., Pineda, M., & Aguilar, M. (2007). Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) seed oil is a rich source of γ -tocopherol. *Journal of Food Science*, 72(3). <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00285.x>
- Mongkoltharuk, W. (2012). Classification of bacillus beneficial substances related to plants, humans and animals. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(12), 1597–1604. <https://doi.org/10.4014/jmb.1204.04013>
- Morales-Mora, L. A., Andrade-Hoyos, P., Valencia-De Ita, M. A., Romero-Arenas, O., Silva-Rojas, H. V., & Contreras-Paredes, C. A. (2020). Characterization of strawberry associated fungi and in vitro antagonistic effect of *Trichoderma harzianum*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of*

Phytopathology, 38(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2005-7>

Natsheh, B., Abu-khalaf, N., & Mousa, S. (2015). Strawberry (*Fragaria ananassa* Duch .) Plant Productivity Quality in Relation to Soil Depth and Water Requirements. *International Journal of Plant Research*, 5(1), 1–6.
<https://doi.org/10.5923/j.plant.20150501.01>

Nes, I. F., Johnsborg, O., & Diep, D. B. (2010). Signal transduction in gram-positive bacteria by bacterial peptides. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, 5, 305–321. <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00118-0>

Nielsen, J. A., & Lovell, P. H. (2000). Value of morphological characters for cultivar identification in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 28(2), 89–96.
<https://doi.org/10.1080/01140671.2000.9514128>

Oktari, A., Supriatin, Y., Kamal, M., & Syafrullah, H. (2017). The Bacterial Endospore Stain on Schaeffer Fulton using Variation of Methylene Blue Solution. *Journal of Physics: Conference Series*, 812, 12066.
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/812/1/012066>

Oliveras, À., Baró, A., Montesinos, L., Badosa, E., Montesinos, E., Feliu, L., & Planas, M. (2018). Antimicrobial activity of linear lipopeptides derived from BP100 towards plant pathogens. *PLOS ONE*, 13(7), e0201571.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201571>

Ongena, M., & Jacques, P. (2008). Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>

Oppegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G., & Nissen-Meyer, J. (2007). The two-peptide class II bacteriocins: Structure, production, and mode of action. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 210–219. <https://doi.org/10.1159/000104750>

Pandey, S., Tewari, G. S., Singh, J., Rajpurohit, D., & Kumar, G. (2016). Efficacy of

- mulches on soil modifications, growth, production and quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *International Journal of Science and Nature*, 7(4), 813–820.
- Pang, Y., Yang, J., Chen, X., Jia, Y., Li, T., Jin, J., Liu, H., Jiang, L., Hao, Y., Zhang, H., & Xie, Y. (2021). An Antifungal Chitosanase from *Bacillus subtilis* SH21. *Molecules*, 26(7), 1863. <https://doi.org/10.3390/molecules26071863>
- Paredes-Sabja, D., Setlow, P., & Sarker, M. R. (2011). Germination of spores of Bacillales and Clostridiales species: Mechanisms and proteins involved. *Trends in Microbiology*, 19(2), 85–94. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.10.004>
- Parte, A. C. (2014). LPSN—list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D613–D616. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1111>
- Piggot, P. J., & Hilbert, D. W. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), 579–586. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.10.001>
- Qing, H., Huo, X., Huang, S., Zhao, L., Zhang, J., Ji, C., & Ma, Q. (2021). *Bacillus subtilis* ANSB168 Producing d-alanyl-d-alanine Carboxypeptidase Could Alleviate the Immune Injury and Inflammation Induced by Ochratoxin A. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(21), 12059. <https://doi.org/10.3390/ijms222112059>
- Ramírez Padrón, L. C., Cauich, I. C., Fernández, V. G. P., Luis, D. M., & Fernández, A. P. (2020). Análisis de los indicadores de competitividad de las exportaciones de fresa mexicana. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(4), 815–827. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i4.2049>
- Riley, M. A., & Wertz, J. E. (2002). Bacteriocins: Evolution, ecology, and application. *Annual Review of Microbiology*, 56, 117–137. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.161024>
- Rojas-Ruiz, N. E., Sansinenea-Royano, E., Cedillo-Ramirez, M. L., Marsch-

- Moreno, R., Sanchez-Alonso, P., & Vazquez-Cruz, C. (2015). Analysis of *Bacillus thuringiensis* Population Dynamics and Its Interaction With *Pseudomonas fluorescens* in Soil. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(9).
<https://doi.org/10.5812/jjm.27953>
- Romero, D., De Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J.-W., Arrebola, E., Cazorla, F. M., Kuipers, O. P., Paquot, M., & Pérez-García, A. (2007). The Iturin and Fengycin Families of Lipopeptides Are Key Factors in Antagonism of *Bacillus subtilis* Toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430–440. <https://doi.org/10.1094/mpmi-20-4-0430>
- Rong, S., Xu, H., Li, L., Chen, R., Gao, X., & Xu, Z. (2020). Antifungal activity of endophytic *Bacillus safensis* B21 and its potential application as a biopesticide to control rice blast. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 162, 69–77.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.09.003>
- Rowan, D. D. (2011). Volatile Metabolites. *Metabolites*, 1(1), 41–63.
<https://doi.org/10.3390/metabo1010041>
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. Á., Serrato-Díaz, A., Reyes-Ramírez, A., Estrada-Girón, Y., & Valencia-Botín, A. J. (2016). ANTIFUNGAL ACTIVITY AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF NATIVE STRAINS OF *Bacillus subtilis* ACTIVIDAD ANTIFUNGICA E IDENTIFICACION MOLECULAR DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus subtilis*. *Agrociencia*, 50(2), 133–148.
- Ruiz, B., Chávez, A., Forero, A., García-Huante, Y., Romero, A., Snchez, M., Rocha, D., Snchez, B., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., & Langley, E. (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 36(2), 146–167.
<https://doi.org/10.3109/10408410903489576>
- Saha, D., Purkayastha, G. D., Ghosh, a., Isha, M., & Saha, a. (2012). Isolation and Characterization of Two New *Bacillus Subtilis* Strains From the Rhizosphere of Eggplant As Potential Biocontrol Agents. *Journal of Plant*

Pathology, 94(1), 109–118.

Saha, M., Sarkar, S., Sarkar, B., Sharma, B. K., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P.

(2016). Microbial siderophores and their potential applications: a review.

Environmental Science and Pollution Research, 23(5), 3984–3999.

<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4294-0>

Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., & Bestervelt, L. L. (2013). Microbial

siderophores: A mini review. *Journal of Basic Microbiology*, 53(4), 303–317.

<https://doi.org/10.1002/jobm.201100552>

Salazar, S., Bayas-Morejón, F., Niño, Z., Guevara, J., Ruilova, M., Merino, O.,

Donato, W., & Guamán, J. (2018). Morphological and biochemical indicators of

Fusarium oxysporum f spp. *fragariae* in strawberry crops (*Fragaria x ananassa* Duch) in the province of Pichincha, Ecuador. *Agronomy Research*, 16(4),

1854–1861. <https://doi.org/10.15159/AR.18.206>

Samaras, A., Roumeliotis, E., Ntasiou, P., & Karaoglanidis, G. (2021). *Bacillus*

subtilis MBI600 Promotes Growth of Tomato Plants and Induces Systemic

Resistance Contributing to the Control of Soilborne Pathogens. *Plants*, 10(6),

1113. <https://doi.org/10.3390/plants10061113>

Schaechter, M. (2009). Encyclopedia of microbiology. *Encyclopedia of*

Microbiology, 1–4600. <https://doi.org/10.5860/choice.49-1215>

Schneider, T., Müller, A., Miess, H., & Gross, H. (2014). Cyclic lipopeptides as

antibacterial agents - Potent antibiotic activity mediated by intriguing mode of

actions. *International Journal of Medical Microbiology*, 304(1), 37–43.

<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.08.009>

Schwenninger, S. M., Lacroix, C., Truttmann, S., Jans, C., Spörndli, C., Bigler, L.,

& Meile, L. (2008). Characterization of Low-Molecular-Weight Antiyeast

Metabolites Produced by a Food-Protective *Lactobacillus-Propionibacterium*

Coculture. *Journal of Food Protection*, 71(12), 2481–2487.

<https://doi.org/10.4315/0362-028x-71.12.2481>

- Semreen, M. H., El-Gamal, M. I., Abdin, S., Alkhazraji, H., Kamal, L., Hammad, S., El-Awady, F., Waleed, D., & Kourbaj, L. (2018). Recent updates of marine antimicrobial peptides. *Saudi Pharmaceutical Journal*, *26*(3), 396–409.
<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.01.001>
- Sharma, S., Joshi, V. K., & Abrol, G. (2009). An overview on strawberry [*Fragaria × ananassa* (Weston) Duchesne ex Rozier] wine production technology, composition, maturation and quality evaluation. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, *8*(4), 356–365.
- Simons, A., Alhanout, K., & Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, Antimicrobial Peptides from Bacterial Origin: Overview of Their Biology and Their Impact against Multidrug-Resistant Bacteria. *Microorganisms*, *8*(5), 639.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8050639>
- Singh, R., Kumar, M., Mittal, A., & Mehta, P. K. (2017). Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech*, *7*(1).
<https://doi.org/10.1007/s13205-016-0586-4>
- Sivasakthi, S., Kanchana, D., Usharani, G., & Saranraj, P. (2013). Production of Plant Growth Promoting Substance by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* Isolates from Paddy Rhizosphere Soil of Cuddalore District, Tamil Nadu, India. *International Journal of Microbiological Research*, *4*(3), 227–233.
<https://doi.org/10.5829/idosi.ijmr.2013.4.3.75171>
- Sulochana, M. B., Jayachandra, S. Y., Kumar, S. K. A., & Dayanand, A. (2014). Antifungal attributes of siderophore produced by the *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25. *Journal of Basic Microbiology*, *54*(5), 418–424.
<https://doi.org/10.1002/jobm.201200770>
- Sun, Z., Wang, X., Zhang, X., Wu, H., Zou, Y., Li, P., Sun, C., Xu, W., Liu, F., & Wang, D. (2018). Class III bacteriocin Helveticin-M causes sublethal damage on target cells through impairment of cell wall and membrane. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *45*(3), 213–227.
<https://doi.org/10.1007/s10295-018-2008-6>

- Tamura K., Stecher G., and Kumar S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*
<https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tan, I. S., & Ramamurthi, K. S. (2014). Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports*, 6(3), 212–225.
<https://doi.org/10.1111/1758-2229.12130>
- Tan, N., Yazıcı-Tütüniş, S., Bilgin, M., Tan, E., & Miski, M. (2017). Antibacterial Activities of Pyrenylated Coumarins from the Roots of *Prangos hulussii*. *Molecules*, 22(7), 1098. <https://doi.org/10.3390/molecules22071098>
- Tareq, F., Lee, M., Lee, H.-S., Lee, J.-S., Lee, Y.-J., & Shin, H. (2014). Gageostatins A–C, Antimicrobial Linear Lipopeptides from a Marine *Bacillus subtilis*. *Marine Drugs*, 12(2), 871–885. <https://doi.org/10.3390/md12020871>
- Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3), 131–138.
- Tian, G. L., Bi, Y. M., Cheng, J. D., Zhang, F. F., Zhou, T. H., Sun, Z. J., & Zhang, L. S. (2019). High concentration of ferulic acid in rhizosphere soil accounts for the occurrence of *Fusarium* wilt during the seedling stages of strawberry plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 108(August), 101435. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2019.101435>
- Toral, L., Rodríguez, M., Béjar, V., & Sampedro, I. (2018). Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 9(JUN), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01315>
- Torres, M., Llamas, I., Torres, B., Toral, L., Sampedro, I., & Béjar, V. (2020). Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1. *Applied Soil Ecology*, 150(November), 103453. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103453>
- Usta, C.. (2013). Microorganisms in Biological Pest Control — A Review (Bacterial

Toxin Application and Effect of Environmental Factors).

<https://doi.org/10.5772/55786>

Vedaraman, N., & Venkatesh, N. (2011). Production of surfactin by bacillus subtilis mtcc 2423 from waste frying oils. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 28(2), 175–180. <https://doi.org/10.1590/s0104-66322011000200001>

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De Los Santos-Villalobos, S. (2018). El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>

Wan, C., Fan, X., Lou, Z., Wang, H., Olatunde, A., & Rengasamy, K. R. R. (2021). Iturin: cyclic lipopeptide with multifunction biological potential. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 0(0), 1–13. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1922355>

Winkelmann, G. (2007). Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *BioMetals*, 20(3–4), 379–392. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9076-1>

Wu, Y., Zhou, J., Li, C., & Ma, Y. (2019). Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by Bacillus amyloliquefaciens. *MicrobiologyOpen*, 8(8), e813. <https://doi.org/10.1002/mbo3.813>

Xu, Z., Shao, J., Li, B., Yan, X., Shen, Q., & Zhang, R. (2013). Contribution of bacillomycin D in Bacillus amyloliquefaciens SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(3), 808–815. <https://doi.org/10.1128/AEM.02645-12>

Zavaliev, R., Mohan, R., Chen, T., & Dong, X. (2020). Formation of NPR1 Condensates Promotes Cell Survival during the Plant Immune Response. *Cell*, 182(5), 1093-1108.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.07.016>

Zhang, L., & Sun, C. (2018). Fengycins, cyclic lipopeptides from marine Bacillus

subtilis strains, kill the plant-pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation.

Applied and Environmental Microbiology, 84(18), 1–46.

<https://doi.org/10.1128/AEM.00445-18>

Zhang, X., Guo, X., Wu, C., Li, C., Zhang, D., & Zhu, B. (2020). Isolation, heterologous expression, and purification of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain Z-14. *Microbial Cell Factories*, 19(1).

<https://doi.org/10.1186/s12934-020-01475-1>

Zhao, Z., Wang, Q., Wang, K., Brian, K., Liu, C., & Gu, Y. (2010). Study of the antifungal activity of *Bacillus vallismortis* ZZ185 in vitro and identification of its antifungal components. *Bioresource Technology*, 101(1), 292–297.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.071>

Zheng, Z., Ma, C., Gao, C., Li, F., Qin, J., Zhang, H., Wang, K., & Xu, P. (2011). Efficient Conversion of Phenylpyruvic Acid to Phenyllactic Acid by Using Whole Cells of *Bacillus coagulans* SDM. *PLoS ONE*, 6(4), e19030.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019030>

Anexos

- Secuencia de ARNr 16S de la cepa 49-1

TXBA101 JCDB49

```
TGGATAGAACATATCTAGGTGGCCATCCACCGCATGTAGCGTGCATCGCATGCAGGCTCGGAGTGAGGAGAG
GCTACCTCACCGAGTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGGGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAAACGT
ATTCACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCG
AACTGAGAACAGATTTGTGGGATTGGCTTAACCTCGCGTTTCGCTGCCCTTTGTTCTGTCCATTGTAGCACGT
GTGTAGCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCCGGCAGTA
CCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGATCAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATC
TCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACTCTGCCGGCGAAGGGGACGTCCTATCTAGGA
TTGTCAGAGGATGTAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTG
CGGGCCCCGTC AATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTTCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTAATGCGTTAGCT
GCAGCTAAGGGGGCGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTACTACCAACGGTATCTAT
CCTGTTTCGCTCCCCACGCTGTGCTCTCAGCGTCAGTAACAGACAGAGAGTCGCTTCGGCACTGGGTGTTCTCC
ACAATCTCTACGCATTCACCCCTACACGTGAATTC AATTCCTCTCTGACTCAGTTCCAGTTCCATGGACTTCC
CCGTGAGAGCGGGGCTTACATCAAACCTAAGAAACCGCTGGCGAGCCTTACGCCATTAATTCGGACAA
ACGCTGCCCCCTACGGTTATACGCGTCTGCTCACTAATAGCCTGCCTTCTGTTAGTCGTAAGGGCCCCCTAT
TTGAAACGACTGTTTCTTTCTTAAAAAAGAGCTATCATTGCAAAACTCTTCAAGGGGTTGTCGTTGCAAAAT
TTGTCTATTGGAAGATTCAATGCGCGCTCCTAGGGTTCGGCTATCATATCCAATGGGGCAATCTTCAAGGCT
ACACACTGTCGTGTAAGACTATACTCTGT CAGGAGCTGA
```

- Resultado de la prueba MALDI TOF de la cepa 49-2

PRUEBA	RESULTADO	UNIDAD	INTERVALO BIOLÓGICO DE REFERENCIA
IDENTIFICACION BACTERIANA			
MICROORGANISMO IDENTIFICADO:	Bacillus subtilis		
VALOR DEL ESPECTRO:	2.178		
Sistema MALDI TOF MS			
<i>(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Epectrometry)</i>			
Equipo: Bruker Daltonics, Microflex LT (Espectrómetro de Masas)			
Software: FlexControl (versión 3.0 BrukerDaltonics).			
Calibración del espectrómetro: con <i>Escherichia coli</i> DH5 (BTS; Bruker Daltonics).			
Software de análisis: MALDI Biotyper RTC 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania.)			
Criterios de identificación (Valor del espectro):			
Valores >2,000 indica identificación a nivel de especie,			
Valores entre 1,700-1,999 indica identificación confiable sólo a nivel de género,			
Valores < 1,700 no permiten identificación.			

- Resultado de la prueba MALDI TOF de la cepa 49-3

PRUEBA	RESULTADO	UNIDAD	INTERVALO BIOLÓGICO DE REFERENCIA
IDENTIFICACION BACTERIANA			
MICROORGANISMO IDENTIFICADO:	Bacillus amyloliquefaciens		
VALOR DEL ESPECTRO:	2.000		
Sistema MALDI TOF MS			
<i>(Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Epectrometry)</i>			
Equipo: Bruker Daltonics, Microflex LT (Espectrómetro de Masas)			
Software: FlexControl (versión 3.0 BrukerDaltonics).			
Calibración del espectrómetro: con <i>Escherichia coli</i> DH5 (BTS; Bruker Daltonics).			
Software de análisis: MALDI Biotyper RTC 3.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania.)			
Criterios de identificación (Valor del espectro):			
Valores >2,000 indica identificación a nivel de especie,			
Valores entre 1,700-1,999 indica identificación confiable sólo a nivel de género,			
Valores < 1,700 no permiten identificación.			