

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS - ICUAP

**POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS**

Actividad antifúngica de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de mezquite (*Prosopis laevigata*) como agentes de biocontrol contra *Fusarium oxysporum*

TESIS

Que para obtener el grado de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)

Con opción en **BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

PRESENTA: QFB. MARÍA DOLORES LÓPEZ RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSE ANTONIO MUNIVE HERNÁNDEZ

CODIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA DEL ROCÍO BUSTILLOS CRISTALES

H. PUEBLA DE ZARAGOZA

DICIEMBRE 2021



BUAP

Puebla, Pue. a 30 de noviembre 2021.

**A LA ACADEMIA DEL POSGRADO
EN MICROBIOLOGÍA
CICM-ICUAP
P R E S E N T E.**

Por este conducto los abajo firmantes, integrantes del Comité revisor de Tesis de Maestría de la alumna **María Dolores Lòpez Ramírez**, les informamos que hemos revisado el escrito titulado:

“Actividad antifúngica de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de mezquite (*Prosopis laevigata*) como agentes de biocontrol contra *Fusarium oxysporum*”

A nuestro juicio, la alumna **María Dolores Lòpez Ramírez**, puede proceder a la digitalización de la tesis y a la presentación del examen de grado correspondiente.

Sin más que agregar, nos despedimos afectuosamente de ustedes.

Atentamente.
“Pensar Bien Para Vivir Mejor”

D.C. Verónica Quintero Hernández

D.C. Antonino Baez Rogelio

D.C. Ricardo Carreño Lòpez

D.C. Nora Hilda Rosas Murrieta

D.C. Jesús Muñoz Rojas



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

Se agradece a la Vicerrectoría de Investigación y Estudio de Posgrado por el apoyo otorgado para la conclusión de esta tesis dentro del Programa IV. Investigación y Posgrado. Apoyar a los programas de posgrado para lograr su incorporación al Padrón Nacional de Calidad. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional 2017-2021.

A la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por ser sede de mi formación profesional ahora también a nivel de posgrado.

A mi asesor el Dr. José Antonio Munive Hernández y mi coasesora la Dra. María del Rocío Bustillos Cristales por darme la oportunidad de trabajar con ellos y por todo el apoyo brindado durante la realización de esta tesis.

A mi comité tutorial, por sus observaciones y comentarios que favorecieron el desarrollo de este proyecto. De igual manera a mi comité revisor por su gran ayuda durante la revisión de esta tesis.

A mis profesores, por su dedicación y empeño al compartir sus conocimientos.

A mi familia, por su infinito amor y apoyo en los momentos buenos y los difíciles.

A todas las personas que han sido luz en mi camino.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1 Los hongos fitopatógenos y la seguridad alimentaria.....	2
2.2 El biocontrol.....	3
2.3 <i>Fusarium oxysporum</i>	5
2.3.1 Generalidades.....	5
2.3.2 Marchitez vascular del jitomate por <i>Fusarium oxysporum</i> en México.....	6
2.4 El género <i>Bacillus</i>	8
2.4.1 Características.....	8
2.4.2 Actividad antifúngica de <i>Bacillus</i> frente a <i>Fusarium oxysporum</i>	9
2.5 <i>Prosopis laevigata</i> en México.....	12
3. ANTECEDENTES	13
4. JUSTIFICACIÓN	15
5. OBJETIVOS	16
5.1 Objetivo general.....	16
5.2 Objetivos específicos.....	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1 Material biológico.....	17
6.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antifúngico de cepas de <i>Bacillus</i> sp. aisladas de nódulos de mezquite contra <i>Fusarium oxysporum</i> por medio de ensayos de cultivo dual.....	17
6.3 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas de <i>Bacillus</i> sp. contra <i>Fusarium oxysporum</i>	18
6.4 Análisis <i>in silico</i> de la diversidad de las enzimas líticas de <i>Bacillus</i> sp. con actividad antagonista contra hongos fitopatógenos.....	19
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	20
7.1 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antifúngico de cepas de <i>Bacillus</i> sp. aisladas de nódulos de mezquite contra <i>Fusarium oxysporum</i> por medio de ensayos de cultivo dual.....	20
7.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas de <i>Bacillus</i> sp. contra <i>Fusarium oxysporum</i>	23
7.3 Análisis <i>in silico</i> de la diversidad de las enzimas líticas de <i>Bacillus</i> sp. con actividad antagonista contra hongos fitopatógenos.....	25
7.3.1 Análisis de las endoquitinasas.....	26
7.3.2 Análisis de las quitobiosidasas.....	29
7.3.3 Análisis de las β -N-acetilhexosaminidasas.....	31
7.3.4 Análisis de la quitina desacetilasa.....	33
7.3.5 Análisis de las quitosanasas.....	36
7.3.6 Análisis de las β -1,3 glucanasas.....	40
7.3.7 Análisis de la serina proteasa alcalina.....	42

7.4 Discusión general.....	47
8. CONCLUSIONES.....	50
9. BIBLIOGRAFÍA.....	51

1. RESUMEN

La infección de hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas representa una amenaza importante para la seguridad alimentaria y la economía de los países. Dado el impacto que poseen estos patógenos, es importante llevar a cabo su control considerando el cuidado del ambiente, la inocuidad de los productos y la salud de los humanos y animales. El biocontrol representa una alternativa a esta problemática, pues emplea organismos vivos (agentes de biocontrol) para reducir la densidad y efectos dañinos de estos patógenos, favoreciendo así una disminución en el uso de fungicidas químicos y sus efectos colaterales. Diferentes especies del género bacteriano *Bacillus* ya han demostrado ser agentes de biocontrol efectivos frente un amplio rango de hongos fitopatógenos, e incluso varias cepas han sido utilizadas para el desarrollo de biopesticidas a nivel comercial. Sin embargo, es necesario continuar con la investigación de nuevas cepas que posean múltiples mecanismos de biocontrol que permitan desarrollar nuevos productos comerciales con los cuales hacer frente a la creciente demanda alimentaria, pero buscando reducir el impacto en el ambiente. Por lo anterior, en este trabajo buscamos evaluar la actividad antifúngica de cepas de *Bacillus* aisladas de nódulos de mezquite (*Prosopis laevigata*) frente a una cepa de *Fusarium oxysporum* previamente aislada como causante de marchitez vascular en plantas de jitomate en invernaderos de Tetela de Ocampo, Puebla. Dicha enfermedad es considerada una de las más devastadoras pues impacta severamente el rendimiento y la calidad de este cultivo, el cual es uno de los más importantes para México dado que nuestro país se encuentra entre los principales productores y exportadores de jitomate a nivel mundial. Al evaluar la actividad antifúngica de una colección de bacterias del género *Bacillus*, pertenecientes a la colección del Laboratorio de Ecología Microbiana del ICUAP-BUAP, en contra del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*, se encontraron tres cepas de *Bacillus* que inhibieron significativamente al crecimiento de *Fusarium oxysporum*. En el ensayo de la actividad de los compuestos orgánicos volátiles, se observó que estos no inhibieron significativamente al crecimiento del hongo; sin embargo, estos compuestos podrían estar relacionados con la disminución en la producción de pigmentos observada en el micelio del hongo y por tanto esto podría contribuir a la disminución en su patogenicidad, como ya se ha descrito en trabajos previos. Considerando que ya se ha reportado la producción de enzimas líticas como uno de los principales mecanismos del efecto antifúngico, se realizó un análisis *in silico* para estudiar la diversidad de las secuencias aminoacídicas de enzimas líticas utilizadas por *Bacillus* para llevar a cabo el biocontrol de fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*. Finalmente, aunque es necesario evaluar con mayor profundidad a estas cepas, tanto de manera *in vitro* como *in vivo*, estas podrían resultar útiles para su aplicación debido al efecto antagónico que mostraron frente a este hongo, la diversidad encontrada en las enzimas líticas de este género, además de los estudios previos que han demostrado la presencia de mecanismos promotores del crecimiento vegetal en estas cepas; todo esto podría contribuir a la protección de la planta de jitomate frente al ataque de organismos fitopatógenos que afectan su desarrollo.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Los hongos fitopatógenos y la seguridad alimentaria

El crecimiento persistente de la población mundial y los patrones de consumo continúan generando un aumento en la demanda de alimentos (Ganivet, 2020). Tan sólo para los años 2050 y 2100 se espera que la población alcance los 9,700 y 10,900 millones de personas, respectivamente (Naciones Unidas, 2019). Esta tendencia de crecimiento hace cada vez más difícil lograr la seguridad alimentaria global, la cual consiste en el acceso físico y económico de las personas a alimentos inocuos, nutritivos y suficientes para satisfacer sus necesidades dietéticas y así poder llevar una vida saludable (FAO & OMS, 2019; Prosekov & Ivanova, 2018). Existen también otras situaciones que dificultan alcanzar la seguridad alimentaria, tales como las crisis financieras, conflictos sociales, pobreza, el cambio climático, desastres naturales, enfermedades de los animales de ganado, daño ambiental, depleción de recursos naturales, desperdicio de alimentos, pérdidas postcosecha, así como el ataque de plagas y patógenos a cultivos agrícolas (Garcia *et al.*, 2020; Prosekov & Ivanova, 2018; Savary & Willocquet, 2020; Sawicka, 2019).

Las enfermedades de los cultivos pueden resultar una amenaza importante para la seguridad alimentaria debido a que pueden afectar la producción, disponibilidad, acceso, suministro, calidad, inocuidad y el valor nutricional de los productos agrícolas (Savary & Willocquet, 2020). Dentro de los organismos que pueden generar enfermedades a los cultivos están las bacterias, virus, nemátodos, insectos, oomicetos, plantas parásitas y hongos (Morris & Moury, 2019). Éstos últimos amenazan severamente a la seguridad alimentaria pues generan la pérdida de más del 30 % de la producción agrícola global anual a través de enfermedades en los cultivos o procesos de deterioro en los productos postcosecha, además de que algunos de ellos pueden producir micotoxinas o actuar como agentes infecciosos oportunistas. Dado el impacto que poseen, es importante llevar a cabo su control (Avery *et al.*, 2019).

Actualmente el control de los hongos patógenos de cultivos puede resultar difícil debido a diferentes situaciones, siendo la más importante la estructura de los ecosistemas agrícolas actuales basados principalmente en monocultivos genéticamente uniformes realizados a gran escala, con alta densidad y baja rotación a los que se les aplican grandes cantidades de fertilizantes y pesticidas; y a los que se introducen tecnologías que mecanizan diferentes procesos. Tal patrón de organización lleva a una homogeneidad ambiental y genética en el ecosistema que favorece el surgimiento de nuevas cepas resistentes a los fungicidas u hospedero-especializadas que evolucionan más rápido y son más virulentas que sus ancestros silvestres (McDonald & Stukenbrock, 2016). Hay otras situaciones que también dificultan el control de estos patógenos. Los desastres naturales como las inundaciones, por ejemplo, crean rutas por las que se propagan los patógenos y alcanzan nuevas tierras de cultivo (Garcia *et al.*, 2020). La capacidad de diseminación de los hongos o sus esporas a través de corrientes de aire o agua también favorecen su propagación a larga distancia. El comercio global, por otra parte, si bien permite el suministro de alimentos entre naciones, también favorece la propagación de patógenos de plantas alrededor del mundo, lo que dificulta su control (Fones *et al.*, 2020). Por último, el cambio climático modifica las

propiedades de la atmósfera y por tanto afecta al desarrollo, distribución y resistencia de los patógenos y las plantas hospedadoras, así como su interacción (Nazir *et al.*, 2018).

El uso de fungicidas, otros pesticidas y agroquímicos en general ha permitido el incremento de la producción agrícola desde la “revolución verde” en el siglo pasado. Sin embargo, sus residuos actuales y los generados en el pasado que aún persisten en el ambiente tienen múltiples consecuencias en los ecosistemas terrestres y acuáticos, la salud humana, la biota no humana y la inocuidad de los alimentos (Carvalho, 2017). Es poco probable que se pueda prescindir del uso de los pesticidas químicos en los próximos años debido a que la seguridad alimentaria actual continúa haciendo presión en su uso intensivo. Tan sólo entre el 2010 y 2014, los países con los valores más altos en uso promedio anual de pesticidas en kg/ha fueron Japón (18.94), China (10.45), México (7.87), Brasil (6.166), Alemania (5.123), Francia (4.859), Reino Unido (4.034) y EUA (3.886); todos ellos por encima del promedio global (2.784) (Zhang, 2018). Sin embargo, es importante disminuir su aplicación y sus efectos colaterales, por medio de diferentes medidas como lo es su uso racional, su aplicación precisa para reducir la cantidad empleada; la recuperación y tratamiento de sitios contaminados; la capacitación de los agricultores con respecto al riesgo de estas sustancias; un registro apropiado de estos productos, así como la adopción de mejores prácticas agrícolas que consideren a la protección de los cultivos por medio de técnicas como las del manejo integrado de plagas (IPM; *integrated pest management*) que son estrategias para controlar la población de patógenos por debajo de niveles económicamente perjudiciales, lo cual permite la aplicación mínima de pesticidas químicos. Dentro del IPM, el biocontrol es la estrategia más estudiada y es el fundamento de diversas aplicaciones prácticas para el control de hongos y patógenos en general de plantas (Stenberg, 2017; Syed Ab Rahman *et al.*, 2018).

2.2 El biocontrol

El biocontrol o también llamado control biológico es una estrategia que consiste en el uso de organismos vivos para reducir la densidad de población o efectos dañinos de plagas o patógenos. A los organismos que llevan a cabo tal actividad supresora se les denomina agentes de biocontrol y éstos se usan principalmente para el control de invertebrados, hierbas, así como patógenos de plantas y productos postcosecha (Droby *et al.*, 2016; Eilenberg *et al.*, 2001).

Para el biocontrol de patógenos de cultivos agrícolas se emplean principalmente a microorganismos antagonistas como bacterias y hongos no patógenos para el humano, los cuales tienen la capacidad de crecer en la rizósfera o en el interior de las raíces (como endófitos) donde actúan como una línea de defensa para la planta por medio de mecanismos como: a) La antibiosis, la cual consiste en la inhibición del crecimiento o la inducción de la muerte del patógeno por medio de la secreción de compuestos antibióticos difusibles, compuestos orgánicos volátiles, toxinas, además de la producción de enzimas líticas degradadoras, b) Hiperparasitismo, mecanismo en el que los agentes invaden las estructuras del patógeno y lo aniquilan para después invadir sus restos, c) La competencia con el patógeno por el espacio y nutrientes, la cual establecen por ejemplo por medio de la producción de compuestos como los sideróforos que quelan a diferentes iones metálicos,

pero en especial al hierro haciéndolo menos disponible para el patógeno y por tanto inhibiendo su crecimiento y d) Inducción de la respuesta sistémica de las plantas, en este mecanismo, los agentes de biocontrol producen ciertos compuestos denominados elicitors, los cuales inducen a genes de defensa de las plantas que le permiten responder más rápido y mejor al subsecuente ataque de patógenos. Los agentes de biocontrol también pueden contribuir a la defensa al promover el crecimiento de la planta al mejorar su nutrición por medio de mecanismos como la fijación de nitrógeno o la solubilización de fosfato, o al mejorar las habilidades de la planta para soportar el estrés biótico o abiótico. Muchos agentes de biocontrol ejecutan una combinación de varios mecanismos y esto favorece el ataque al patógeno de una u otra manera. Comprender tales mecanismos permite un mejor control de las enfermedades de las plantas (Köhl *et al.*, 2019; Syed Ab Rahman *et al.*, 2018).

En la búsqueda de nuevos probables agentes de biocontrol, los microorganismos candidatos deben ser no patógenos para el humano, poseer la capacidad de crecer en medios de cultivo artificiales; ser efectivos contra el patógeno al que están dirigidos tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Sus mecanismos de acción deben ser caracterizados para conocer cómo lleva a cabo el control del patógeno. También se debe analizar su tolerancia al estrés causado por factores ambientales para posteriormente realizar su estudio en campo donde el agente también debe ser efectivo y específico para el control del patógeno. En este paso son críticos la formulación y método de aplicación del agente, dentro de los métodos de aplicación más frecuentes se encuentran: el tratamiento de las semillas con la formulación del agente, y la aplicación directa de éste en el suelo del cultivo o sobre la planta. Es importante de igual manera realizar la evaluación de los riesgos que podría tener este posible nuevo producto comercial (Eljounaidi *et al.*, 2016; Köhl *et al.*, 2019; Le Mire *et al.*, 2016).

Desde la introducción del biocontrol, se han reportado múltiples casos del éxito de su uso. Sin embargo, su práctica no ha sido aceptada universalmente debido a diferentes circunstancias que han obstaculizado su adopción a lo largo del tiempo tales como la introducción y adopción exitosa de los pesticidas químicos, los marcos regulatorios y políticos variables entre países, una disminución en la práctica e investigación del biocontrol en algunos países, la experiencia limitada de las agencias regulatorias, los procesos ineficientes de registro de productos de biocontrol, la falta de comprensión de esta práctica y de la apreciación de sus beneficios ambientales, económicos y sociales por parte de los agricultores, inversionistas, sociedad en general y los políticos, así como la aversión al riesgo económico por parte de los productores ante la adopción de prácticas nuevas. Para hacer frente a estos obstáculos y lograr un progreso es necesario un enfoque multidisciplinario que involucre a los elementos necesarios tales como científicos, economistas, productores, industrias, políticos e instituciones públicas para en conjunto lograr un cambio significativo en la conciencia pública, políticas, regulaciones y prácticas que soporten la implementación de prácticas agrícolas sustentables como lo es el biocontrol para el beneficio del ambiente, la sociedad y la economía (Barratt *et al.*, 2018; Garcia *et al.*, 2020).

Dado que los hongos representan una seria amenaza para la seguridad alimentaria, en parte por su ataque a cultivos agrícolas es importante llevar a cabo su control por medio de estrategias que posean un bajo impacto ecológico y que disminuyan la dependencia a los fungicidas químicos (Bebber & Gurr, 2015). En este aspecto, el biocontrol representa una alternativa para la producción sustentable de alimentos, la mejora en su inocuidad, así como la protección del ambiente ya que su uso permite el control de los hongos patógenos además de disminuir la dosis utilizada de fungicidas químicos o su frecuencia de aplicación (Barratt *et al.*, 2018).

Dentro de los hongos patógenos de plantas más devastadores y por tanto de mayor importancia económica a nivel global están *Magnaporthe oryzae*, *Botrytis cinerea*, *Puccinia spp.*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella graminicola*, *Colletotrichum spp.*, *Melampsora lini*, *Phakopsora pachyrhizi* y *Rhizoctonia solani*, los cuales atacan a diferentes cultivos de cereales, frutas, vegetales y ornamentales (Dean *et al.*, 2012). Para su biocontrol ya se han reportado principalmente a cepas pertenecientes a los géneros bacterianos *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, *Paenibacillus spp.* y *Burkholderia spp.*, además de géneros fúngicos como *Trichoderma spp.*, *Glomus spp.* y *Ulocladium spp.* (Abbey *et al.*, 2019; Araújo *et al.*, 2017; Gupta *et al.*, 2020; Islam *et al.*, 2018; Law *et al.*, 2017; Hui Li *et al.*, 2018; Matzen *et al.*, 2019; Reiss & Jørgensen, 2017; Shi *et al.*, 2014; Zohora *et al.*, 2016).

2.3 *Fusarium oxysporum*

2.3.1 Generalidades

Fusarium oxysporum es un hongo filamentoso que pertenece al filo de los Ascomicetos, es aerobio facultativo, mesófilo, de reproducción asexual, con una morfología microscópica que varía entre aislamientos a nivel de macroconidios, microconidios, clamidosporas (formas de resistencia) y fiálides. De igual manera, una morfología macroscópica variada entre aislamientos pudiendo ser de micelio escaso a abundante con una coloración que va del blanco al rosa y a menudo al violeta cuando se le crece en agar papa dextrosa (PDA) (Deacon, 2006; Isaac *et al.*, 2018). Esta especie incluye a un complejo que abarca cepas patógenas (de plantas, animales y humanos) y no patógenas, comúnmente encontradas en suelos y en ambientes acuáticos. Las cepas patógenas de plantas pueden causar síntomas de marchitez vascular o de pudrición en cultivos agrícolas, ornamentales, hierbas, así como plantas acuáticas o parásitas. Algunos de los cultivos agrícolas que pueden verse afectados por este hongo son los de jitomate, plátano, algodón, pepino, melón, frijol, zanahoria, soya, fresa, arroz, cebolla, espinaca, apio, chile, col, rábano, ajo, garbanzo, uva, papa, tabaco, jengibre, entre otros. Sin embargo, las cepas individuales de este hongo presentan una patogenicidad selectiva hacia sus hospederos. Las cepas con el mismo rango de hospederos son agrupadas en una *forma specialis* (f.sp.) que es un tipo de clasificación no taxonómica aceptada desde 1930 por el Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas. Por ejemplo, las cepas de *Fusarium oxysporum* que causan marchitez vascular en la planta de jitomate pertenecen a la *forma specialis lycopersici*. Otro término utilizado es “*radicis*” el cual permite distinguir a las cepas que producen el síntoma de pudrición de las que producen marchitez vascular. Por ejemplo, *Fusarium oxysporum forma specialis radicis*-

lycopersici genera pudrición de la raíz en la planta de jitomate. Aunque es muy probable que el número de *formae speciales* (plural de *forma specialis*) reportadas continúe aumentando, ya se han reportado más de 100 *formae speciales* bien caracterizadas (Edel-Hermann & Lecomte, 2019).

Las cepas patógenas de *Fusarium oxysporum* usan diferentes mecanismos de patogenicidad para invadir a sus hospederos, tales como enzimas hidrolíticas degradadoras de pared celular vegetal, metabolitos secundarios, componentes de vías de señalización celular, así como la producción y secreción de efectores y toxinas hospedero-específicas (Rana *et al.*, 2017). Posteriormente estas cepas fúngicas pueden causar el síntoma de marchitez vascular que resulta de su entrada a los vasos del xilema donde proliferan e impiden el transporte de agua y minerales, lo que da paso a un amarilleo progresivo de la planta y su marchitez. La pudrición es otro síntoma diferente el cual se genera cuando las cepas patógenas del hongo entran a la planta sin alcanzar los vasos del xilema pero cuyo crecimiento genera la formación de tejidos decolorados en la planta que se tornan a color café y luego a puntos negros necróticos que llevan a la pudrición de la planta. Este último tipo de síntoma se presenta principalmente en plantas con órganos de almacenamiento tales como bulbos, tubérculos y rizomas (Edel-Hermann & Lecomte, 2019; Eljounaidi *et al.*, 2016).

Dado el gran número de cultivos que puede afectar y las pérdidas económicas que esto representa, *Fusarium oxysporum*, se encuentra dentro de los hongos más devastadores a nivel mundial (Dean *et al.*, 2012). De igual manera, las micotoxinas producidas por algunas cepas de este hongo tales como beauvericina, ácido fusárico, toxina T-2, moniliformina y zearalenona representan una amenaza para la inocuidad alimentaria pues son metabolitos secundarios producidos por el hongo como un mecanismo de defensa frente a otros organismos, pero que sin embargo pueden llegar a contaminar a los alimentos y productos agrícolas durante cualquier etapa de su producción, procesado, transporte, almacenamiento y comercialización. El consumo de los productos contaminados con micotoxinas lleva a fenómenos de toxicidad que dependen de la cantidad consumida, el tiempo de exposición, así como la sensibilidad y el estado fisiológico del humano o animal que las consume. Sin embargo, ya se ha reportado que en mamíferos las micotoxinas pueden tener efectos inunosupresores, carcinogénicos, necrotóxicos, mutagénicos, teratogénicos y hepatotóxicos. Por todo lo anterior, es importante prevenir y atender el ataque de este hongo a los cultivos agrícolas y la contaminación de los alimentos con sus micotoxinas (Cinar & Onbasi, 2019).

2.3.2 Marchitez vascular del jitomate por *Fusarium oxysporum* en México

El jitomate (*Solanum lycopersicum*) es una planta herbácea de la familia de las Solanaceas que se caracteriza por poseer un tallo largo, un sistema radicular profundo y poco ramificado además de flores agrupadas en racimos. Su fruto es una baya que va del color amarillo al rojo. Esta hortaliza es considerada un alimento diario esencial que puede consumirse fresco o como producto de diferentes procesos. Posee una importancia nutricional debida a su constitución que incluye compuestos promotores de la salud tales como vitaminas, compuestos fenólicos y carotenoides (Kimura & Sinha, 2008; Quinet *et al.*, 2019). De igual manera cuenta con una importancia económica pues tan solo en el 2019 en

el mundo se produjeron aproximadamente 180.7 millones de toneladas de esta hortaliza, lo que hace de este cultivo uno de los más importantes a nivel mundial (FAOSTAT, 2021).

México se encuentra entre los principales países productores de jitomate e incluso dada la calidad de su producción desde el 2006 se mantiene como el principal exportador de esta hortaliza a nivel mundial siendo Estados Unidos el destino principal (FAOSTAT, 2021). La producción de jitomate a nivel nacional se realiza a cielo abierto o en invernadero siendo Sinaloa, Sonora, Baja California, Nayarit, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Morelos, San Luis Potosí, Guanajuato, Tamaulipas, Hidalgo y Puebla los estados que prácticamente cubren la demanda nacional y la de exportación (Ascencio-Alvarez *et al.*, 2008). Sin embargo, su producción comercial puede verse afectada por diversos factores abióticos y bióticos a los que es sensible la planta. Dentro de los abióticos se encuentran las temperaturas extremas, la salinidad, la sequía, los niveles de CO₂ así como la presencia de metales pesados u otros contaminantes en el suelo (Baruah *et al.*, 2019; Hafiz & Ma, 2021; Mami *et al.*, 2011; Quinet *et al.*, 2019). Con respecto a los factores bióticos están organismos como las bacterias, virus, nemátodos, insectos, plantas parásitas y hongos. Dentro de estos últimos está *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* que ya se ha reconocido como el principal agente causante de marchitez vascular en plantas de jitomate en México. Esta enfermedad es considerada una de las más devastadoras pues impacta severamente el rendimiento y la calidad del producto, aunque de manera específica su severidad e incidencia está condicionada por factores como la localización geográfica, la fisiología de la planta, factores climáticos y las prácticas de cultivo (Isaac *et al.*, 2018). Ya en diferentes fuentes se ha reportado el impacto de esta enfermedad en la producción de jitomate de diversas regiones del país (Armenta-Lopez *et al.*, 2021; Ascencio-Alvarez *et al.*, 2008; Hernández *et al.*, 2018; Isaac *et al.*, 2018).

En México se ha detectado la presencia de las tres razas (1 a 3) hasta ahora descritas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en la literatura, las cuales se distinguen por su capacidad para infectar a un grupo específico de cultivos de jitomate dependiendo los genes de resistencia que estos posean (Ascencio-Alvarez *et al.*, 2008). Actualmente, dentro de las estrategias más utilizadas para disminuir las pérdidas económicas causadas por este hongo en México está el uso de variedades resistentes, así como la aplicación de grandes cantidades de productos químicos de los que no se tiene un control adecuado, lo que lleva a mayores costos de producción y múltiples consecuencias para el ambiente y la salud (Hernández *et al.*, 2018). Sin embargo, es necesario atender las enfermedades que afectan a este cultivo para obtener los rendimientos adecuados, pero manteniendo su calidad para que sea autorizada su exportación y al mismo tiempo desarrollando una agricultura sustentable (SADER, 2017). El biocontrol de patógenos de cultivos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* empleando productos hechos a base de microorganismos antagonistas como es el caso de productos a base de especies del género *Bacillus*, es también una estrategia que ya se encuentran en el mercado nacional (Villarreal-Delgado *et al.*, 2018).

2.4 El género *Bacillus*

2.4.1 Características

El género *Bacillus* incluye a un gran número de bacterias Gram-positivas pertenecientes al filo *Firmicutes* que poseen forma de varilla recta o ligeramente curva con un diámetro de 0.4 a 1.8 μm y una longitud de 0.9 a 10 μm , las cuales pueden encontrarse individuales, en pares, en cadenas o formando filamentos largos; son en su mayoría móviles por medio de flagelos peritricos, formadoras de endosporas, catalasa positiva, aerobias o anaerobias facultativas. Poseen una amplia variedad de habilidades fisiológicas que van desde ser psicrófilas a termófilas, acidófilas a alcalófilas, halotolerantes o halófilas. Sus esporas son altamente resistentes a factores como el calor, desinfectantes, radiación y desecación lo que favorece que estas bacterias sean ubicuas pues pueden estar presentes en el suelo, aire, agua, ambientes extremos, el tracto gastrointestinal de animales, así como en la superficie, interior y la rizósfera de plantas, o como contaminante en alimentos, productos farmacéuticos o quirófanos. La mayoría de las especies de este género son no patógenas y raramente se asocian a enfermedades en animales o humanos. Sin embargo, existen excepciones como *Bacillus anthracis* causante de ántrax, y otras especies que pueden causar intoxicación o infecciones oportunistas, además de cepas de *Bacillus thuringiensis* que son patógenas de invertebrados (Fira *et al.*, 2018; Goodfellow *et al.*, 2009).

Muchas especies de *Bacillus* crecen bien en medios de rutina como el agar nutriente y el agar soya tripticasa pero la mayoría de ellas crece en agar sangre. Su temperatura de crecimiento varía entre 4 y 50 °C con una temperatura óptima que va de los 25 a 37 °C. La morfología colonial varía entre especies y cepas de una misma especie además de que también se ve afectada por las condiciones de incubación (Bhunja, 2008; Goodfellow *et al.*, 2009). Para la identificación molecular de aislamientos de *Bacillus*, uno de los enfoques más aplicados es la comparación de secuencias del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S. Sin embargo, ya se ha reportado también que el análisis de genes como *rpoB* (que codifica la subunidad β de la RNA polimerasa) y *recA* (que codifica la recombinasa A) resulta más eficiente para diferenciar entre especies cercanamente relacionadas (Mohkam *et al.*, 2016).

El género *Bacillus* posee una gran importancia biotecnológica y económica pues algunos de sus miembros son bien conocidos por su uso en la medicina, industria y agricultura (Lyngwi & Joshi, 2014). En esta última área, ya se ha reportado su uso como agentes promotores del crecimiento vegetal que aumentan la biomasa de las plantas, la biodisponibilidad de nutrientes y la resistencia de las plantas frente a diversos tipos de estrés. También se han reportado como biorremediadores de aguas y suelos contaminados, asistentes del proceso de fitorremediación y como agentes de biocontrol que defienden a la planta del ataque de patógenos (Fira *et al.*, 2018; Nayak *et al.*, 2018) Dentro de las especies de *Bacillus* importantes en la agricultura se distinguen dos importantes linajes taxonómicos que son el grupo de *Bacillus subtilis* y el de *Bacillus cereus*. El grupo de *B. subtilis* incluye a las especies *B. subtilis* subsp. *subtilis*, *B. tequilensis*, *B. mojavensis*, *B. halotolerans*, *B. atrophaeus*, *B. nakamurai*, *B. velezensis*, *B. siamensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. sonorensis*, *B. glycinifermentans*, *B. swezeyi*, *B. paralicheniformis*, *B. licheniformis*, *B. haynesi*, *B. vallismortis*, *B. altitudinis*, *B. pumilus*, *B. safensis*, *B. xiamenensis*, *B. australimaris*, *B.*

zhangzhouensis, *B. inaquosorum*, *B. spizizenii* y *B. stercoris* Estos miembros poseen fenotipos muy cercanos que se han podido diferenciar empleando diferentes enfoques como el metabólico, genético y el genómico (Dunlap, 2019; Dunlap *et al.*, 2020). El grupo de *B. cereus* incluye a las especies *B. tropicus*, *B. paranthracis*, *B. pacificus*, *B. anthracis*, *B. mobilis*, *B. albus*, *B. luti*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. toyonensis*, *B. mycoides*, *B. paramycoides*, *B. nitrateduncens*, *B. proteolyticus*, *B. gaemokensis*, *B. pseudomycoides*, *B. bingmayongensis*, *B. cytotoxicus* y *B. manliponensis*. Varias de estas especies tienen fenotipos distintos pero su análisis mediante distintos enfoques ha permitido su clasificación en este grupo (Dunlap, 2019).

2.4.2 Actividad antifúngica de *Bacillus* frente a *Fusarium oxysporum*

Muchas especies del género *Bacillus* han demostrado ser efectivas contra un amplio rango de patógenos de plantas e incluso varias de sus cepas han sido utilizadas para el desarrollo de biopesticidas a nivel comercial. Este género posee ciertas características que lo hacen uno de los más importantes en el campo de los biopesticidas tales como su ubicuidad, crecimiento rápido, capacidad de colonización de la rizosfera, formación de esporas resistentes a condiciones adversas lo que da estabilidad a sus formulaciones comerciales; así como su actividad biocontroladora basada en mecanismos como: a) La antibiosis, al producir compuestos antimicrobianos como enzimas líticas, compuestos orgánicos volátiles y metabolitos secundarios solubles bioactivos, b) Inducción de la respuesta sistémica de la planta y c) Competencia con el patógeno por el espacio y nutrientes. De igual manera, posee mecanismos promotores del crecimiento vegetal que aumentan la biodisponibilidad de nutrientes y la resistencia de la planta frente a diferentes tipos de estrés favoreciendo así su salud (Lyngwi & Joshi, 2014; Shafi *et al.*, 2017).

La actividad antifúngica que poseen diversas especies de *Bacillus* es una de las características que más ha llamado la atención pues ha permitido el control de múltiples hongos patógenos de plantas, siendo uno de ellos *Fusarium oxysporum*. De manera general, dentro de los compuestos antifúngicos que *Bacillus* puede producir están metabolitos secundarios como los lipopéptidos cíclicos que son importantes biosurfactantes representados por tres principales familias que son las surfactinas, iturinas y fengicinas, las cuales son moléculas anfifílicas que poseen una estructura cíclica que constan de siete a diez residuos aminoácídicos unidos a un derivado de ácido graso. Estas moléculas son sintetizadas por péptido sintetasas no ribosomales durante la fase estacionaria de crecimiento y pueden tener muchas formas isoméricas, debido a la variedad que puede haber en la longitud de la cadena hidrocarbonada del ácido graso o la composición aminoacídica (Castañeda & Sánchez, 2016; Fira *et al.*, 2018; Jangir *et al.*, 2018). Las iturinas y fengicinas poseen una alta actividad contra hongos fitopatógenos. Las primeras tienen la capacidad de formar poros conductores en la membrana celular mientras que las fengicinas actúan integrándose a la membrana desestabilizándola y desintegrándola. En ambos casos esto conduce al vertido del contenido citoplásmico y la posterior muerte de la hifa o la inhibición de la germinación de las esporas. Las surfactinas por otra parte poseen actividad antifúngica débil, pero protegen a la planta de manera indirecta pues contribuyen a la motilidad y la formación del *biofilm* y por tanto a la colonización de los tejidos de la planta

hospedera donde compiten con el patógeno por el espacio y nutrientes (Fira *et al.*, 2018; Sarwar *et al.*, 2018). Estas familias de lipopéptidos pueden actuar sinérgicamente para inhibir el crecimiento fúngico, pero poseen cierta selectividad de acción que podría explicarse por la composición lipídica de la membrana fúngica, además de que su producción depende de factores como la especie de *Bacillus* que las produce; la especie del hongo patógeno con el que interactúan; la composición del medio y las condiciones ambientales de crecimiento (Andrić *et al.*, 2020). Por ejemplo, en el trabajo de Liu *et al.* (2020), *B. velezensis* HC6 mostró actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum* y otros hongos fitopatógenos en un ensayo de cultivo dual, además de que inhibió el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas en granos de maíz. También demostraron la presencia de lipopéptidos de la familia de las iturinas, fengicinas y surfactina en el sobrenadante del cultivo líquido de esta cepa. Las iturinas y fengicinas fueron las responsables de la actividad antifúngica mientras que las surfactinas mostraron fuerte actividad antibacteriana pero débil actividad antifúngica. Sin embargo, las surfactinas también se asociaron con la capacidad de esta bacteria para formar un *biofilm* en los granos de maíz que los protegieron de la contaminación fúngica. De esta manera los autores concluyeron que *B. velezensis* HC6 poseía potencial para ser aplicado en maíz (Liu *et al.*, 2020).

Algunas especies de *Bacillus* también tienen la capacidad de producir enzimas líticas para llevar a cabo el biocontrol de hongos fitopatógenos (Khan *et al.*, 2018). En el caso de *Fusarium oxysporum*, la pared celular de las hifas está compuesta por polímeros de N-acetilglucosamina (quitina) y de glucosa (α -1,3 glucanos y β -1,3 glucanos), además de glicoproteínas que contienen manosa, galactosa, glucosa y ácidos urónicos (Schoffemeer *et al.*, 1999). Estructuralmente, la quitina y los glucanos se anclan entre ellos para formar una capa que confiere resistencia a la pared frente a la presión hidrostática ejercida por el citoplasma y la membrana. A esta capa de polisacáridos se unen las glucoproteínas, las cuales determinan las propiedades antigénicas y adhesivas de la hifa además de que funcionan como elicitores de las respuestas de defensa de la planta (Gow *et al.*, 2017); por lo tanto, para el biocontrol de este hongo, *Bacillus* puede producir enzimas líticas que degradan a la quitina como las endoquitinasas, exoquitinasas y quitina desacetilasas, así como glucanasas y proteasas que degradan a los glucanos y proteínas de pared respectivamente. Aunque también puede producir otras enzimas líticas como las celulasas, pectinasas y xilanasas que degradan la pared celular vegetal para utilizarla como fuente de carbono o para generar una vía de entrada por la que ingresan y pueden vivir dentro de la planta como endófitos (Khan *et al.*, 2018). Ya se ha reportado que bacterias endófitas como algunas del género *Bacillus* tienen ciertas ventajas para el biocontrol de hongos causantes de marchitez vascular como *Fusarium oxysporum* pues poseen la capacidad de colonizar nichos similares a los de estos patógenos (Eljounaidi *et al.*, 2016). Este aspecto da cierta ventaja a nuestras cepas pues vivían como endófitas dentro de nódulos de mezquite, sitio de donde fueron aisladas previamente. En el trabajo de Khan *et al.* (2018), por ejemplo, tres diferentes cepas de *B. simplex* y una de *B. subtilis* produjeron enzimas con actividad quitinasa, celulasa, proteasa, pectinasa y xilanasas cuando se les enfrentó con los hongos

Fusarium oxysporum f. sp. *conglutinans*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *matthioli* y *Fusarium solani*; todo esto comparado con el hongo de la placa control.

Otros de los compuestos producidos por *Bacillus* son los denominados compuestos orgánicos volátiles (VOC's en inglés) que pueden tener la función de promover el crecimiento vegetal, inducir la respuesta sistémica de la planta o inhibir el crecimiento de hongos fitopatógeno. Dentro de los VOC's con actividad antifúngica están el dimetilsulfoxido, 1-butanol, acetoína, 2-tridecanona, pirazina, fenol, benzotiazol, acetilbutanediol, 2-heptanona, 6-metil-2-heptanona, 5-metil-2-heptanona, entre otros (Lee *et al.*, 2017; Lim *et al.*, 2017). En el trabajo de Islam *et al.* (2012), por ejemplo, a partir del cultivo de *Bacillus subtilis* C9 se extrajo y purificó a un VOC estereoisómero del acetilbutanediol, el cual inhibió el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* y otros hongos fitopatógenos. Tal efecto puede estar asociado a una inhibición en la germinación de la espora o en la síntesis de los componentes de pared celular, lo que lleva a una alteración en la permeabilidad de la membrana.

En el mecanismo de la inducción de la respuesta sistémica de la planta, especies de *Bacillus* poseen la capacidad de proteger a los tejidos aéreos del ataque de patógenos. Esto lo hace al producir ciertos compuestos denominados elicitors que inducen a genes de defensa de la planta. Dentro de estos elicitors se encuentran diferentes metabolitos secundarios como los lipopéptidos, compuestos orgánicos volátiles, hormonas, entre otros, los cuales pueden actuar sinérgicamente (Wu *et al.*, 2018). Con respecto al mecanismo de competencia con el patógeno por el espacio y nutrientes, especies de *Bacillus* poseen la capacidad de producir sideróforos como la bacilibactina en respuesta a una limitación de Fe^{3+} en el ambiente (Andrić *et al.*, 2020). Estos sideróforos son compuestos de bajo peso molecular que cumplen la función de quelar al Fe^{3+} para privar de este elemento esencial al patógeno (Yu *et al.*, 2017). Por ejemplo, en el trabajo de Li *et al.* (2014) se reporta que *Bacillus velezensis* SQR9 sobre produjo al sideróforo bacilibactina cuando creció en presencia de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y otros hongos fitopatógenos para entrar en competencia con ellos por el hierro del medio.

Los mecanismos de biocontrol de los microorganismos son descritos a través de ensayos bioquímicos, fisiológicos e *in silico*, lo cual permite comparar resultados y lleva a una elección más racional de los probables agentes de biocontrol para la inhibición de enfermedades por hongos fitopatógenos (Khan *et al.*, 2018). Con respecto a *Bacillus*, actualmente se encuentran en el mercado global productos de biocontrol hechos a base de especies como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. velezensis*. Sin embargo, es necesario continuar con la investigación de nuevas cepas que posean múltiples mecanismos para llevar a cabo el biocontrol y la promoción del crecimiento vegetal para con ellas desarrollar nuevos productos comerciales para la agricultura con los cuales hacer frente a la demanda creciente de alimentos considerando el cuidado del ambiente y la salud de los humanos y animales (Fira *et al.*, 2018).

2.5 *Prosopis laevigata* en México

El género *Prosopis* conocido comúnmente como mezquite comprende un grupo de árboles pertenecientes a la familia *Fabaceae* (leguminosas) distribuido principalmente en regiones áridas y semiáridas de Asia, África, Australia y América (Shackleton *et al.*, 2014). En México destacan especies de este género tales como *Prosopis articulata*, *P. glandulosa*, *P. juliflora*, *P. laevigata*, *P. mayana*, *P. mezcalana*, *P. odorata*, *P. tamaulipana*, *P. velutina*, *P. vidualiana* y *P. yaquiiana* (R. A. Palacios, 2006). La especie *Prosopis laevigata* es la de mayor distribución geográfica en el territorio mexicano al estar presente en zonas áridas y semiáridas del norte y centro del país que incluyen a estados como Coahuila, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz (Palacios *et al.*, 2017).

El árbol de *P. laevigata* puede alcanzar una altura y diámetro de 12 m y 1 m, respectivamente. Sus raíces pueden llegar a tener más de 50 metros de profundidad y hasta 15 metros en sus laterales las cuales participan en la conservación del agua y suelo. Posee una corteza gruesa, oscura y fisurada; una copa más ancha que alta y hojas compuestas. Sus ramas están provistas de espinas de 1 a 4 cm de largo, así como de flores blanco-amarillentas en racimos de 5 a 10 cm de longitud. Su fruto es una vaina de color café amarillento o rojizo de 10 a 30 cm de largo que puede ser plana o cilíndrica en la madurez, algo constreñida entre las semillas y éstas últimas pueden ir de 12 a 20, son oblongas de 8 a 10 mm de largo y de color blanco-amarillento (Rodríguez *et al.*, 2014).

En México, el mezquite (*P. laevigata*) ha tenido múltiples usos desde épocas remotas. Sus vainas han sido usadas como fuente de alimento para el hombre y como forraje. Sus flores generan polen y néctar para la producción de miel y cera. Su madera ha sido empleada como leña, carbón y material para la construcción de casas, mobiliario, objetos decorativos y artesanías. A partir de la resina que produce se han obtenido pegamentos y barnices. De igual manera, produce una goma a la que se le ha dado un uso medicinal y actualmente uno industrial (Rodríguez *et al.*, 2014).

Dentro del ecosistema *P. laevigata* también juega un papel importante al servir como fuente de alimento y refugio de la fauna silvestre; previene los procesos de erosión del suelo, incrementa la diversidad vegetal, la fertilidad del suelo (al fijar nitrógeno) y la humedad, mientras que disminuye la radiación solar y la temperatura bajo su copa (Bernal-Ramírez *et al.*, 2019; Vásquez-Méndez *et al.*, 2010). Debido a que crece en regiones áridas y semiáridas donde hay deficiencia de agua, oscilaciones térmicas diurnas elevadas y generalmente, presencia de suelos salinos, este árbol es capaz de tolerar la sequía, altas concentraciones de sal, así como las altas temperaturas (Rodríguez *et al.*, 2014). También se ha demostrado que el mezquite puede tolerar, translocar e hiperacumular metales pesados como el níquel (II), plomo (II), hierro, aluminio, zinc y titanio; además de que puede asociarse a bacterias como algunas especies del género *Bacillus* que lo asisten en el proceso de fitorremediación de metales como el cromo, lo que los hace candidatos prometedores para la fitorremediación de metales pesados en regiones áridas y semiáridas (Buendía-Gonzalez *et al.*, 2010; Ramírez *et al.*, 2019).

3. ANTECEDENTES

Como parte de un trabajo de investigación desarrollado en el laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas perteneciente al Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, se analizó el potencial del mezquite (*Prosopis laevigata*) en procesos de fitorremediación de suelos contaminados con metales, así como el papel que juegan las bacterias que están asociadas a sus raíces (Ramírez *et al.*, 2019). Para esto, se colectaron muestras de suelos, así como de tejidos de raíces, nódulos, vainas, hojas y tallos de diferentes mezquites que habitaban la región del río Nexapa, en Chietla, Puebla donde Pérez *et al.*, (2018) ya habían reportado que el suelo poseía un elevado índice de contaminación. Las muestras fueron estudiadas mediante un análisis de difracción de rayos X de onda dispersa (WDRX) para conocer su contenido de metales. El análisis mostró que estos suelos se encuentran contaminados con metales tales como el aluminio, titanio, cromo y zirconio, y que las plantas de mezquite que se desarrollan en esta región son capaces de acumular hasta 4,100 mg de aluminio por kilogramo de tejido, 12,000 mg/Kg de Fe, 1,600 mg/Kg de Ti, 2,500 mg/Kg de Zn; pero no se encontró la presencia de cromo en las plantas, a pesar del elevado contenido de este metal en los suelos de la zona (425 mg/Kg) (Ramírez *et al.*, 2019).

El grupo de investigación aisló a un grupo de bacterias del interior de los nódulos de mezquite, las cuales, mediante el análisis filogenético de los genes ribosomales *16s rDNA*, fueron identificadas como pertenecientes al género *Bacillus*. Bacterias pertenecientes a este género ya han sido aisladas de la rizosfera y del interior de diferentes especies de *Prosopis*; demostrando tolerancia a metales pesados, así como la capacidad para transformarlos y absorberlos (Khan *et al.*, 2015). Las cepas aisladas por el grupo de investigación fueron tolerantes a la presencia de elevadas concentraciones de metales pesados. Sin embargo, los posteriores estudios de tolerancia se enfocaron en el cromo (Ramírez *et al.*, 2019) debido a que ya se ha reportado la elevada toxicidad que presenta este metal es su estado de oxidación Cr (VI) (Tchounwou *et al.*, 2012). Como resultado de los análisis se tuvo que todas las cepas fueron capaces de tolerar niveles de cromo (VI) de hasta 10,000 ppm. Una de ellas, la cepa *Bacillus* sp. MH778713, mostró incluso una hipertolerancia al cromo, al tolerar hasta 15,000 mg/kg de Cr (VI). Un análisis de bioadsorción mostró que esta cepa es capaz de adsorber hasta 100 mg de Cr (VI) por gramo de células (Ramírez *et al.*, 2019).

La inoculación de la cepa *Bacillus* sp. MH778713 en semillas de mezquite sometidas a la presencia de diferentes concentraciones de Cr (VI) mostró una estimulación de la germinación de las semillas aun en presencia de cantidades tóxicas de cromo. Las plantas de *Prosopis laevigata* fueron capaces de sobrevivir en presencia de estas elevadas concentraciones de cromo al ser inoculadas con la cepa MH778713, lo que demuestra el potencial de esta cepa para asistir a la tolerancia de estas plantas al estrés por cromo (Ramírez *et al.*, 2019). Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* también han sido descritas por su capacidad para estimular el crecimiento de las plantas mediante la participación de Compuestos Orgánicos Volátiles (VOC's) producidos por las bacterias (Wu *et al.*, 2014). Debido a esto, el grupo de investigación también estudió la capacidad que

poseen los compuestos orgánicos volátiles producidos por *Bacillus* sp. MH778713 para inducir la germinación de semillas de *Prosopis laevigata* y *Arabidopsis thaliana* aún en presencia de altas concentraciones de Cr (VI) en el medio. Como resultado obtuvieron que estos compuestos ayudan a dichas semillas a tolerar el estrés causado por el Cr (VI) además de que estimulan su germinación y desarrollo (Ramírez *et al.*, 2020). Los estudios antes mencionados indican que tanto la cepa *Bacillus* sp. MH778713 como las otras aisladas del mezquite podrían ser buenas candidatas para la restauración de suelos áridos, o semiáridos contaminados con metales pesados además de poseer la capacidad de conferir tolerancia a las plantas frente al estrés causado por estos metales. En otro estudio también realizado en el laboratorio se encontró que las seis cepas más tolerantes al Cr (VI) cuentan con mecanismos promotores del crecimiento vegetal tales como la producción de ácido indol acético (AIA), solubilización de fosfato y la fijación de nitrógeno (Datos no publicados). Dado todo lo anterior estas cepas también podrían contar con otras propiedades como la de actuar como agentes de biocontrol. Diferentes especies de *Bacillus* tales como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. velezensis* ya han demostrado ser efectivas contra un amplio rango de patógenos de plantas e incluso varias de sus cepas han sido utilizadas para el desarrollo de biopesticidas a nivel comercial (Shafi *et al.*, 2017).

Dado que es necesario continuar con la caracterización de nuevas cepas que posean múltiples mecanismos para llevar a cabo el biocontrol de hongos fitopatógenos de importancia agrícola (Fira *et al.*, 2018), en este trabajo evaluamos la actividad antifúngica de *Bacillus* sp. MH778713 y las otras cinco cepas de *Bacillus* sp. que mostraron mayor tolerancia al cromo. Esta actividad fue probada frente a una cepa patógena de *Fusarium oxysporum* causante de marchitez vascular, aislada de plantas de jitomate en invernaderos de Tetela de Ocampo, Puebla. Esta cepa fúngica es originaria del cepario del Laboratorio 204 de Patología vegetal y hongos comestibles del Ecocampus Valsequillo-BUAP. Se eligió a este hongo debido a que la enfermedad que causa impacta severamente el rendimiento y la calidad del producto (Isaac *et al.*, 2018), además de que este cultivo es uno de los más importantes en México pues nuestro país se encuentra entre los principales productores y exportadores de jitomate a nivel mundial (FAOSTAT, 2021). De igual manera, el hecho de que ya se haya demostrado previamente que las cepas de *Bacillus* empleadas en este trabajo podrían ser buenas candidatas para la restauración de suelos contaminados con metales pesados, estas podrían contribuir a la protección de la planta de jitomate frente a estos metales de los que ya se ha reportado que afectan su desarrollo (Quinet *et al.*, 2019).

4. JUSTIFICACIÓN

El ataque de hongos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* a cultivos agrícolas como el de jitomate representa una amenaza importante para la seguridad alimentaria debido a que pueden afectar la producción, disponibilidad, acceso, suministro, calidad, inocuidad y valor nutricional de los productos agrícolas, además de que pueden generar grandes pérdidas económicas. Dado el impacto que poseen, es importante llevar a cabo su control considerando el cuidado del ambiente, la inocuidad de los productos y la salud de los humanos y animales. El biocontrol representa una alternativa para el control de estos patógenos permitiendo una disminución en el uso de fungicidas químicos y sus efectos colaterales. Diferentes especies del género *Bacillus* ya han demostrado ser agentes de biocontrol efectivos frente un amplio rango de patógenos de plantas e incluso varias cepas han sido utilizadas para el desarrollo de biopesticidas a nivel comercial. Sin embargo, es necesario continuar con la caracterización de nuevas cepas que posean múltiples mecanismos de biocontrol para con ellas desarrollar nuevos productos comerciales con los cuales hacer frente a la creciente demanda alimentaria buscando reducir el impacto en el ambiente.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general: Evaluar la actividad antifúngica de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de mezquite, como agentes de biocontrol contra *Fusarium oxysporum*.

5.2 Objetivos específicos:

1. Evaluar *in vitro* el efecto antifúngico de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de nódulos de mezquite contra *Fusarium oxysporum* por medio de un ensayo de cultivo dual.
2. Evaluar *in vitro* el efecto antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas de *Bacillus* sp. contra *Fusarium oxysporum*.
3. Analizar la diversidad de las enzimas líticas de *Bacillus* con actividad antagonista contra hongos fitopatógenos por medio de un análisis *in silico*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

Se utilizó una colección de cepas bacterianas de la colección del laboratorio de Ecología Molecular Microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, las cuales provienen del interior de nódulos de *Prosopis laevigata* que habitaba una región semiárida contaminada con metales pesados perteneciente a Chietla, Puebla, México. Tales cepas fueron identificadas como integrantes del género *Bacillus* (Ramírez *et al.*, 2019) (Tabla 1).

El hongo fitopatógeno empleado es una cepa de *Fusarium oxysporum* CENAGRO01, la cual proviene de la colección de cultivos fúngicos del Centro de Agroecología (CENAGRO) de la BUAP, donado en fresco por el Dr. Omar Romero Arenas. Hongo aislado con anterioridad de raíz de planta de jitomate en invernaderos de Tetela de Ocampo, Puebla.

Tabla 1. Bacterias y hongos utilizados en el trabajo de investigación	
Cepa	Especie
MH778813 (LEM1088)	<i>Bacillus cereus</i>
LEM1083	<i>Bacillus subtilis</i>
LEM1085	<i>Bacillus inaquosus</i>
LEM1080	<i>Bacillus inaquosus</i>
LEM1054	<i>Bacillus velezensis</i>
LEM1004	<i>Bacillus</i> sp.
CENAGRO01	<i>Fusarium oxysporum</i>

6.2 Evaluación *in vitro* del efecto antifúngico de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de nódulos de mezquite contra *Fusarium oxysporum* por medio de ensayos de cultivo dual.

Un disco de micelio de 6 milímetros de diámetro de *Fusarium oxysporum* se sembró en el centro de una placa de agar papa dextrosa (PDA), se incubó por 7 días a 28 °C para su crecimiento y pasado este tiempo se cortaron discos de micelio de 6 mm de diámetro. Por otra parte, las cepas bacterianas se sembraron por estría cruzada en placas de agar extracto de levadura-manitol (YMA) y se incubaron a 28 °C por 1 día para lograr el aislamiento de colonias. Para el montaje del cultivo dual se utilizaron placas de PDA. Se tomó una colonia bacteriana previamente crecida en YMA y se colocó en línea recta a 1 cm de la orilla de la placa de PDA. Posteriormente, a 4 cm de esta línea se colocó un disco de micelio del hongo.

Para cada ensayo de antagonismo se realizaron 4 réplicas. Como control negativo se utilizó una placa de PDA similar a la de antagonismo, pero en ésta solo se colocó al disco de micelio. Todas las placas se incubaron a 28 °C por 7 días. Transcurrido este tiempo, se tomaron fotografías de las placas para el posterior análisis de las imágenes con el software ImageJ (Hartig, 2013) con el que se midió el radio de crecimiento fúngico a diferentes ángulos (0°, 5°, 10°, 15°, -5°, -10° y -15°) con respecto a la perpendicular en ángulo recto formada entre el centro del disco de micelio y la línea recta de crecimiento bacteriano. Se obtuvo el promedio de los radios de cada réplica. Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición de cada réplica con la siguiente fórmula:

$$\%I = [(RC - RA) / (RC)] \times 100$$

Donde:

RA=Radio promedio del crecimiento fúngico de la placa de antagonismo

RC=Radio promedio del crecimiento fúngico del control

%I= Porcentaje de inhibición

Se obtuvo el porcentaje de inhibición entre réplicas y se calculó la desviación estándar. De igual manera los datos experimentales fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA de un factor) y al test de LSD (Least significant difference) de Fisher en Excel para analizar la significancia de los efectos.

6.3 Evaluación *in vitro* del efecto antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas de *Bacillus* sp. contra *Fusarium oxysporum*.

Las cepas fueron sembradas por estría cruzada en placas de YMA y se incubaron a 28 °C por 24 horas. Una colonia bacteriana se sembró en 10 ml de caldo YM (manitol extracto de levadura) y se incubó durante 24 horas, en condiciones de agitación a 150 rpm y una temperatura de 28 °C. Posteriormente, estas suspensiones se ajustaron a una densidad óptica entre 0.45 y 0.5 a una longitud de onda de 600 nm con caldo YM. Por otra parte, un disco de micelio de 6 milímetros de diámetro de *Fusarium oxysporum* se sembró en el centro de una placa de PDA, se incubó por 7 días a 28 °C para su crecimiento y pasado este tiempo se cortaron discos de micelio de 6 mm de diámetro. Para el montaje del ensayo, se utilizaron placas divididas donde una mitad tenía agar YMA y la otra mitad contenía PDA. En el medio YMA se pusieron 50 µl de la suspensión bacteriana estandarizada y se esparcieron con un asa de vidrio. Luego, en el centro del medio PDA se puso un disco de micelio del hongo de 6 mm de diámetro. Como control negativo se utilizó una placa similar a la de ensayo, pero únicamente con el disco de micelio del hongo en el centro del agar PDA. Todas las placas fueron selladas con papel parafilm inmediatamente después de terminar su montaje y se incubaron a 28 °C por 72 horas. Transcurrido este tiempo se tomaron fotografías de las placas para el análisis de las imágenes con el software ImageJ (Hartig, 2013) con el que se tomaron medidas del diámetro de crecimiento fúngico a diferentes ángulos (0°, 45°, 90° y 135°) con respecto a la perpendicular en ángulo recto formada entre el centro del disco de micelio y la línea que divide la placa en dos. Se obtuvo el promedio de los diámetros por réplica. Posteriormente se calculó el porcentaje de inhibición por réplica con la siguiente fórmula:

$$\%I = [(DC - DA) / (DC)] \times 100$$

Donde:

DA=Diámetro promedio del crecimiento fúngico en placas de antagonismo

RC=Diámetro promedio del crecimiento fúngico en placas control

%I= Porcentaje de inhibición

Se obtuvo el porcentaje de inhibición entre réplicas y se calculó la desviación estándar. De igual manera los datos experimentales fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA de un factor) y al test de LSD (Least significant difference) de Fisher en Excel para analizar la significancia de los efectos.

6.4 Análisis *in silico* de la diversidad de las enzimas líticas de *Bacillus* sp. con actividad antagonista contra hongos fitopatógenos.

En la base de datos de GenBank del NIH (National Institutes of Health) disponible en el NCBI (National Center for Biotechnology Information; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), se realizó la búsqueda de secuencias aminoacídicas de enzimas hidrolíticas producidas por especies de *Bacillus* sp. ya reportadas previamente en la bibliografía con actividad antifúngica contra fitopatógenos. Se llevó a cabo el alineamiento múltiple de las secuencias de cada enzima con el programa Clustal X y su edición con el programa BioEdit. Posteriormente, se generaron los respectivos árboles por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA X (Kumar *et al.*, 2018). La confianza de los nodos fue probada con 2000 réplicas de Bootstrap.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Evaluación *in vitro* del efecto antifúngico de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de nódulos de mezquite contra *Fusarium oxysporum* por medio de ensayos de cultivo dual

El objetivo de esta prueba fue determinar y comparar los porcentajes de inhibición generados por las cepas de *Bacillus* sp. frente al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*. Los resultados de los ensayos de cultivo dual se encuentran en la figura 1 y tabla 2.

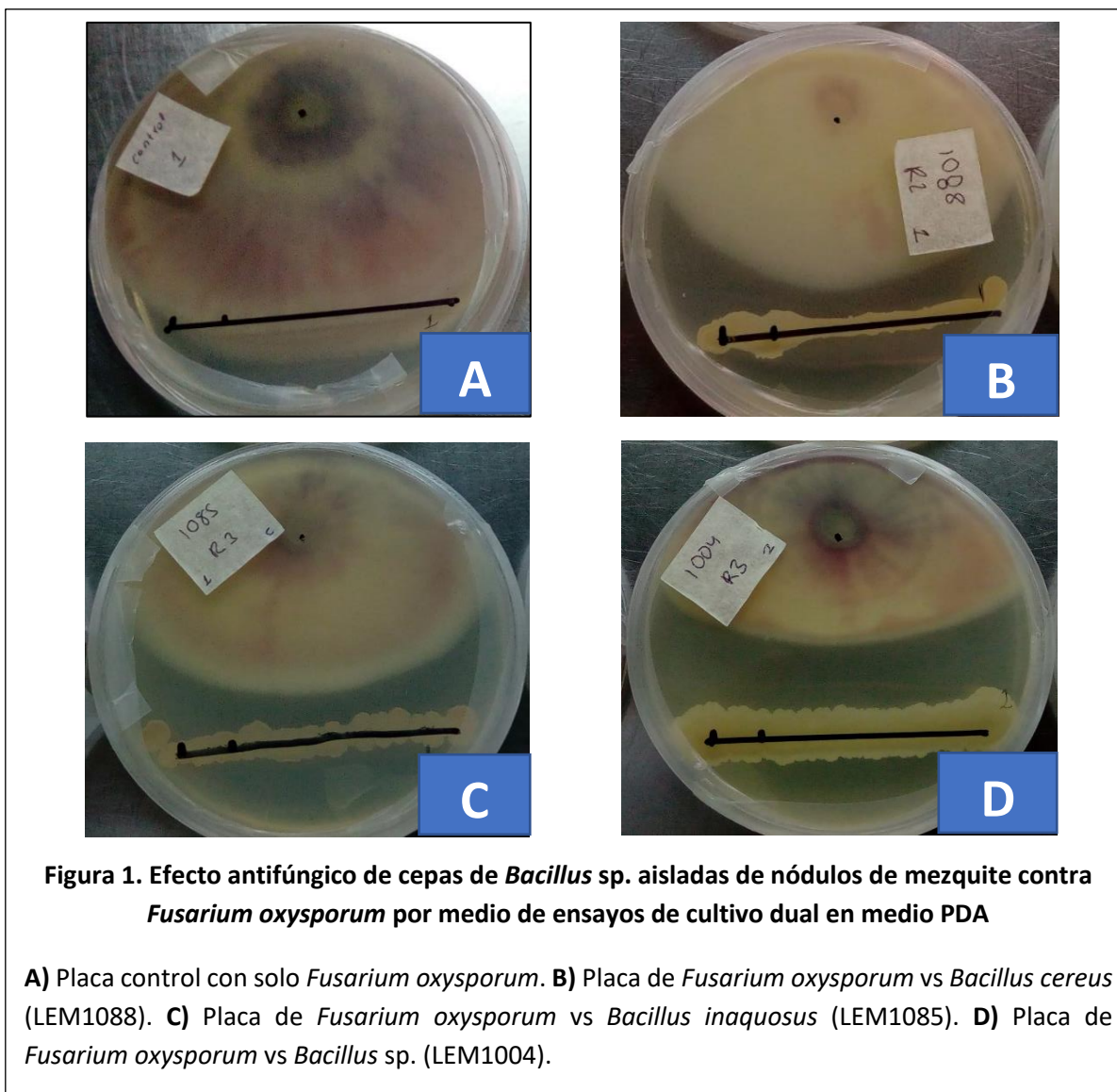


Tabla 2. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* por cepas de *Bacillus* sp. en ensayo de cultivo dual en PDA tras 7 días de incubación a 28 °C

Cepa	Especie	Porcentaje de inhibición (%)
MH778813 (LEM1088)	<i>Bacillus cereus</i>	24.77 ± 2.10
LEM1085	<i>Bacillus inaquosus</i>	30.30 ± 3.76
LEM1004	<i>Bacillus</i> sp.	43.73 ± 2.42

Como se puede observar en la tabla 2, se obtuvo un efecto antifúngico de las cepas *Bacillus* sp. LEM1004, *Bacillus inaquosus* LEM1085 y *Bacillus cereus* MH778713 contra *Fusarium oxysporum*. El análisis estadístico con ANOVA de un factor y el test de LSD de Fisher arrojó que estas tres cepas bacterianas inhibieron significativamente al crecimiento fúngico, aunque con diferentes porcentajes de inhibición.

El efecto inhibitorio generado por nuestras cepas pudo ser resultado de la acción en conjunto de las enzimas líticas, lipopéptidos antifúngicos, siferóforos y compuestos orgánicos volátiles producidos como ya se ha reportado en diferentes trabajos. Por ejemplo, en el trabajo de Khan *et al.* (2018), *Bacillus subtilis* 30VD-1 generó un 70 % de inhibición en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en cultivo dual además de que provocó el adelgazamiento del micelio, distorsiones en las hifas, la formación de estructuras bulbosas y el vertido del contenido citoplásmico de las hifas. Al analizar su capacidad para producir enzimas hidrolíticas se demostró que la cepa era capaz de producir proteasas y quitinasas de las que ya se ha reportado que poseen un efecto degradador en la pared celular de este hongo puesto que está compuesta de quitina, α -1,3-glucanos, β -1,3-glucanos, proteínas y glicoproteínas. De igual manera en el trabajo de Ramyabharathi & Raguchander, (2014), la cepa *B. subtilis* EPCO16 generó un 46.04 % de inhibición frente a *Fusarium oxysporum* en cultivo dual y ésta demostró actividad quitinasa, glucanasa y proteolítica.

Con respecto a los lipopéptidos antifúngicos, en el trabajo de Liu *et al.* (2020), *B. velezensis* H6 inhibió el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en un 45.1 % en el ensayo de cultivo dual. Al realizar el análisis del sobrenadante del cultivo de esta cepa bacteriana se identificaron a lipopéptidos de la familia de las iturinas, fengicinas y surfactinas, y al estudiar el efecto de estos por separado se encontró que cada uno poseía actividad inhibitoria frente a *Fusarium oxysporum* siendo mayor el efecto de las iturinas y fengicinas que el de las surfactinas. Aunque es preciso mencionar que ya se ha reportado que la producción de estos lipopéptidos varía dependiendo de factores como la especie de *Bacillus* que las produce; la especie del hongo patógeno con el que interactúan, así como la composición del medio y las condiciones ambientales de crecimiento (Andrić *et al.*, 2020).

La producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) por las cepas bacterianas también podría contribuir al efecto antifúngico y a la disminución en la pigmentación del micelio del hongo en las placas de antagonismo de nuestro trabajo de investigación comparadas con la placa control como se observa en la figura 1. Por ejemplo, en el trabajo de Liu *et al.* (2008), los VOC's de la cepa *B. subtilis* BL02, *B. pumilus* BSH-4 y *B. pumilus* ZB13 inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum* entre un 30 y 60 % además de que provocaron deformidades en las hifas y una disminución en la producción de pigmentos del micelio comparados con la placa control. Por otra parte, la producción de sideróforos también podría estar participando en el efecto antifúngico pues con ellos *Bacillus* puede entrar en competencia con el hongo por el hierro del medio como sucede en el trabajo de Li *et al.* (2014) donde *Bacillus velezensis* SQR9 sobre produjo al sideróforo bacilibactina cuando creció en un cultivo dual en medio PDA modificado (con 5 g menos de glucosa) en presencia de *Fusarium oxysporum*.

Los valores de porcentaje de inhibición frente a *Fusarium oxysporum* obtenidos en este trabajo fueron 43.73 ± 2.42 % para *Bacillus* sp. LEM1004, 30.30 ± 3.76 % para *Bacillus inaquosus* LEM1085 y 24.77 ± 2.10 % para *Bacillus cereus* MH778713. La cepa *Bacillus* sp. LEM1004 fue la cepa que generó el mayor efecto antifúngico de las tres. De la especie *Bacillus inaquosus* aún no se ha reportado actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum* en la literatura, pero en este trabajo si se observó un efecto inhibitorio del 31.07 %. Con respecto a la especie *B. cereus*, ya se ha reportado previamente su actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum* en la literatura (Aydi Ben Abdallah *et al.*, 2016; Ramírez *et al.*, 2021).

En trabajos donde se han realizado cultivos duales de cepas de *Bacillus* y *Fusarium oxysporum* causante de marchitez vascular en la planta de jitomate se han obtenido porcentajes de inhibición variados tales como 46.04 % para *B. subtilis* EPCO16 (Ramyabharathi & Raguchander, 2014), 48.3 % para *B. amyloliquefaciens* FZB24 (Elanchezhyan *et al.*, 2018), 52.22 %, 61. 11 % y 64. 44 % para las cepas de *B. subtilis* KR1-2, KR2-7 y A2-9, respectivamente (Kamali *et al.*, 2019), 68.5 % para *Bacillus cereus* S42 (Aydi Ben Abdallah *et al.*, 2016), 79.19 % para *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 (Shahzad *et al.*, 2017) y 87.5 % para *Bacillus* sp. B44 (Jangir *et al.*, 2018). En algunos de estos casos mencionados las cepas fueron capaces de proteger a la planta de jitomate del ataque del hongo en condiciones de invernadero y de campo. Por ejemplo, en el trabajo de Elanchezhyan *et al.* (2018), la cepa *B. amyloliquefaciens* FZB24 generó un 48.3 % de inhibición en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* de manera *in vitro* y al aplicarla a plantas de jitomate inoculadas con el hongo en condiciones de invernadero y de campo generó una disminución en la incidencia de la enfermedad, un aumento en el crecimiento de la planta y un mayor rendimiento de fruto por planta, todo ello comparado con plantas inoculadas solo con el hongo patógeno.

Aunque nuestras cepas generaron un porcentaje de inhibición menor a los citados anteriormente se propone realizar pruebas extra como la observación microscópica del micelio para observar si existen alteraciones morfológicas en la placa de antagonismo comparando con la placa control. De igual manera, es necesario analizar la capacidad de

estas cepas para producir enzimas hidrolíticas, lipopéptidos y sideróforos para elegir a las mejores cepas, caracterizar sus mecanismos y posteriormente con ellas realizar ensayos *in vivo* en los que se busque que *Bacillus* defienda a la planta de jitomate del ataque del hongo *Fusarium oxysporum* tanto en condiciones de invernadero como de campo. Finalmente, de las cepas *Bacillus subtilis* LEM1083, *Bacillus inaquosus* LEM1080 y *Bacillus velezensis* LEM1054 no se logró determinar su efecto antifúngico debido a su rápido crecimiento, por lo que se propone realizar diluciones seriadas o dar ventaja de crecimiento al hongo para llevar a cabo el ensayo.

7.2 Evaluación *in vitro* del efecto antifúngico de los compuestos orgánicos volátiles (VOC's) producidos por las cepas de *Bacillus* sp. contra *Fusarium oxysporum*.

En el ensayo de cultivo dual se encontró que los VOC's de las cepas de *Bacillus* podrían ser responsables en parte del efecto antifúngico ejercido frente a *Fusarium oxysporum* y también ser causantes de la disminución en la pigmentación del micelio del hongo, por lo que se decidió evaluar el efecto de los VOC's de *Bacillus* en el hongo por medio de cultivos en placas divididas. Los resultados obtenidos de estos ensayos se observan en la tabla 3 y la figura 2.

Tabla 3. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* por los compuestos volátiles de cepas de *Bacillus* sp. en cultivos de placas divididas

Cepa	Especie	Porcentaje de inhibición (%)
MH778813 (LEM1088)	<i>Bacillus cereus</i>	5.58 ± 1.15
LEM1083	<i>Bacillus subtilis</i>	5.85 ± 0.76
LEM1085	<i>Bacillus inaquosus</i>	5.60 ± 0.72
LEM1080	<i>Bacillus inaquosus</i>	9.39 ± 0.48
LEM1054	<i>Bacillus velezensis</i>	4.89 ± 0.42
LEM1004	<i>Bacillus</i> sp.	8.20 ± 1.21

En la figura 2 no es tan marcada la disminución en la pigmentación del micelio en las placas de antagonismo comparadas con la placa control, tal como sucedió en el ensayo de cultivo dual. Esto posiblemente debido a la diferencia en el tiempo de incubación, al ser de 7 días para el cultivo dual y de 3 días para el de VOC's, por lo que se propone tomar fotografías de las placas a los 7 días de incubación en ambos ensayos para observar si hay diferencias más marcadas. Debido a que en este ensayo la división de la placa impide el contacto directo entre el hongo y la bacteria, la disminución en la producción de pigmentos en el hongo podría explicarse por efecto de los VOC's como se ha descrito en trabajos previos como el de Ramírez *et al.* (2021) o el de Chaves-Lopez *et al.* (2015) donde al someter a *F. oxysporum* a la actividad de los VOC's de la cepa *B. amyloliquefaciens* M49 por medio de su cultivo en

placas divididas se obtuvo un 48.3 % de inhibición en el crecimiento fúngico y una disminución en la pigmentación rosa del micelio, todo ello comparado con el control donde sólo se hizo crecer al hongo. Ahora bien, dado que ya se ha reportado que los pigmentos fúngicos podrían contribuir a la patogenicidad del hongo, una disminución en su producción también podría disminuir la capacidad del hongo para infectar a la planta y esto podría favorecer su biocontrol por parte de *Bacillus* (Liu *et al.*, 2008).

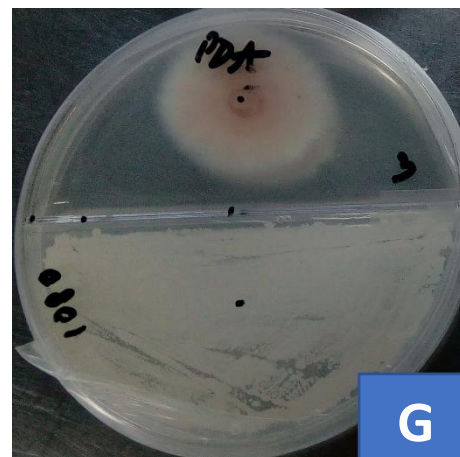
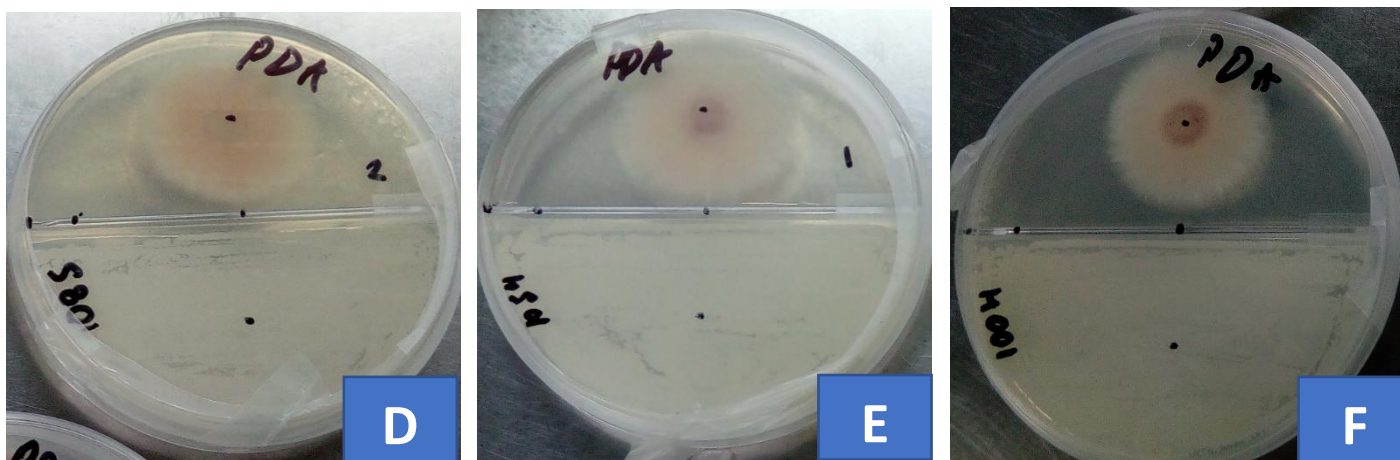
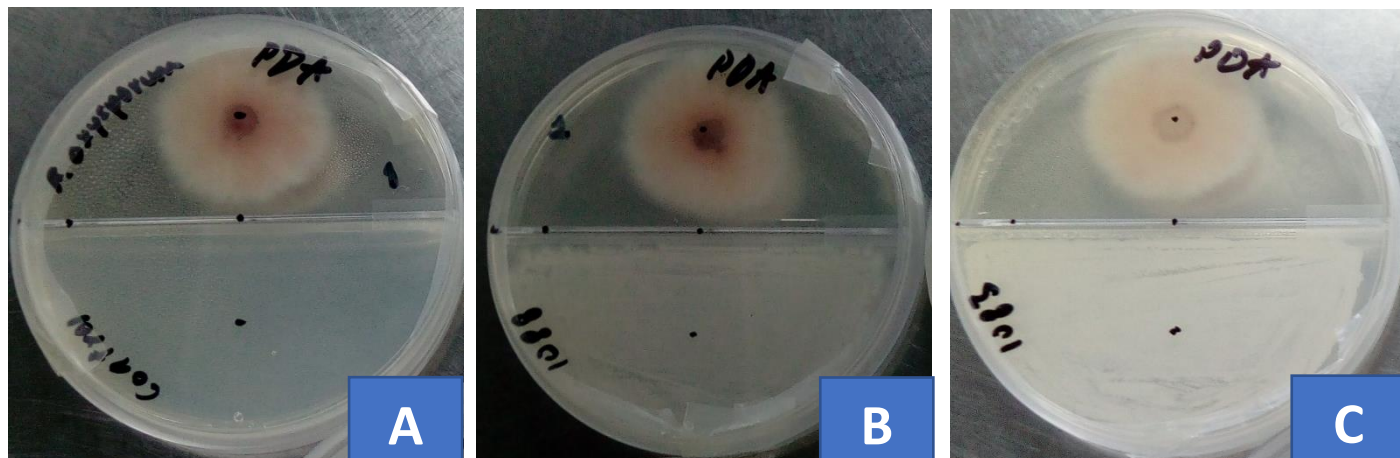


Figura 2. Ensayo de actividad antifúngica de los compuestos volátiles de las cepas de *Bacillus* sp. frente a *Fusarium oxysporum*

A) Placa control con solo *F. oxysporum*. B) *F. oxysporum* vs *Bacillus cereus* MH778713 (LEM1088). C) *F. oxysporum* vs *B. subtilis* LEM1083. D) *F. oxysporum* vs *B. inaquosus* LEM1085. E) *F. oxysporum* vs *B. velezensis* LEM1054. F) *F. oxysporum* vs *Bacillus* sp. LEM1004. G) *F. oxysporum* vs *B. inaquosus* LEM1080.

Con respecto a los porcentajes de inhibición, el análisis estadístico de los datos experimentales con ANOVA de un factor y el test de LSD de Fisher arrojó que los VOC's de estas seis cepas bacterianas no inhibieron significativamente al crecimiento fúngico. Los bajos porcentajes de inhibición observados por parte de los VOC's pudieron ser debido a diversos factores. Por ejemplo, en el trabajo de Chaves-Lopez *et al.* (2015), observaron que el patrón de producción de VOC's por *Bacillus* fue especie y cepa dependiente, mientras que la actividad antifúngica fue dependiente de la especie del hongo. De igual manera, observaron que la composición del medio de cultivo donde creció la cepa bacteriana también influyó en la producción de estos compuestos. La influencia de estos factores se puede notar en diferentes trabajos como el de Liu *et al.* (2008) donde los VOC's de *B. subtilis* y *B. pumilus* crecidos en agar LB inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en un 30 y 60 % respectivamente e inhibieron su producción de pigmentos. Por otra parte, en el trabajo de Baysal *et al.* (2013), los VOC's de *B. subtilis* EU07 crecido en agar TYB (triptona y extractos de levadura y carne) inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en un 26.2 % y por microscopía se observaron aberraciones morfológicas en el micelio. También en el trabajo de Lim *et al.* (2017), los VOC's de *Bacillus velezensis* G341 crecido en TSA generaron un 0 % de inhibición frente a *Fusarium oxysporum*, pero si fueron capaces de inhibir a otros hongos fitopatógenos.

La producción de VOC's por *Bacillus* varía entre especies y cepas, pudiendo incluir moléculas como alcanos, alquenos, alcoholes, ésteres, cetonas, aldehídos, ácidos, ácidos grasos, éteres, pirazinas y compuestos que contienen azufre cuya naturaleza química determina sus diferentes actividades fungicidas o fungistáticas (Liu *et al.*, 2008). Dentro de los VOC's que ya se han reportado con actividad antifúngica están el dimetilsulfoxido, 1-butanol, acetoína, 2-tridecanona, pirazina, fenol, benzotiazol, acetilbutanediol, 2-heptanona, 6-metil-2-heptanona, 5-metil-2-heptanona, entre otros (Lee *et al.*, 2017; Lim *et al.*, 2017). Los cuales pueden estar asociadas a una inhibición en la esporulación, en la germinación de las esporas o en la síntesis de los componentes de pared celular, lo que lleva a una alteración en la estructura fúngica (Islam *et al.*, 2012). Lo cual microscópicamente puede observarse como vacuolización, hinchazón, adelgazamiento o super enrollamiento de las hifas además de la retracción del protoplasma o una disminución en el número o tamaño de las esporas del hongo (Chaves-Lopez *et al.*, 2015). Por tanto, para complementar el estudio de nuestras cepas se propone realizar el análisis de sus VOC's producidos y su efecto a nivel morfológico por medio de la observación microscópica además de estudiar más a fondo el efecto de la disminución en la producción de los pigmentos del micelio como ya se había mencionado anteriormente.

7.3 Análisis *in silico* de la diversidad de las enzimas líticas de *Bacillus* sp. con actividad antagonista contra hongos fitopatógenos.

Debido a que en el ensayo de cultivo dual se obtuvieron efectos inhibitorios significativos frente a *Fusarium oxysporum*, de tres cepas de *Bacillus* (LEM1080, LEM1081 y LEM1088), y considerando que ya se ha reportado que la producción de enzimas líticas es uno de los principales mecanismos del efecto antifúngico, se decidió realizar un análisis filogenético basado en las secuencias aminoacídicas de enzimas líticas utilizadas por *Bacillus* para llevar

a cabo el biocontrol de fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*. Para cada análisis se introdujo un alineamiento de secuencias homólogas de una enzima lítica del género *Bacillus*. Estas secuencias se analizaron por el método de máxima parsimonia en el que a partir de todos los posibles árboles filogenéticos se obtiene un árbol cuya topología indica una hipótesis de relación evolutiva entre las especies, la cual requiere la menor cantidad de cambios evolutivos para explicar la distribución de los aminoácidos en las secuencias analizadas (Kapli *et al.*, 2020).

La pared celular fúngica es la capa más externa del hongo, la cual resulta esencial para su viabilidad, morfogénesis y patogénesis (Gow *et al.*, 2017). En *Fusarium oxysporum*, esta estructura está compuesta de quitina, α -1,3-glucanos, β -1,3-glucanos, proteínas y glicoproteínas (Schoffemeer *et al.*, 1999). Dada la importancia de la pared, la degradación de estos componentes por la actividad de enzimas líticas producidas por agentes de biocontrol representa un mecanismo por el que éstos efectúan su biocontrol (Shafi *et al.*, 2017). La especie de *Bacillus* tienen la capacidad de producir proteasas, glucanasas así como diferentes enzimas que degradan a la quitina de la pared celular fúngica (Chang *et al.*, 2009; Janahiraman *et al.*, 2016).

La quitina de la pared fúngica es un polímero insoluble de N-acetilglucosamina (NAG) con enlaces de tipo β -1,4. De manera general, el proceso de degradación de la quitina por la actividad enzimática de microorganismos puede desarrollarse por la vía quitinolítica o la de desacetilación. En *Bacillus* ya se han reportado ambas vías con las que puede degradar a la quitina y obtener de ella una fuente de carbono y nitrógeno. La vía quitinolítica involucra la hidrólisis de los enlaces β -1,4 por actividad de enzimas glucosidasas llamadas endoquitinasas y exoquitinasas. Las endoquitinasas cortan aleatoriamente en sitios internos dentro de la cadena generando oligómeros hidrosolubles de diferentes tamaños. Las exoquitinasas se han clasificado en quitobiosidasas y N-acetilhexosaminidasas. Las quitobiosidasas realizan el corte de dímeros de N-acetilglucosamina (quitobiosa) en el extremo no reductor de la cadena de quitina o de sus oligómeros. Por otra parte, las N-acetilhexosaminidasas degradan los oligómeros o dímeros resultantes de la hidrólisis de la quitina en sus monómeros de N-acetilglucosamina (NAG) (Beier & Bertilsson, 2013; Rathore & Gupta, 2015; Veliz *et al.*, 2017).

7.3.1 Análisis de las endoquitinasas

Las endoquitinasas (EC 3.2.1.14) catalizan la ruptura hidrolítica de los enlaces glucosídicos β -1,4 que unen a las unidades de N-acetilglucosamina que conforman a la quitina. Tal corte lo realizan de forma aleatoria en sitios internos dentro de la cadena generando oligómeros solubles de bajo peso molecular (Khan *et al.*, 2018; Rathore & Gupta, 2015). Según su secuencia aminoacídica, estructura tridimensional y su mecanismo, estas enzimas pertenecen a la familia 18 de las glucosidasas (Drewnowska *et al.*, 2020). En la figura 3 se puede observar el análisis filogenético obtenido a partir de secuencias aminoacídicas de endoquitinasas producidas por especies del grupo de *B. cereus*.

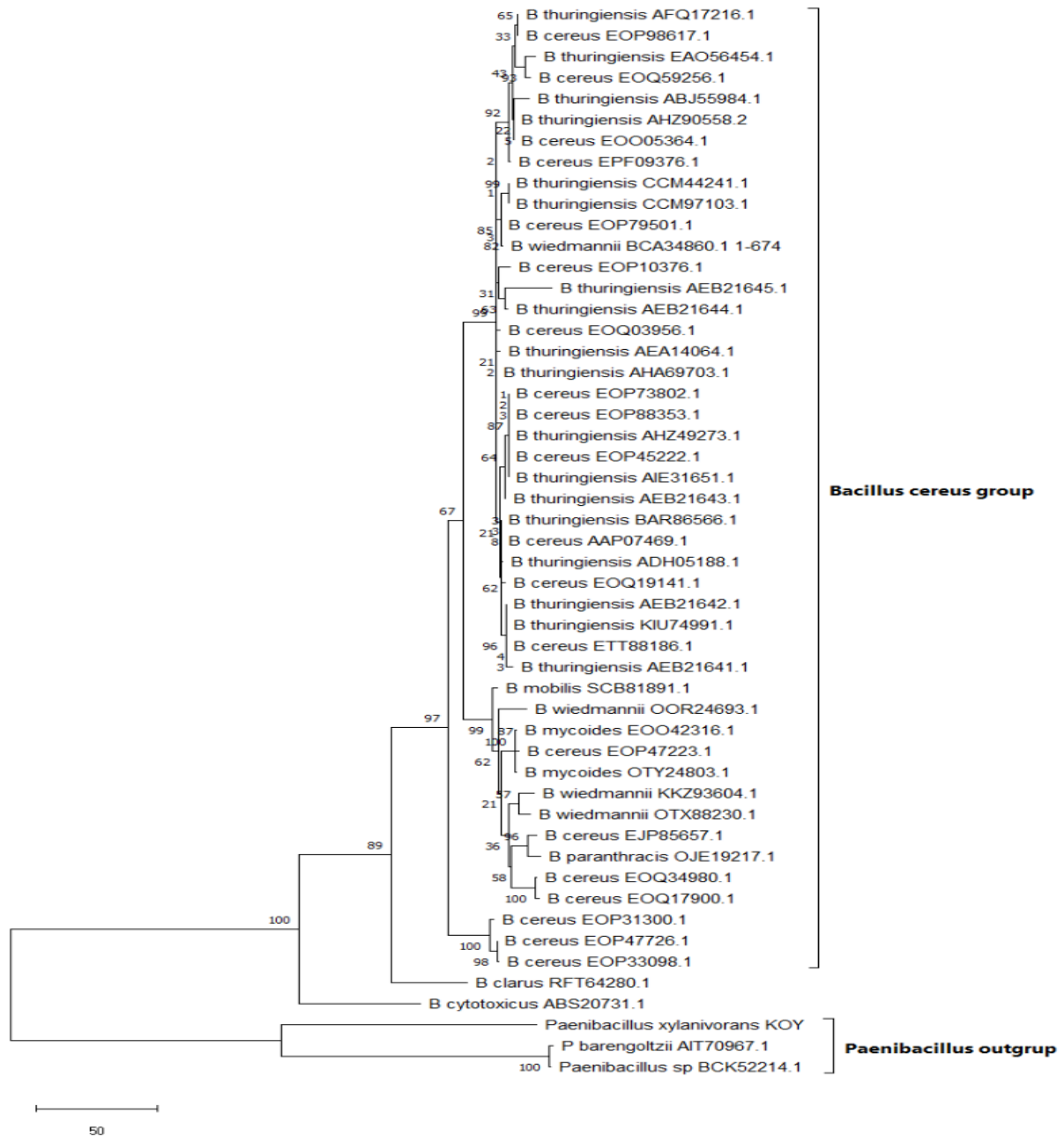


Figura 3. Análisis filogenético molecular basado en secuencias aminoacídicas de la enzima ENDOQUITINASA producida por diferentes especies pertenecientes al grupo de *B. cereus*. Construido por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA X con 2000 réplicas de Bootstrap.

En este árbol se utilizó como grupo externo al género *Paenibacillus* pues representa un taxón externo al formar parte del mismo filo, clase y orden taxonómico que *Bacillus* (Goodfellow *et al.*, 2009). En el grupo interno se observan diferentes especies del grupo de *Bacillus cereus* tales como *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. wiedmannii*, *B. mobilis*, *B. mycooides*, *B. paranthracis*, *B. clarus* y *B. cytotoxicus*. Estas secuencias tuvieron una longitud de

alrededor de 674 aminoácidos, que coincide con lo reportado para endoquitinasas producidas por el grupo de *B. cereus*, las cuales se caracterizan por poseer una estructura modular que se compone de un péptido señal, un dominio catalítico N-terminal, un dominio similar al de tipo III de la fibronectina y un dominio C-terminal de unión a carbohidratos (Barboza-Corona *et al.*, 2003; Drewnowska *et al.*, 2020; Mehmood *et al.*, 2010).

En la topología del grupo interno se observan dos ramas principales soportadas por un Bootstrap fuerte de 100. En la rama superior están todas las especies analizadas excepto *B. cytotoxicus* quien sería la especie más lejanamente relacionada, lo cual coincide con un árbol filogenético reportado por Dunlap (2019), que fue construido con el genoma core de cepas tipo de especies del grupo de *B. cereus* y en el que *B. cytotoxicus* también aparece como una de las especies más lejanamente relacionadas al resto. Por otra parte, dentro de la rama superior se observa una topología conservada en la que las diferentes especies tienden a distribuirse ampliamente sin verse una agrupación clara según la especie productora lo que significaría que hay una baja diversidad a nivel de secuencia aminoacídica debido a la alta similitud existente en las secuencias de especies muy cercanamente relacionadas filogenéticamente. Un resultado similar encontraron en el trabajo de Drewnowska *et al.* (2020), en el que construyeron un árbol filogenético a partir de la secuencia de genes *chiA* de las especies altamente relacionadas *B. thuringiensis*, *B. mycooides* y *B. cereus*, que codifican para endoquitinasas. Dicho árbol mostró una topología muy conservada con una baja diversidad genética, lo que apuntó a que posiblemente la transferencia de estos genes se haya dado de manera vertical. En otros trabajos también se ha reportado la conservación de las secuencias aminoacídicas de estas enzimas entre especies altamente relacionadas del grupo de *B. cereus* (Barboza-Corona *et al.*, 2003; Mehmood *et al.*, 2010).

Se ha reportado que la capacidad de degradación de la quitina es una característica muy común en miembros del grupo de *B. cereus*, también conocido como *Bacillus cereus sensus lato (s.l.)* el cual incluye a diversas especies filogenéticamente cercanas tales como *B. cereus sensu stricto (s.s.)*, *B. thuringiensis*, *B. tropicus*, *B. paranthracis*, *B. pacificus*, *B. anthracis*, *B. mobilis*, *B. albus*, *B. luti*, *B. toyonensis*, *B. mycooides*, *B. paramycooides*, *B. nitratireducens*, *B. proteolyticus*, *B. gaemokensis*, *B. pseudomycooides*, *B. bingmayongensis*, *B. cytotoxicus* y *B. manliponensis* (Drewnowska *et al.*, 2020; C. Dunlap, 2019). El estudio de esta capacidad en el grupo de *B. cereus* recae principalmente en el hecho de que sus enzimas pueden poseer múltiples aplicaciones biotecnológicas tales como el control de hongos fitopatógenos y de insectos; los procesos de conversión de residuos de quitina a productos útiles a nivel industrial como el quitosano (Mehmood *et al.*, 2010); además del efecto potenciador que poseen las quitinasas en la actividad insecticida de las proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* (Arora *et al.*, 2003). Posiblemente debido a esto las secuencias etiquetadas como “endoquitinasas” presentes en la base de datos de NCBI pertenecen a especies de este grupo.

Con referencia a la actividad antifúngica de estas enzimas de *Bacillus* frente a *Fusarium oxysporum*, ya se han reportado diferentes casos. Por ejemplo, en el trabajo de Chang *et al.* (2003) la cepa *B. cereus* YQ 308 secretó una endoquitinasa cuando creció en presencia de

quitina. Tal enzima inhibió el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Pythium ultimum*.

7.3.2 Análisis de las quitobiosidasas

Las quitobiosidasas (EC.3.2.1.29) son un tipo de exoquitinasa que cataliza la liberación progresiva de dímeros de N-acetilglucosamina (quitobiosa) en el extremo no reductor de la cadena de quitina o de oligómeros de NAG (Rathore & Gupta, 2015). En la figura 4 se puede observar el análisis filogenético obtenido a partir de secuencias aminoacídicas de las enzimas quitobiosidasas producidas por especies del grupo de *B. cereus*.

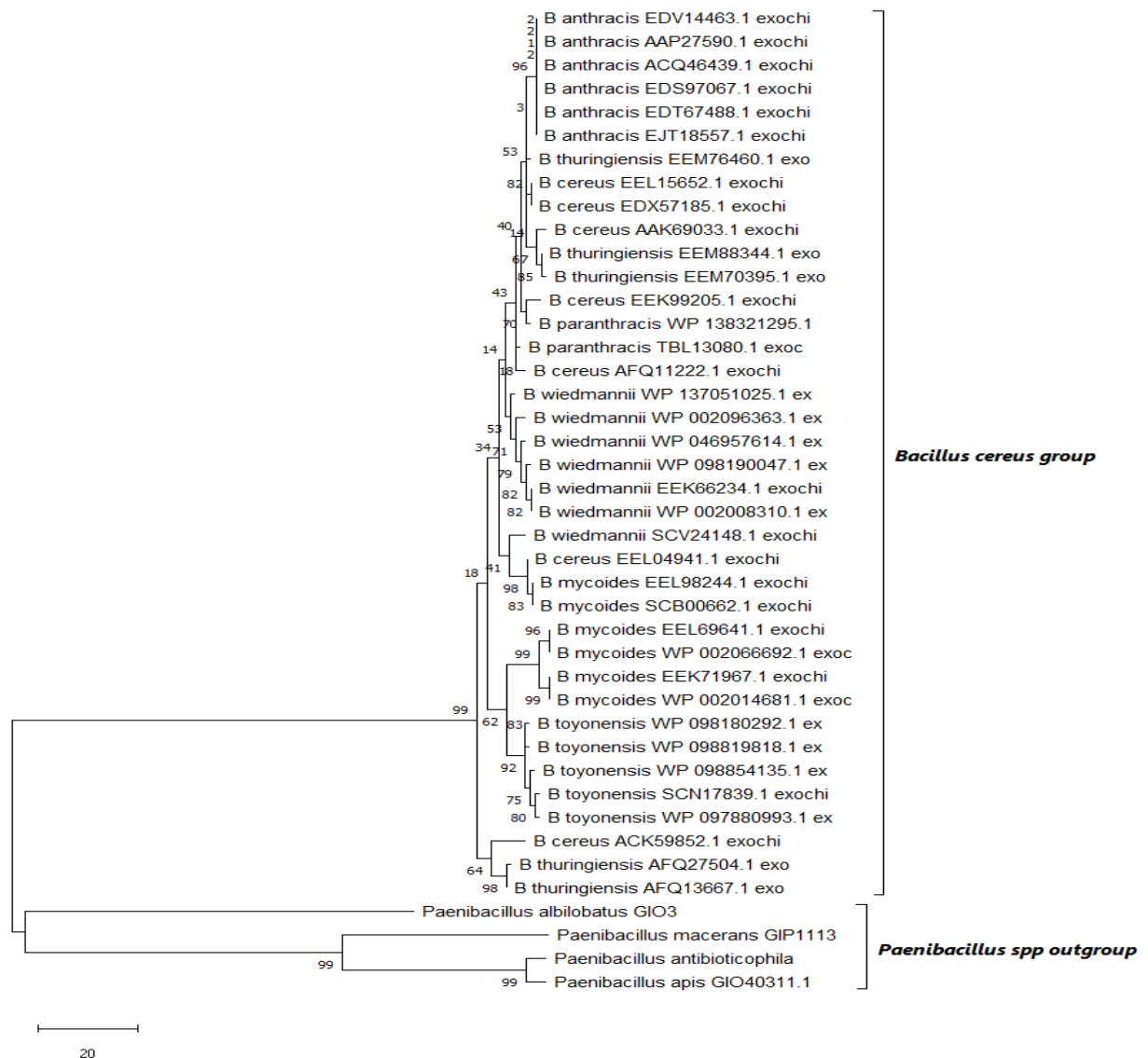


Figura 4. Análisis filogenético molecular basado en secuencias aminoacídicas de la enzima EXOQUITINASA (QUITOBIOCIDASA) producida por diferentes especies pertenecientes al grupo de *B. cereus*. Construido por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA X con 2000 réplicas de Bootstrap.

Como grupo externo de este árbol se utilizó al género *Paenibacillus*. En el grupo interno se observan diferentes especies del grupo de *Bacillus cereus* tales como *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. paranthracis*, *B. wiemannii*, *B. mycoides* y *B. toyonensis*. Estas secuencias tuvieron una longitud de alrededor de 360 aminoácidos, lo cual coincide con lo reportado para quitobiosidasas producidas por el grupo de *B. cereus*, las cuales se caracterizan por poseer una estructura modular que se compone de un péptido señal, un dominio N-terminal y un solo dominio característico de la familia 18 de las glucosidasas (Arora *et al.*, 2003; Drewnowska *et al.*, 2020; El-Hamshary *et al.*, 2008; Huang & Chen, 2004; S. Y. Wang *et al.*, 2001).

En la topología del grupo interno del árbol se observan dos ramas principales diferentes soportadas por un Bootstrap de 99, las cuales engloban a las especies que están más cercanamente relacionadas entre sí pues comparten un ancestro común más reciente. En la rama superior del grupo interno se nota como algunas especies tienden a agruparse como en el caso de *B. anthracis*, *B. wiedmannii*, *B. mycoides* y *B. toyonensis*, lo cual indica una mayor diversidad a nivel de secuencia aminoacídica de estas enzimas pues sus secuencias son muy similares entre cepas de una misma especie, pero tienden a variar más entre especies diferentes aun cuando están cercanamente relacionadas. En el caso de *B. cereus* y *B. thuringiensis*, las secuencias quedaron ampliamente distribuidas en las dos ramas principales del grupo interno lo que significa una alta diversidad existente en sus secuencias pues aun cuando hay secuencias de ambas especies que son muy similares entre sí como las de la rama superior también hay secuencias como las de la rama inferior que también son similares entre sí pero que están más lejanamente relacionadas de las de la rama superior, lo cual remarca la relación evolutiva que existe entre estas dos especies (Arora *et al.*, 2003). Un resultado semejante se obtuvo en el trabajo de Drewnowska *et al.* (2020) en el que construyeron un árbol filogenético a partir de la secuencia de genes *chiB* de las especies altamente relacionadas *B. thuringiensis*, *B. mycoides* y *B. cereus*, que codifican para quitobiosidasas. Tal árbol mostró una topología con mayor diversidad genética, lo que apuntó a que posiblemente la transferencia de estos genes *chiB* se haya dado de manera horizontal dentro del grupo de *B. cereus* en el pasado.

Otro resultado similar se obtuvo en el trabajo de El-Hamshary *et al.* (2008) donde realizaron un alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de exoquitinasas de alrededor de 360 aminoácidos de longitud de las especies altamente relacionadas: *B. thuringiensis*, *B. anthracis* y *B. cereus*, encontrando que hubo pocas diferencias en sus aminoácidos pero éstas generaron que en el árbol filogenético construido, las cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* aparecieran dispersas en el árbol y las cepas de *B. anthracis* aparecieran agrupadas pues se encontraron más conservadas dentro de esa especie.

Con respecto a la actividad antifúngica de estas enzimas, ya se ha reportado la actividad de quitobiosidasas de *Bacillus* frente a *Fusarium oxysporum*. Por ejemplo, en el trabajo de Pleban *et al.* (1997), se demostró que la cepa *B. cereus* 65 poseía la capacidad de producir y secretar una quitobiosidasa que fue capaz de inhibir la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* en comparación con el control.

7.3.3 Análisis de las β -N-acetilhexosaminidasas

Las β -N-acetilhexosaminidasas (EC 3.2.1.52) son glucosidasas que degradan por el extremo no reductor a los oligómeros o los dímeros (quitobiosa) resultantes de la degradación de la quitina en sus monómeros de N-acetilglucosamina (NAG) (Rathore & Gupta, 2015; Veliz *et al.*, 2017). Las β -N-acetilhexosaminidasas bacterianas específicamente poseen un rol importante en el reciclaje de las paredes celulares (Slámová *et al.*, 2010). En la figura 5 se puede observar el análisis filogenético obtenido a partir de secuencias aminoacídicas de las enzimas β -N-acetilhexosaminidasas del grupo de *B. subtilis*.

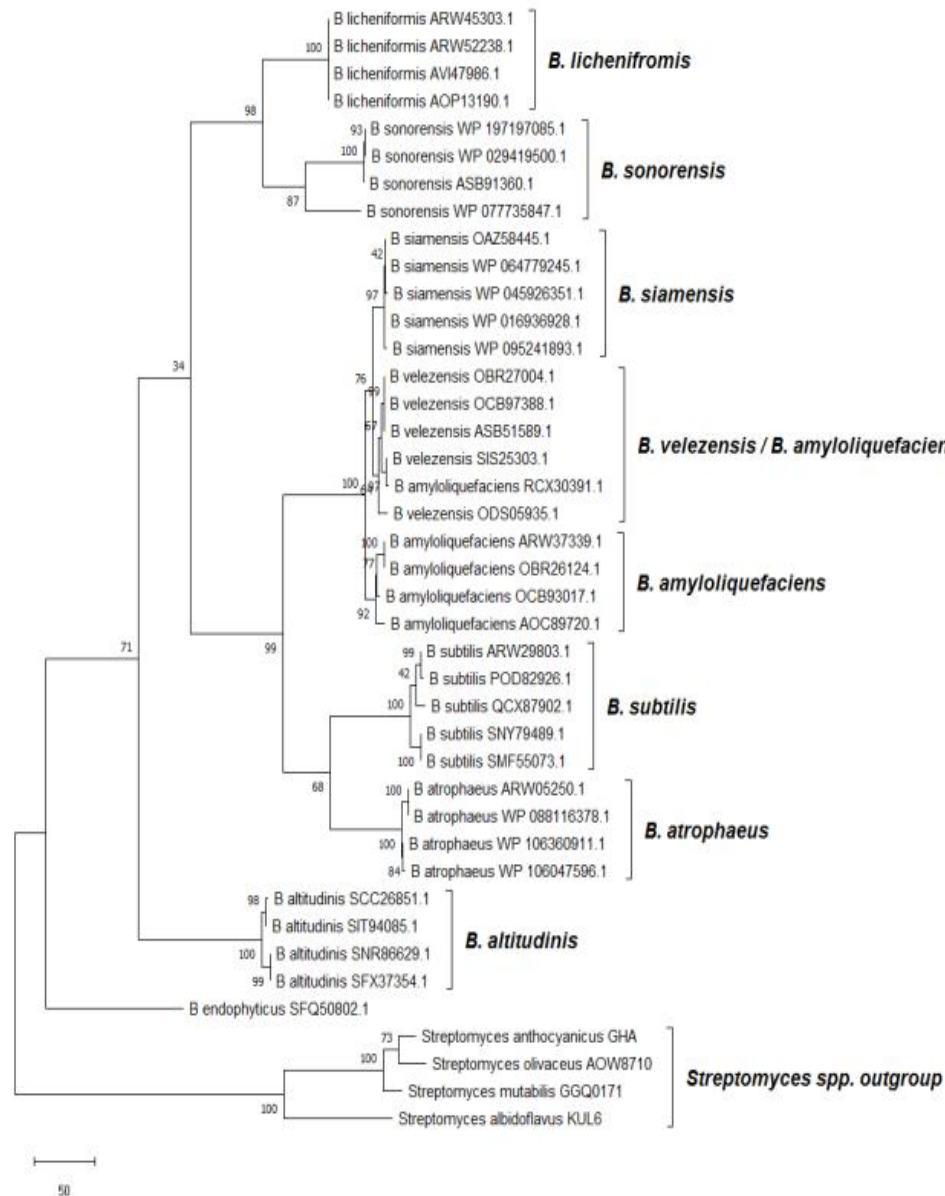


Figura 5. Análisis filogenético molecular basado en secuencias aminoacídicas de la enzima β -N-ACETILHEXOSAMINIDASA producida por diferentes especies pertenecientes al grupo de *B. subtilis*. Construido por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA X con 2000 réplicas de Bootstrap.

Como grupo externo de este árbol se utilizó al género *Streptomyces*, el cual representa un taxón externo al pertenecer a la clase *Actinobacteria* (Anderson & Wellington, 2001). Se observan diferentes especies del grupo de *Bacillus subtilis* tales como *B. licheniformis*, *B. sonorensis*, *B. siamensis*, *B. velezensis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. altitudinis* y *B. endophyticus*. Estas secuencias tuvieron una longitud de alrededor de 640 aminoácidos, lo cual coincide con lo reportado para β -N-acetilhexosaminidasas producidas por el grupo de *B. subtilis* (Litzinger *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2019). Estas enzimas se caracterizan por presentar en su dominio N-terminal una secuencia patrón altamente conservada KHFPGHGX(4)DSH (que puede variar a KH(F/I)PG(H/L)GX(4)D(S/T)H) característica de las β -N-acetilhexosaminidasas de la familia 3 de las glucosidasas a la que pertenecen estas enzimas cuyos aminoácidos aspartato (D) e histidina (H) (remarcados) están involucrados en la actividad de estas enzimas (Litzinger *et al.*, 2010). Esta secuencia patrón característica estuvo presente en las secuencias de *Bacillus* que utilizamos en este análisis.

En la topología del grupo interno se observan dos ramas principales. Una rama corresponde a *B. endophyticus* que según esta hipótesis es la especie más lejanamente relacionada del resto de las especies del grupo interno. Se puede observar que existe una clara agrupación según la especie productora de la enzima como lo demuestran los diferentes corchetes, siendo una excepción *B. amyloliquefaciens* quien también se agrupó en la rama de *B. velezensis*. Todo esto indica que existe una mayor diversidad en las secuencias de estas enzimas pues existe una mayor variación entre especies diferentes y una menor variación dentro de una misma especie. Ya se ha reportado que la estructura de estas enzimas está más conservada que sus secuencias (Litzinger *et al.*, 2010), lo que podría explicar la mayor diversidad en sus secuencias que generan la agrupación de estas según la especie productora y la variación entre especies diferentes.

Es preciso mencionar que este árbol está construido con especies del grupo de *B. subtilis* debido a que no hay secuencias reportadas para el grupo de *B. cereus* en la base de datos de NCBI. En diferentes trabajos se han caracterizado estas enzimas de *Bacillus* como en el trabajo de Kurakake *et al.* (2018) en el que la cepa *Bacillus* sp. CH11 aislada de suelo produjo una β -N-acetilhexosaminidasa extracelular con un pH y temperatura óptimos de 7 y 40°C, respectivamente. Por otra parte, en el trabajo de Sakai *et al.* (1994), la cepa *B. stearothermophilus* CH-4 aislada de composta que contenía quitina produjo una β -N-acetilhexosaminidasa con un pH óptimo de 6.5 y una temperatura óptima de 75°C.

Con respecto a la actividad antifúngica de estas enzimas, se han reportado casos en los que las β -N-acetilhexosaminidasas producidas por *Bacillus* poseen actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos. Por ejemplo, en el trabajo de Oztopuz *et al.* (2019) aislaron a la cepa *B. subtilis* Ege-B-19 a partir del suelo de un viñedo. Tal cepa presentó actividad N-acetilhexosaminidasa, quitinasa, quitosanasa y proteasa. Al analizar el efecto antifúngico del sobrenadante de su cultivo se encontró que este presentó actividad antifúngica frente a *Fusarium solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger* y *Rhizoctonia solani*.

7.3.4 Análisis de la quitina desacetilasa

Otra vía de degradación de la quitina que utiliza *Bacillus* involucra a la enzima quitina desacetilasa (EC 3.5.1.41) que cataliza la desacetilación de los residuos de N-acetilglucosamina que conforman a la quitina convirtiéndola así en quitosano, el cual es degradado posteriormente por las quitosanasas hasta sus unidades de glucosamina (Beier & Bertilsson, 2013; Veliz *et al.*, 2017). Se ha reportado la producción de enzimas quitina desacetilasa por especies de los grupos de *B. cereus* y *B. subtilis* las cuales son estudiadas para su aplicación en el biocontrol pero también con fines industriales pues el quitosano y sus derivados pueden ser utilizados como floculantes, adhesivos, agentes quelantes, agentes controladores de permeabilidad, entre otros usos (Tomita *et al.*, 2013).

En la figura 6 se puede observar el análisis filogenético obtenido a partir de secuencias aminoacídicas de las enzimas quitina desacetilasa producidas por especies del grupo de *Bacillus cereus*.

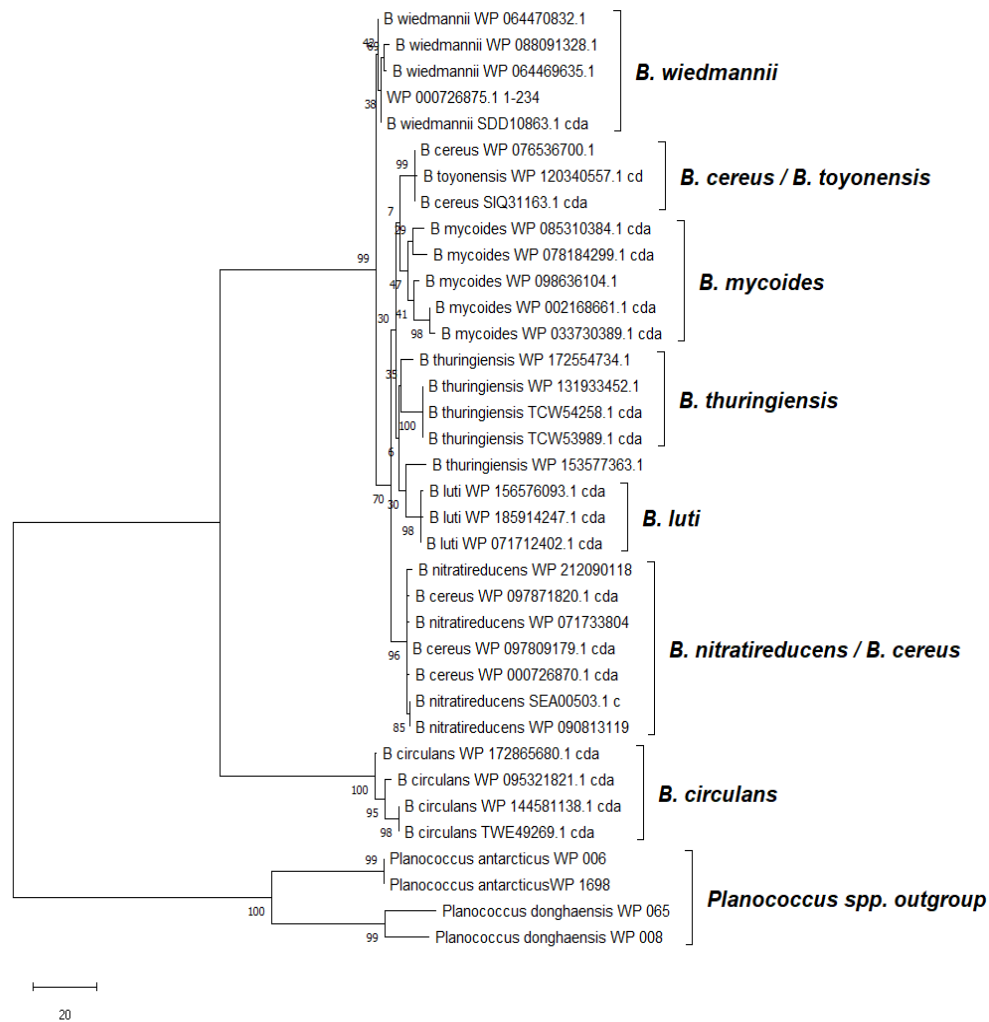


Figura 6. Análisis filogenético molecular basado en secuencias aminoacídicas de la enzima QUITINA DESACETILASA producida por diferentes especies pertenecientes al grupo de *B. cereus*. Construido por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA X con 2000 réplicas de Bootstrap.

Como grupo externo de este árbol se utilizaron especies del género *Planococcus* ya que representa un taxón externo al formar parte del mismo filo, clase y orden taxonómico que *Bacillus*, pero siendo ambos de familias diferentes (Goodfellow *et al.*, 2009). En el grupo interno de este árbol se observan diferentes especies del grupo de *Bacillus cereus* tales como *B. wiedmannii*, *B. cereus*, *B. toyonensis*, *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. luti*, *B. nitratireducens* y *B. circulans*. Estas secuencias tuvieron una longitud de alrededor de 236 aminoácidos.

En la topología del grupo interno se observan dos ramas principales diferentes. La rama inferior corresponde a *B. circulans* quien estaría más lejanamente relacionada con las especies de *Bacillus* incluidas en la otra rama. Se puede observar que existe cierta agrupación según la especie productora de la enzima como lo demuestran los diferentes corchetes, lo cual indica una mayor diversidad pues sus secuencias son muy similares entre cepas de una misma especie, pero tienden a variar más entre especies diferentes, aunque hay excepciones como el caso de *B. cereus* cuyas secuencias tendieron a ser similares a las de otras especies como *B. toyonensis* y *B. nitratireducens*.

Se ha reportado que las enzimas quitina desacetilasas pertenecen a las polisacárido desacetilasas, y éstas últimas a su vez a las esterases de la familia 4 (CE4). Todas las polisacárido desacetilasas poseen una región altamente conservada llamada dominio polisacárido desacetilasa y en general ya se ha reportado una alta conservación de la secuencia de estas enzimas en especies altamente relacionadas filogenéticamente (Psylinakis *et al.*, 2005). Sin embargo, ya también se ha reportado que a pesar de esto existen ciertas diferencias en la secuencia aminoacídica del sitio de unión al sustrato que crean pequeñas modificaciones estructurales lo que podría causar la diversificación funcional de poder reconocer diferentes polisacáridos (Andreou *et al.*, 2018). Por ejemplo, en el trabajo de Hu *et al.* (2006) se clonó y estudió al gen de una polisacárido desacetilasa (*pdaA*) de *B. thuringiensis*, el cual codificó para una proteína que presentó un 53 % de identidad con una PdaA de *B. subtilis* pero un porcentaje mayor con una PdaA de *B. cereus* (99 %) y *B. anthracis* (98 %). Esto coincide con los resultados obtenidos en nuestro árbol en donde la topología muestra que existe cierta conservación de las secuencias aminoacídicas entre las especies más cercanamente relacionadas como las incluidas en la rama superior del grupo interno pero la conservación es mayor dentro de la misma especie productora como lo demuestran las agrupaciones marcadas por los corchetes, lo que significaría una mayor diversidad entre sus secuencias. Por otra lado, el agrupamiento de *B. cereus* con especies diferentes podría explicarse por su amplia cercanía filogenética con otras especies del grupo de *B. cereus* como sucedió en el trabajo antes mencionado de Hu *et al.* (2006).

En la figura 7 se puede observar el análisis filogenético obtenido a partir de secuencias aminoacídicas de las enzimas quitina desacetilasa producidas por especies del grupo de *B. subtilis*. Como grupo externo se utilizó al género *Streptomyces*, el cual representa un taxón externo al pertenecer a la clase *Actinobacteria* (Anderson & Wellington, 2001).

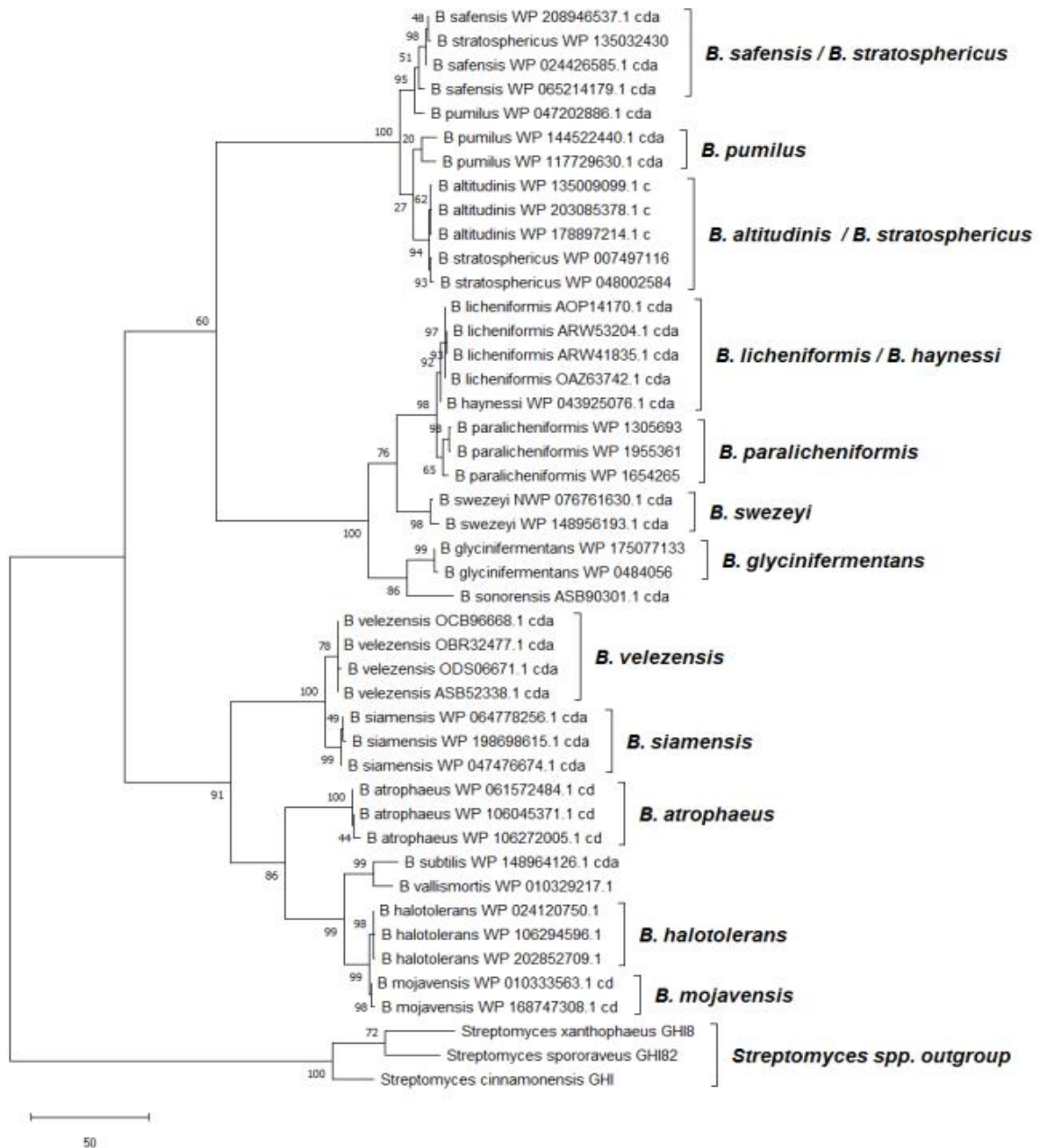


Figura 7. Análisis filogenético molecular basado en secuencias aminoacídicas de la enzima QUITINA DESACETILASA producida por diferentes especies pertenecientes al grupo de *B. subtilis*. Construido por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA X con 2000 réplicas de Bootstrap.

En el grupo interno de este árbol se encuentran diferentes especies del grupo de *Bacillus subtilis*. Estas secuencias tuvieron una longitud de alrededor de 284 aminoácidos. En la topología del grupo interno se observan dos ramas principales que incluye a las especies que están más cercanamente relacionadas. Una rama incluye a las especies *B. safensis*, *B. stratosphericus*, *B. pumilus*, *B. altitudinis*, *B. paralicheniformis*, *B. haynessi*, *B.*

paralicheniformis, *B. swezeyi*, *B. glycinifermentans* y *B. sonorensis*. La otra rama incluye a *B. velezensis*, *B. siamensis*, *B. atrophaeus*, *B. subtilis*, *B. vallismortis*, *B. halotolerans* y *B. mojavenensis*. Se puede observar que existe cierta agrupación según las especies productoras, siendo una excepción *B. stratosphericus*.

En este análisis se obtuvieron resultados similares a los del grupo de *B. cereus*. Coincide con lo reportado por Psylinakis *et al.* (2005) acerca de una alta conservación de la secuencia de estas enzimas en especies altamente relacionadas filogenéticamente. Esto mismo se denota en el trabajo de Hu *et al.* (2006) donde una polisacárido desacetilasa de 260 aminoácidos de *B. thuringiensis* presentó un 53 % de identidad con una PdaA de *B. subtilis* pero un porcentaje mayor con una PdaA de *B. cereus* (99 %) y *B. anthracis* (98 %), lo cual indica la diferencia a nivel de secuencias aminoacídicas entre el grupo de *B. cereus* y *B. thuringiensis* pero también la conservación dentro de especies cercanamente relacionadas de un mismo grupo. Esto explicaría el agrupamiento según la especie productora en nuestro árbol pues existe una mayor relación filogenética dentro de una misma especie. Sin embargo, la presencia de varias especies en cada una de las ramas principales del grupo interno significa que hay una mayor diversidad en estas enzimas pues las secuencias de la rama superior están más lejanamente relacionadas a las de la rama inferior.

Con respecto a la actividad antifúngica de estas enzimas de *Bacillus*, en el trabajo de Khan *et al.* (2018) *Bacillus subtilis* 30VD-1 generó un 70 % de inhibición en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en ensayos de cultivo dual y demostró la capacidad de producir a la enzima quitina desacetilasa pues se generó una zona clara en el centro de la colonia bacteriana cuando creció en un medio que contenía quitina coloidal, lo cual es característico de los productores de esta enzima.

7.3.5 Análisis de las quitosanasas

El quitosano es un polímero de residuos de glucosamina (GlcN) unidos por enlaces β -1,4, el cual resulta de la acción de la quitina desacetilasa que remueven el grupo acetilo de las unidades de N-acetilglucosamina de la quitina. Las quitosanasas (EC 3.2.1.132) son enzimas que catalizan la hidrólisis generalmente endo de los enlaces β -1,4 que unen a las unidades de glucosamina del quitosano generando oligosacáridos de bajo peso molecular que son más fáciles de degradar (Veliz *et al.*, 2017). Estas han sido estudiadas con el fin de usarlas para el biocontrol de hongos fitopatógenos además de la biotransformación del quitosano para la obtención de quito-oligosacáridos de utilidad industrial. Estas enzimas han sido aisladas a partir de bacterias, hongos y plantas además de que han sido clasificadas en cinco familias diferentes de las enzimas glucosidasas (GH5, GH8, GH46, GH75 y GH78) según la similitud existente en la secuencia aminoacídica de sus sitios catalíticos. Ya se ha reportado la producción de quitosanasas en especies de los grupos de *B. cereus* y *B. subtilis* (Lee *et al.*, 2007).

En las figuras 8 se puede observar el *análisis* filogenético obtenido a partir de secuencias aminoacídicas de las enzimas quitosanasas producidas por especies del grupo de *Bacillus cereus*.

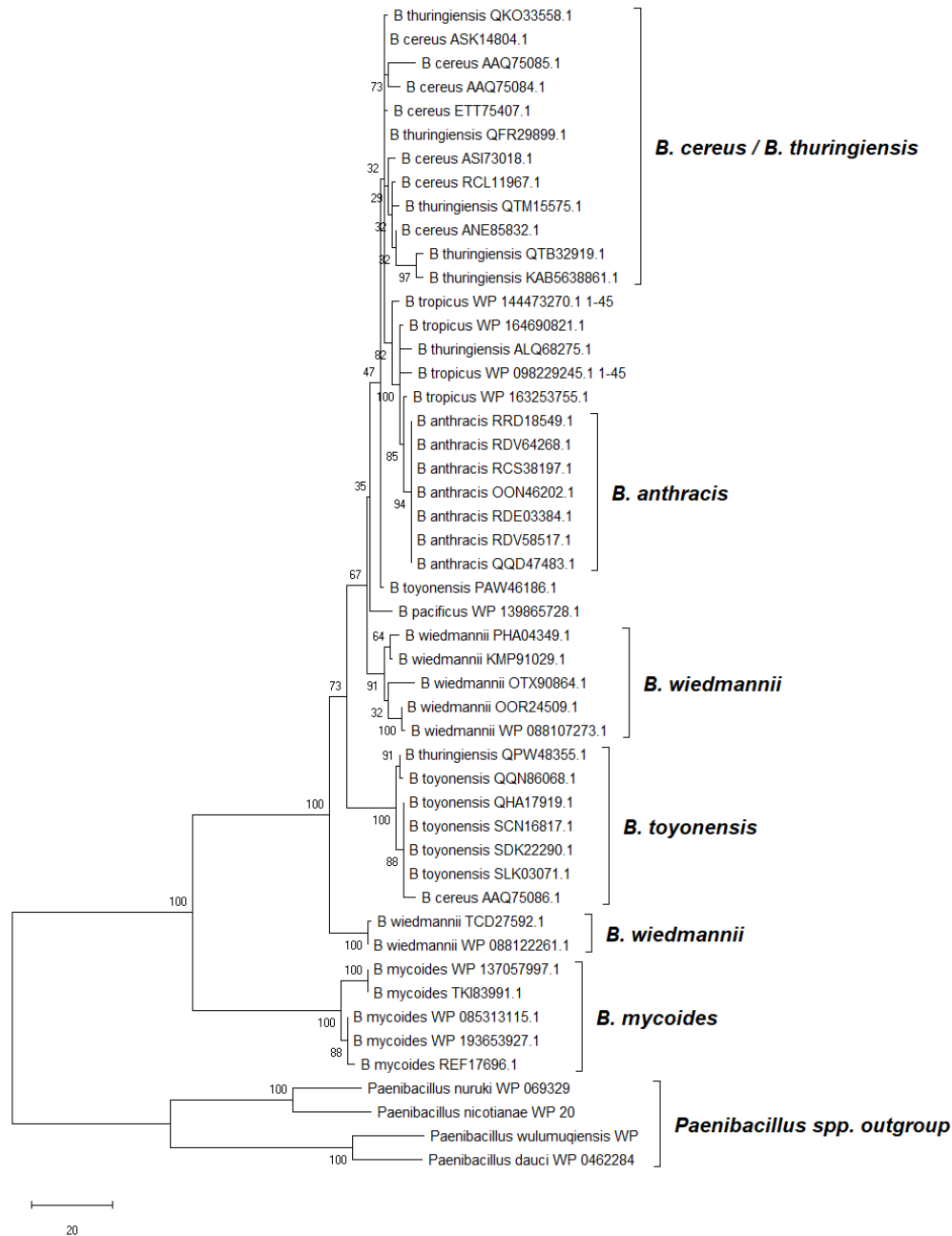


Figura 8. Análisis filogenético molecular basado en secuencias aminoacídicas de la enzima QUITOSANASA producida por diferentes especies pertenecientes al grupo de *B. cereus*. Construido por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA X con 2000 réplicas de Bootstrap.

En este árbol se ocupó como grupo externo al género bacteriano *Paenibacillus* (Goodfellow *et al.*, 2009). En el grupo interno se encuentran diferentes especies del grupo de *Bacillus cereus* cuyas secuencias tuvieron una longitud de alrededor de 450 aminoácidos, lo cual coincide con lo reportado para quitosanasas producidas por este grupo, las cuales también

se caracterizan por pertenecer a la familia 8 de las glucosidasas, mostrar actividad quitosanasa y carboximetilcelulasa además de presentar un dominio ATDGDLDIAYSLLLAKQW característico de esta familia de glucosidasas (Jang *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007; Liang *et al.*, 2016; Su *et al.*, 2006). Tal dominio característico estuvo presente en las secuencias que utilizamos para la construcción de este árbol.

En la topología del árbol se observan dos ramas principales. Una incluye a *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. tropicus*, *B. anthracis*, *B. toyonensis*, *P. pacificus* y *B. wiemannii*; la otra rama incluye sólo a *B. mycooides* quien estaría más lejanamente relacionada del resto. Esto podría explicarse porque la mayoría de las secuencias que utilizamos en este análisis tienen una longitud de 453 aminoácidos mientras que las de *B. mycooides* tienen una longitud de 455 o 457 aminoácidos, lo cual coincide con una quitosanasa de *B. mycooides* reportada por Liang *et al.* (2016) cuyo peso de 48 kDa fue mayor a los 45 kDa de las quitosanasas de *B. cereus* H-1, *B. thuringiensis* y *B. cereus* S65 de 453 aminoácidos reportadas por Jang (2003), Lee *et al.* (2007) y Su *et al.* (2006), respectivamente.

En la parte superior del árbol se puede observar que existe cierta agrupación de *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* que son especies altamente relacionadas, lo cual coincide con el trabajo de Lee *et al.* (2007) donde encontraron altos porcentajes de identidad entre quitosanasas de estas especies. La topología del árbol también muestra que existe una mayor variación en la secuencia aminoacídica entre especies diferentes y una menor variación dentro de una misma especie como se nota en los agrupamientos por especie productora como en el caso de *B. anthracis*, *B. wiemannii*, y *B. toyonensis*, aunque hay excepciones en las que las secuencias no tienden a agruparse de esta manera. Todo esto apunta a que hay una mayor diversidad a nivel de secuencia aminoacídica de estas enzimas. Ya se ha reportado que las quitosanasas de la familia 8 de las glucosidasas son muy diversas (Lee *et al.*, 2007), lo cual podría explicar la topología de nuestro árbol y en especial el agrupamiento según la especie productora de la enzima como se observa en cierta parte del árbol, pues las secuencias están más conservadas dentro de esas especies.

En la figura 9 se puede observar el análisis filogenético obtenido a partir de secuencias aminoacídicas de las enzimas quitosanasas producidas por especies del grupo de *Bacillus subtilis*. En este se utilizó como grupo externo al género *Streptomyces*, el cual representa un taxón externo al pertenecer a la clase *Actinobacteria* (Anderson & Wellington, 2001). En el grupo interno se encuentran diferentes especies del grupo de *Bacillus subtilis* tales como *B. inaquosorum*, *B. tequilensis*, *B. subtilis*, *B. intestinalis*, *B. glycinifermentans*, *B. amyloliquefaciens*, *B. velezensis*, *B. siamensis*, *B. halotolerans*, *B. atrophaeus* y *B. nakamurai*. Estas secuencias tuvieron una longitud de alrededor de 280 aminoácidos, lo cual coincide con lo reportado para las quitosanasas producidas por el grupo de *B. subtilis*, las cuales también se caracterizan por pertenecer a la familia 46 de las glucosidasas, poseer actividad solo frente al quitosano y componerse de un péptido señal y un dominio característico de esta familia de las glucosidasas (Kang *et al.*, 2021; Pang *et al.*, 2021; Qin *et al.*, 2018).

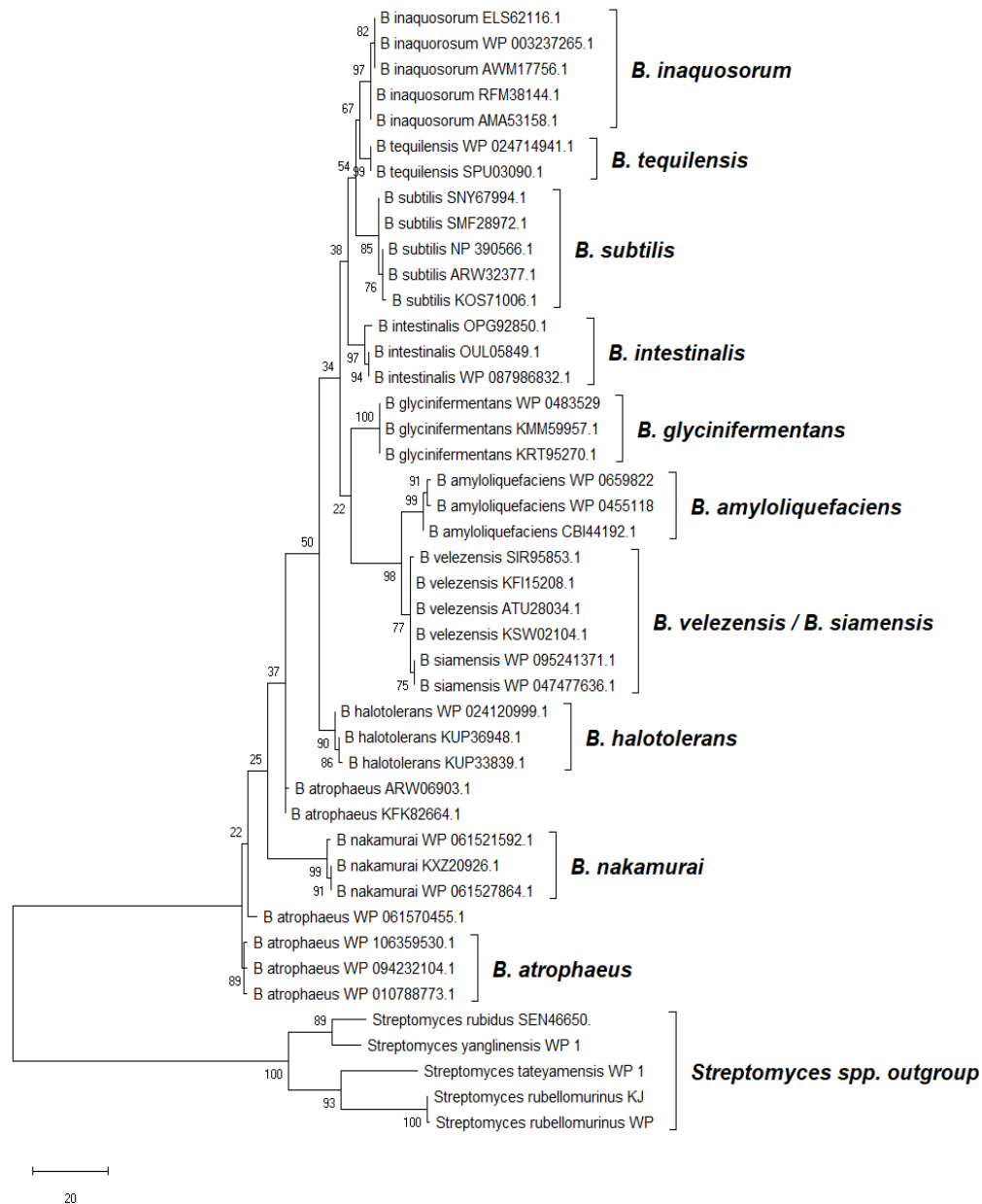


Figura 9. Análisis filogenético molecular basado en secuencias aminoacídicas de la enzima QUITOSANASA producida por diferentes especies pertenecientes al grupo de *B. subtilis*. Construido por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA X con 2000

En la topología del grupo interno se observan dos ramas principales, una de ellas incluye sólo a *B. atrophaeus* y la otra rama incluye al resto de las especies de *Bacillus* analizadas, aunque también a varias secuencias de *B. atrophaeus*. En este árbol es muy notable la agrupación según la especie productora, lo cual puede indicar que las secuencias están más conservadas dentro de una misma especie y esto se traduce en una mayor diversidad de

estas enzimas. Esto coincide con el trabajo de Heng Li *et al.* (2015) donde construyeron un árbol filogenético con las secuencias aminoacídicas de quitosanasas de diferentes cepas del grupo de *Bacillus subtilis* encontrando una topología similar a la de nuestro trabajo en donde hubo una agrupación según la especie productora e incluso *B. atrophaeus* coincidió en ser la especie más lejanamente relacionada. También coincide con el trabajo de Kang *et al.*, (2021) donde una quitosanasa de *B. amyloliquefaciens* presentó el porcentaje de identidad más alto con una quitosanasa de otra cepa de *B. amyloliquefaciens*, lo que indica la conservación de estas secuencias dentro de una misma especie. Por tanto, según la hipótesis filogenética mostrada por este árbol se podría deducir que hay una alta diversidad a nivel de secuencia aminoacídica de estas enzimas.

Con respecto a la actividad antifúngica de las quitosanasas de *Bacillus*, ya se han reportado trabajos como los siguientes. Por ejemplo, Chang *et al.* (2009) reportaron que *Bacillus cereus* AU004 secretó una quitosanasa al crecer en un medio que contenía quitosano y el sobrenadante obtenido afectó el crecimiento de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani* y *Pythium ultimum*. Otro ejemplo es el trabajo de Oztopuz *et al.* (2019) donde el sobrenadante del cultivo de *B. subtilis* Ege-B-19 mostró actividad quitosanasasa e inhibió el crecimiento *Fusarium solani*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger* y *Rhizoctonia solani*.

7.3.6 Análisis de las β -1,3 glucanasas

El β -1,3 glucano es un polímero de unidades de glucosa unidas por enlaces de tipo β -1,3. Este es uno de los principales componentes de la pared de *Fusarium oxysporum* y muchas otras especies fúngicas puesto que se ancla covalentemente a la quitina o forma puentes de hidrógeno con ella generando microfibrillas que conforman una base estructural rígida alrededor de la célula a la que posteriormente se anclan otros componentes superficiales que en conjunto hacen fuerte pero flexible y químicamente diversa a la pared fúngica (Gow *et al.*, 2017; Schoffemeer *et al.*, 1999). Las β -1,3 glucanasas son un tipo de glucosidasas que catalizan la ruptura de los enlaces β -1,3-D-glucosídicos que unen a las unidades de D-glucosa que componen al glucano. Estas enzimas están ampliamente distribuidas entre bacterias, hongos y plantas superiores pero su función fisiológica depende del organismo que las produce. En las bacterias por ejemplo estas enzimas tienen la función de romper las paredes fúngicas para ocuparlas como una fuente de carbono y nitrógeno (Jaafar *et al.*, 2020).

En la figura 10 se puede observar el análisis filogenético obtenido a partir de secuencias aminoacídicas de las enzimas β -1,3-glucanasas producidas por especies del grupo de *Bacillus subtilis* debido a que no hay secuencias etiquetadas con este nombre para el grupo de *B. cereus* en la base de datos de NCBI.

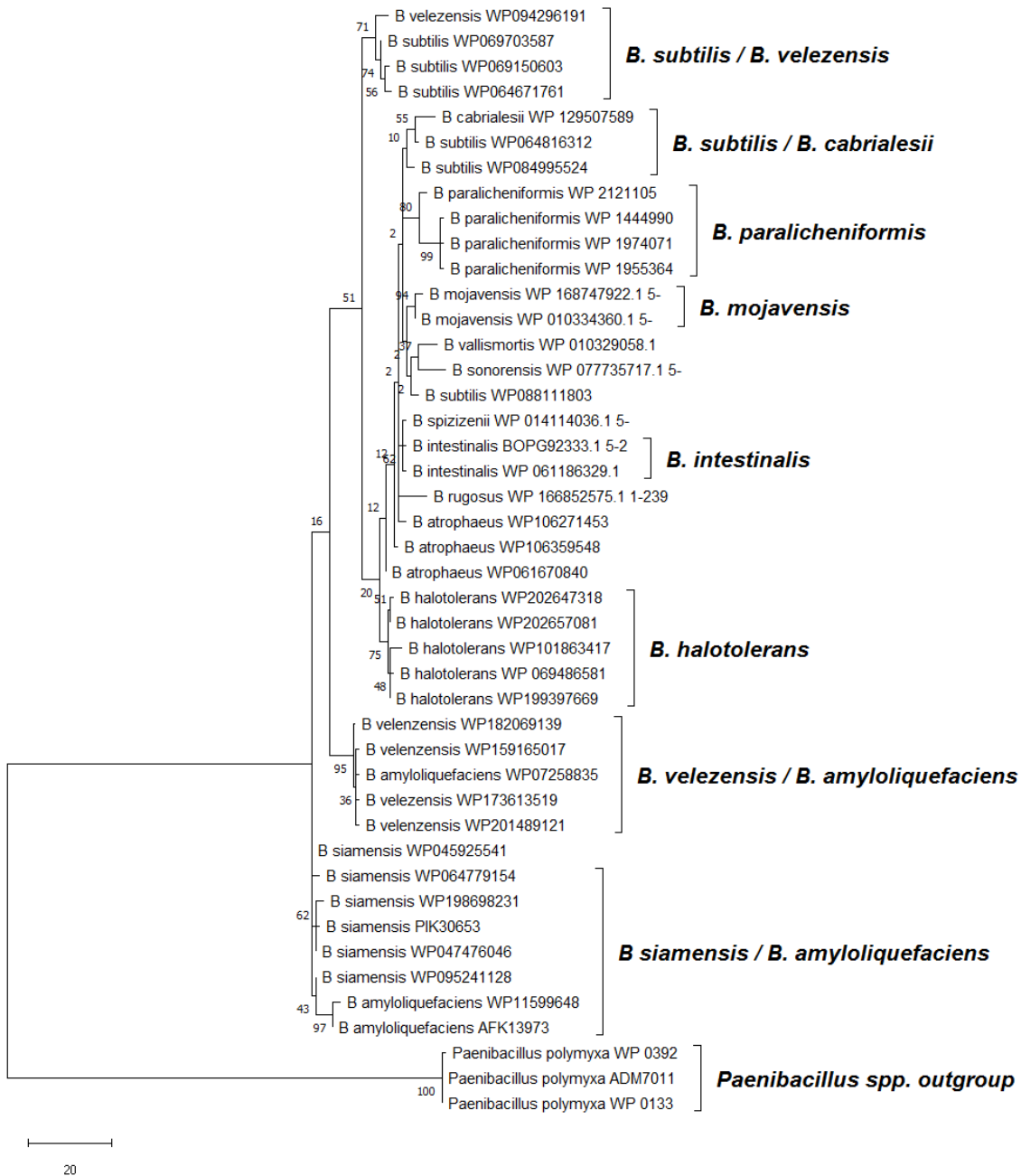


Figura 10. Análisis filogenético molecular basado en secuencias aminoacídicas de la enzima β -1,3 GLUCANASA producida por diferentes especies pertenecientes al grupo de *B. subtilis*. Construido por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA X con 2000 réplicas de Bootstrap.

Como grupo externo se utilizaron especies del género *Paenibacillus*. En el grupo interno de este árbol se observan diferentes especies del grupo de *Bacillus subtilis* tales como *B. velezensis*, *B. subtilis*, *B. cabrialesii*, *B. paralicheniformis*, *B. mojavensis*, *B. vallismortis*, *B. sonorensis*, *B. spizizenii*, *B. intestinalis*, *B. rugosus*, *B. atrophaeus*, *B. halotolerans*, *B.*

amyloliquefaciens y *B. siamensis*. Estas secuencias tuvieron una longitud de alrededor de 240 aminoácidos, lo que coincide con lo reportado para β -1,3-glucanasas producidas por el grupo de *B. subtilis*, las cuales también se caracterizan por pertenecer a la familia 16 de las glucosidasas y componerse de un péptido señal y un solo dominio catalítico característico de las β -1,3 glucanasas de esta familia de glucosidasas (Abraham *et al.*, 2013; Jaafar *et al.*, 2020).

En la topología del grupo interno se observan dos ramas principales, una de ellas incluyendo a *B. siamensis* y *B. amyloliquefaciens*. La otra rama incluyendo al resto de las especies de *Bacillus* analizadas, aunque también a *B. amyloliquefaciens*. En este árbol también se puede observar que existe cierta agrupación según la especie productora de la enzima como lo señalan los diferentes corchetes, lo que denota la conservación de estas secuencias dentro de una misma especie, aunque existen excepciones como *B. subtilis*, *B. velezensis* y *B. amyloliquefaciens* que aparecieron dispersos en el árbol. Por tanto, según la hipótesis filogenética mostrada por este árbol se podría deducir que existe una mayor diversidad en las secuencias aminoacídicas de estas enzimas pues hay una mayor variación entre cepas de especies diferentes y una menor variación dentro de una misma especie, aunque hay ciertas excepciones en las que se agrupan integrantes de especies diferentes debido a la similitud en sus secuencias. Esto coincide con el trabajo de Abraham *et al.* (2013) donde construyeron un árbol filogenético con secuencias β -1,3-glucanasas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens* encontrando en algunos casos la agrupación entre ambas especies pero también hubo casos donde estuvieron más cercanamente relacionadas las secuencias de una misma especie.

Respecto a la actividad antifúngica de estas enzimas se han reportado casos como el trabajo de Janahiraman *et al.* (2016), en el que *Bacillus cereus* PPB-1 inhibió el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y de manera bioquímica demostró la capacidad de producir β -1,3-glucanasas y quitinasas. Otro ejemplo es el trabajo de Shanmugam *et al.* (2011) donde la cepa de *B. atrophaeus* S2BC-2 aislada de suelo de rizósfera inhibió a *Fusarium oxysporum* y demostró la capacidad de producir enzimas quitinasas, β -1,3-glucanasas y sideróforos. Su aplicación a semillas y suelo en condiciones de invernadero, redujo significativamente los síntomas de marchitez vascular en plantas de jitomate que crecieron en suelo inoculado con esporas de *Fusarium oxysporum*.

7.3.7 Análisis de la serina proteasa alcalina

En la pared de *Fusarium oxysporum*, los componentes superficiales que se anclan a la base estructural de quitina y β -1,3-glucanos son los α -1,3-glucanos que son esenciales para la integridad de la pared, así como glicoproteínas que contienen ácido urónico, manosa, galactosa y glucosa. De hecho, las glicoproteínas constituyen una gran parte de la pared celular de este hongo (50-60 %). Dada la importancia estructural de las proteínas y la esencialidad de sus funciones como la de modificar las propiedades de la pared, o la de adherencia, así como la protección frente a elementos ambientales dañinos; su degradación por parte de proteasas representa un mecanismo importante para el biocontrol de este hongo (Gow *et al.*, 2017; Guleria *et al.*, 2016; Schoffelmeer *et al.*, 1999).

Las proteasas (EC 3.4) son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos de las proteínas generando pequeños péptidos o aminoácidos. Estas se dividen principalmente en las familias Aspártico (A), Cisteína (C), Serina (S) y Metaloproteasas (M) según las características de su sitio activo catalítico (Ji *et al.*, 2020). También pueden ser clasificadas según sus propiedades ácidas, neutrales o básicas. Las proteasas de origen microbiano son de las más estudiadas y aplicadas en procesos industriales y productos. Dentro de los microorganismos productores, *Bacillus* es uno de los más importantes a nivel industrial debido a su capacidad para producir proteasas alcalinas y neutrales con altos rendimientos y estas pueden ser de las familias serina proteasas, cisteína proteasas o metaloproteasas (Contesini *et al.*, 2017).

Las proteasas neutrales son activas a pH neutro o a un pH débilmente ácido o alcalino. La mayoría de las proteasas neutrales de *Bacillus* son activas en un rango de pH de 5 a 8 y poseen una termotolerancia relativamente baja. Estas enzimas de *Bacillus* son usadas principalmente en la industria de los alimentos y la cervecera. Por otra parte, las proteasas alcalinas son activas en un rango de pH de 9 a 11. *Bacillus* es uno de los productores más activos de proteasas alcalinas, las cuales son usadas principalmente en la industria de los detergentes, alimentos, medicamentos, textil y del cuero. Las cepas productoras de estas enzimas están distribuidas en el agua, el suelo y condiciones altamente alcalinas (Razzaq *et al.*, 2019).

Ya se ha reportado que especies de los grupos de *Bacillus cereus* y *B. subtilis* han demostrado la capacidad de producir enzimas serina proteasa alcalina y que algunas de ellas han presentado actividad antifúngica frente a diferentes hongos fitopatógenos de importancia agrícola (Guleria *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2013). Estas enzimas reciben su nombre debido a su actividad a pH alcalino además de su aminoácido nucleofílico serina presente en su sitio activo, el cual ataca al grupo carbonilo del enlace peptídico del sustrato para escindirlo. La actividad de esta serina generalmente se apoya de los aminoácidos aspartato e histidina pues en conjunto forman una triada catalítica de la que depende la nucleofilia de la serina. Es la configuración de esta triada dentro de la enzima la que permite la hidrólisis de los enlaces peptídicos (Di Cera, 2009).

En la figura 11 se puede observar el análisis filogenético obtenido a partir de secuencias aminoacídicas de las enzimas serina proteasa alcalina producidas por especies del grupo de *Bacillus cereus*. Estas secuencias tuvieron una longitud de 397 aminoácidos, lo que coincide con lo reportado para estas enzimas producidas por el grupo de *B. cereus*, las cuales también se caracterizan por componerse de tres porciones: un péptido señal, una prosequencia y la enzima madura de alrededor de 290 aminoácidos. De igual manera presentan una triada catalítica de aspartato, histidina y serina que es característica de las enzimas serina proteasas (Moriyama *et al.*, 1998; Tan & Donovan, 2000).

En este árbol se utilizó como grupo externo al género *Paenibacillus*. La topología de este árbol nos muestra una hipótesis de la relación evolutiva de las especies según la secuencia de esta enzima analizada. En la topología del grupo interno se observan dos ramas principales que abarcan a las especies que están más cercanamente relacionadas. Una incluye a *B. wiedmannii*, *B. toyonensis*, *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. albus*, *B. tropicus*, *B. fongorum*, *B. paranthracis*, *B. pacificus* y *B. gaemokensis*. En la otra rama sólo

está *B. pseudomycooides*. lo cual coincide con un árbol filogenético reportado por Dunlap (2019) el cual fue construido con el genoma core de cepas tipo de especies de este grupo y en el que *B. pseudomycooides* también se encuentra como una de las especies más lejanamente relacionada del resto de las especies del grupo de *B. cereus*.

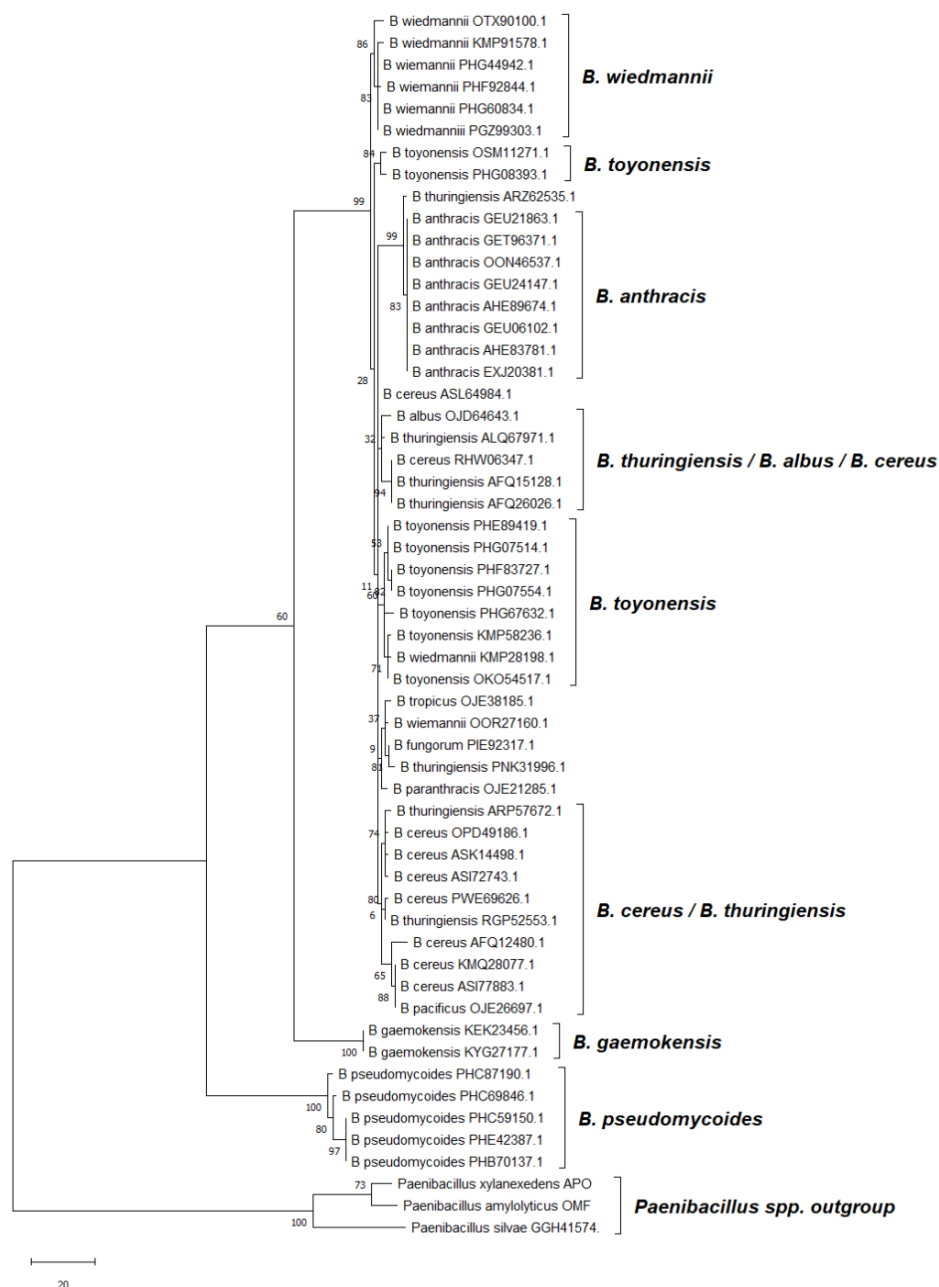


Figura 11. Análisis filogenético molecular basado en secuencias aminoacídicas de la enzima SERINA PROTEASA ALCALINA producida por diferentes especies pertenecientes al grupo de *B. cereus*. Construido por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA X con 2000 réplicas de Bootstrap.

En este árbol se puede observar que también existe cierta agrupación según la especie productora de la enzima como lo demuestran los diferentes corchetes, pero hubo varias excepciones como *B. cereus*, *B. wiedmannii*, *B. toyonensis* y *B. thuringiensis* pues quedaron dispersos en la rama superior del grupo interno al agruparse con especies diferentes, pero cercanamente relacionadas. Esto coincide con el caso de una serina proteasa alcalina de *B. thuringiensis* reportada en el trabajo de Tan & Donovan (2000) que fue 100 % idéntica a una serina proteasa de *B. cereus* reportada en el trabajo de Moriyama *et al.* (1998), lo que indica la conservación de estas secuencias dentro de especies altamente relacionadas. Por tanto, según este árbol se podría deducir que existe una mayor diversidad a nivel de secuencia aminoacídica de esta enzima pues existe una mayor variación en la secuencia aminoacídica entre especies diferentes y una menor variación dentro de una misma especie, aunque hay excepciones como los casos antes mencionados donde estuvieron más cercanamente relacionadas con especies diferentes y por eso se agruparon con ellas. Todo esto coincide con la alta diversidad y funcionalidad que en general se le ha atribuido al grupo de las serina proteasas pues estas representan a un tercio de las enzimas proteolíticas conocidas al estar presente en todos los dominios de vida celular así como en muchos genomas virales (Di Cera, 2009).

En la figura 12 se puede observar el *análisis* filogenético obtenido a partir de secuencias aminoacídicas de las enzimas serina proteasa alcalina producidas por especies del grupo de *B. subtilis*. En este se utilizó al género *Streptomyces* como grupo externo. En el grupo interno de este árbol se observan diferentes especies del grupo de *Bacillus subtilis*. Estas secuencias tuvieron una longitud de alrededor de 440 aminoácidos que coincide con lo reportado para enzimas serina proteasa alcalina producidas por este grupo, las cuales también se caracterizan por presentar un dominio catalítico peptidasa_S8 que es característico en la familia de las enzimas serina proteasas en el grupo de *B. subtilis* además de la triada catalítica aspartato (D), histidina (H) y serina (S) presente en su sitio activo, que es esencial en el mecanismo catalítico y que se mantiene conservado en las enzimas serina proteasa microbianas (Ji *et al.*, 2020; Mahmoud *et al.*, 2021).

En la topología del grupo interno se observan dos ramas principales que engloban a las especies más cercanamente relacionadas según la secuencia de esta enzima. Una rama incluye a *B. licheniformis* y *B. paralicheniformis*. La otra rama incluye al resto de las especies de *Bacillus* analizadas tales como *B. altitudinis*, *B. subtilis*, *B. spizizenii*, *B. tequilensis*, *B. mojavenensis*, *B. atrophaeus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. velezensis*. Se puede observar que existe cierta agrupación según la especie productora de la enzima como lo demuestran los corchetes, aunque existen excepciones como *B. amyloliquefaciens* que quedó disperso en la rama de *Bacillus velezensis*. Por tanto, según la hipótesis filogenética mostrada por este árbol se podría deducir que en esta enzima también hay una mayor diversidad dado que en la mayoría de los casos existe una mayor variación en la secuencia aminoacídica entre especies diferentes y una menor variación dentro de una misma especie, razón por la que tienden a agruparse según la especie productora, aunque existen ciertas excepciones como *B. amyloliquefaciens*. Esto coincide con el trabajo de Ji *et al.* (2020), donde un alineamiento múltiple mostró que la secuencia aminoacídica de una serina proteasa alcalina de *Bacillus licheniformis* W10 era muy similar a serina proteasas de varias especies del grupo de *B*

subtilis tales como *B. mojavensis*, *B. subtilis*, *B. atrophaeus*, *B. vallismortis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis* y *B. velezensis*, lo que indicó la conservación de esta enzima en especies de este grupo. Sin embargo, un árbol filogenético reveló que la secuencia de la serina proteasa de *Bacillus licheniformis* W10 estaba más cercanamente relacionada con las secuencias de otras cepas de *B. licheniformis* así como con *B. velezensis* y *B. amyloliquefaciens*.

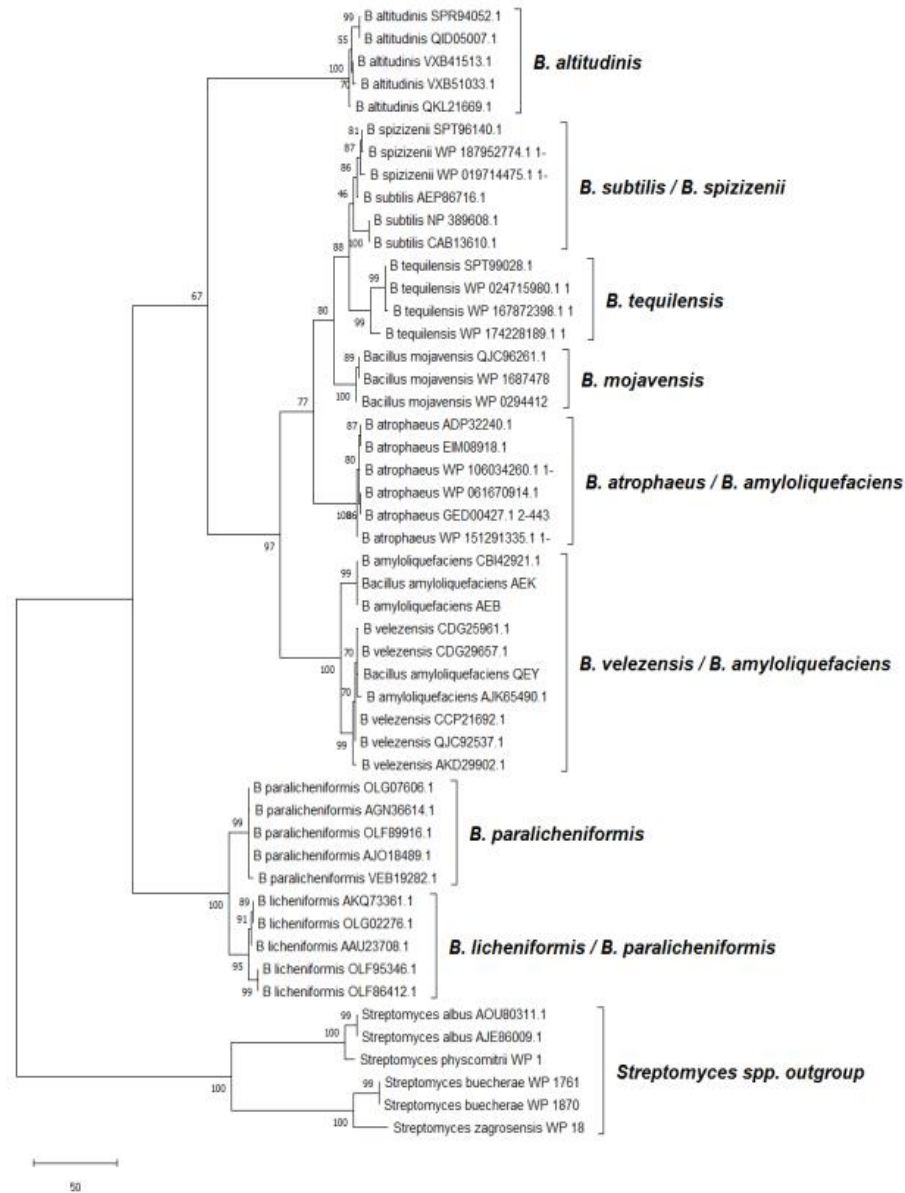


Figura 12. Análisis filogenético molecular basado en secuencias aminoacídicas de la enzima SERINA PROTEASA ALCALINA producida por diferentes especies pertenecientes al grupo de *B. subtilis*. Construido por el método de Máxima Parsimonia con el programa MEGA X con 2000 réplicas de Bootstrap.

Se obtuvo un resultado similar en el trabajo de Mahmoud *et al.* (2021) en donde la secuencia de serina proteasa de *B. subtilis* fue muy similar a la de diferentes especies del grupo de *B. subtilis* pero obtuvo el mayor porcentaje de identidad con una secuencia de *B. subtilis*, lo que también sugiere que esta enzima está relativamente conservada entre especies de este grupo pero aún más entre cepas de una misma especie.

Ya se ha reportado la actividad antifúngica de estas enzimas de *Bacillus* cuyo mecanismo consiste en degradar las proteínas de la pared del hongo, causando lisis celular y posteriormente su muerte. Un ejemplo es el caso de *B. amyloliquefaciens* SP1 aislado de la rizosfera de un árbol de manzana. Esta cepa produjo una proteasa alcalina cuando creció en un medio líquido ajustado a pH 8. Se encontró que el cultivo filtrado libre de células y la enzima purificada generaron un 68.83 % y 24.14 % de inhibición en el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, respectivamente (Guleria *et al.*, 2016). Otro ejemplo es el trabajo de Luo *et al.* (2013) donde la cepa *B. subtilis* N7 aislada de rizosfera de planta de pepino produjo una proteasa alcalina que al ser purificada inhibió la germinación de esporas y el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* cuando se aplicó en una concentración mayor de 25 µg/ml.

7.4 Discusión general

Conocer los modos de acción de los agentes de biocontrol es esencial para el desarrollo de formulaciones comerciales adecuadas y métodos de aplicación eficientes para el control de organismos fitopatógenos de importancia agrícola (Guleria *et al.*, 2016). Con base en esto evaluamos la actividad de cepas de *Bacillus* aisladas de nódulos de mezquite frente a una cepa de *Fusarium oxysporum* previamente aislada como causante de marchitez vascular en plantas de jitomate en invernaderos de Tetela de Ocampo, Puebla. Dicha enfermedad impacta severamente el rendimiento y la calidad de este cultivo (Isaac *et al.*, 2018), el cual es uno de los más importantes para México dado que nuestro país se encuentra entre los principales productores y exportadores de jitomate a nivel mundial (FAOSTAT, 2021).

Los resultados de la evaluación del efecto antifúngico mostraron que las cepas *Bacillus* sp. LEM1004, *Bacillus inaquosus* LEM1085 y *Bacillus cereus* MH778713 son capaces de inhibir significativamente al crecimiento de *Fusarium oxysporum* en el ensayo de cultivo dual, lo cual pudo estar asociado al efecto en conjunto de las enzimas líticas, lipopéptidos antifúngicos, siferóforos y compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas de *Bacillus* como ya se ha reportado en diferentes trabajos (Khan *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2020). En este ensayo también se notó una marcada disminución en la producción de pigmentos en el micelio del hongo en la placa de antagonismo comparado con la placa control. Dado que ya se ha reportado que los VOC's de *Bacillus* han causado un efecto similar en el micelio de *Fusarium oxysporum* y que esto podría contribuir a una disminución en la patogenicidad del hongo (Chaves-Lopez *et al.*, 2015; Liu *et al.*, 2008). Se decidió evaluar la actividad de los VOC's de las cepas de *Bacillus*, encontrando que estos no generaron una inhibición significativa en el crecimiento del hongo, además de que la disminución en la producción de pigmentos del micelio fúngico no fue tan marcada como en el ensayo de cultivo dual, debido posiblemente a la diferencia en el tiempo de

incubación. Posteriormente, debido a que en el ensayo de cultivo dual se obtuvieron efectos inhibitorios significativos y considerando que la producción de enzimas líticas es uno de los principales mecanismos del efecto antifúngico, se realizó un análisis *in silico* de la diversidad de las enzimas líticas de *Bacillus* reportadas en la base de datos de NCBI con las que ya se ha reportado que lleva a cabo el biocontrol de fitopatógenos como *Fusarium oxysporum*.

En el análisis filogenético de enzimas endoquitinasas producidas por el grupo de *B. cereus* se obtuvieron secuencias de alrededor de 674 aminoácidos. Se encontró que estas secuencias mostraron una baja diversidad. Esto coincide con trabajos previos en los que se han descrito endoquitinasas de *Bacillus* con longitud cercana a los 674 aminoácidos que han presentado altos porcentajes de identidad con endoquitinasas producidas por la misma especie o especies relacionadas del grupo de *B. cereus* (Barboza-Corona *et al.*, 2003; Drewnowska *et al.*, 2020; Mehmood *et al.*, 2010).

Para el análisis de las quitobiosidasas producidas por el grupo de *B. cereus* se obtuvieron secuencias de alrededor de 360 aminoácidos. En estas secuencias se encontró una mayor diversidad como lo denotó la ramificación y la agrupación por especie productora que es resultado de la variación existente entre secuencias de especies diferentes y la alta similitud entre cepas de una misma especie. Así mismo, la presencia de *B. cereus* y *B. thuringiensis* en las dos ramas del grupo interno significa que las secuencias de una rama están lejanamente relacionadas a las de la otra rama, lo que significaría mayor diversidad. Ya en trabajos previos se han descrito quitobiosidasas de *Bacillus* de longitud cercana a los 360 aminoácidos (Arora *et al.*, 2003; Drewnowska *et al.*, 2020; Huang & Chen, 2004; Wang *et al.*, 2001) que han presentado altos porcentajes de identidad con quitobiosidasas producidas por la misma especie o muy cercanamente relacionadas como en el caso de *B. cereus* y *B. thuringiensis* reportado por Arora *et al.* (2003).

Con respecto al análisis de las β -N-acetilhexosaminidasas del grupo de *Bacillus subtilis*, las secuencias que obtuvimos tuvieron una longitud de alrededor de 640 aminoácidos y todas ellas presentaron una secuencia patrón altamente conservada característica de las β -N-acetilhexosaminidasas de la familia 3 de las glucosidasas (Litzinger *et al.*, 2010). También se ha reportado que la estructura de estas enzimas está más conservada que sus secuencias (Litzinger *et al.*, 2010), lo que podría explicar la mayor diversidad en sus secuencias que generó la ramificación observada y la agrupación de estas según la especie productora y la variación entre especies diferentes.

En el análisis de las enzimas quitina desacetilasas, se obtuvieron secuencias para el grupo de *B. cereus* y el de *B. subtilis*. Para el grupo de *B. cereus* se obtuvieron secuencias de alrededor de 236 aminoácidos y para el de *B. subtilis* de alrededor de 284 aminoácidos. De igual manera, dentro de cada grupo se observó una alta diversidad denotada por la ramificación de los árboles y la agrupación según la especie productora, además de la notable cercanía de especies altamente relacionadas dentro de los árboles. Todo esto coincidió con lo reportado por Psylinakis *et al.* (2005) acerca de una alta conservación de la secuencia de estas enzimas en especies cercanamente relacionadas filogenéticamente, razón por la que son diferentes las secuencias entre los grupos de *B. cereus* y *B. subtilis*.

Con respecto a análisis de las quitosanasas, en el grupo de *B. cereus* las secuencias analizadas tuvieron una longitud de alrededor de 453 aminoácidos y en el grupo de *B. subtilis* una longitud de alrededor de 280 aminoácidos dado que podrían pertenecer a las familias 8 y 46 de las glucosidasas, respectivamente según la bibliografía (Qin *et al.*, 2018; Su *et al.*, 2006). Desde esta diferencia en la longitud y la familia a la que pertenecen se observa una alta diversidad en estas enzimas producidas por *Bacillus*. Así mismo, en ambos casos se notó una mayor diversidad como lo demostró la topología de ambos árboles en los que la ramificación y en especial el agrupamiento según la especie productora además de la cercanía en el árbol de especies altamente relacionadas. En el caso de las quitosanasas de la familia 8 (GH8) ya se ha reportado que son muy diversas (Lee *et al.*, 2007). Por otra parte, con respecto a las de la familia 46 (GH46), se han reportado trabajos en donde las secuencias están más conservadas dentro de la misma especie (Kang *et al.*, 2021; Heng Li *et al.*, 2015).

En el análisis de las β -1,3-glucanasas del grupo de *B. subtilis*, se obtuvieron secuencias con longitud cercana a los 240 aminoácidos que según la bibliografía podrían pertenecer a la familia 16 de las glucosidasas (Jaafar *et al.*, 2020). En este caso también se observó una alta diversidad como lo denotó la ramificación y agrupación por especie productora. Sin embargo, también se observó que hubo ciertas agrupaciones de especies diferentes por la relación más cercana que existía entre ellas según la secuencia de esta enzima, lo que coincidió con un trabajo reportado por Abraham *et al.* (2013).

En el caso de las enzimas serina proteasa alcalina se obtuvieron secuencias de 397 aminoácidos para el grupo de *B. cereus* y de 440 para el de *B. subtilis*. Esta diferencia en la longitud también denota la alta diversidad de estas enzimas de *Bacillus*. Así mismo, en ambos casos, la topología de los árboles, la agrupación por especie productora y la cercanía en el árbol de especies relacionadas habla de una mayor diversidad de estas enzimas a nivel de secuencias aminoacídicas. Esto coincide con la alta diversidad y funcionalidad que en general se le ha atribuido a las serina proteasas (Di Cera, 2009).

Los resultados de este análisis nos muestran la gran diversidad de enzimas con las que *Bacillus* puede ejercer su actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos y también nos brinda información de cómo es la conservación de estas enzimas dentro del grupo de *B. cereus* y *B. subtilis*. Finalmente, aunque es necesario evaluar más profundamente a estas cepas de *Bacillus* tanto de manera *in vitro* como *in vivo*, estas podrían resultar útiles para su aplicación debido al efecto que presentaron frente a *Fusarium oxysporum* además de la alta diversidad existente en sus enzimas líticas con las que ya se ha reportado que *Bacillus* tiene actividad frente a este y otros hongos fitopatógenos. De igual manera, en estudios previos estas cepas ya han demostrado poseer mecanismos promotores del crecimiento vegetal además de ser buenas candidatas para la restauración de suelos contaminados con metales pesados (Ramírez *et al.*, 2019), lo cual podría contribuir a la protección de la planta de jitomate frente a estos metales de los que ya se ha reportado afectan su desarrollo (Baruah *et al.*, 2019).

8. CONCLUSIONES

Al analizar la actividad antifúngica de cepas de *Bacillus* sp. aisladas de mezquite frente al hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* se encontró que las cepas *Bacillus* sp. LEM1004, *Bacillus inaquosus* LEM1085 y *Bacillus cereus* MH778713 inhibieron significativamente el crecimiento de este hongo en el ensayo de cultivo dual. En cuanto a la actividad de sus compuestos orgánicos volátiles (VOC's) se encontró que estos no inhibieron significativamente el crecimiento de *Fusarium oxysporum*. Sin embargo, estos compuestos podrían estar relacionados con la disminución en la producción de pigmentos observada en el micelio fúngico, lo cual podría contribuir a una disminución en la patogenicidad del hongo favoreciendo así su biocontrol por *Bacillus*. Dados los resultados obtenidos también se analizó la diversidad de enzimas líticas con actividad antifúngica producidas por *Bacillus* encontrando que las quitobiosidasa, β -N-acetilhexosaminidasa, quitina desacetilasa, quitosanasas, β -1,3-glucanasa y serina proteasa alcalina de *Bacillus* analizadas en este trabajo mostraron una alta diversidad a nivel de secuencia aminoacídica, mientras que las endoquitinasas mostraron una baja diversidad. Por todo lo anterior, estas cepas podrían resultar útiles para su aplicación en la protección de la planta de jitomate frente al ataque de este hongo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abbey, J. A., Percival, D., Abbey, Lord, Asiedu, S. K., Prithviraj, B., & Schilder, A. (2019). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*) prospects and challenges. *Biocontrol Science and Technology*, 29(3), 207–228. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1548574>
- Abraham, A., Narayanan, S. P., Philip, S., Nair, D. G., Chandrasekharan, A., & Kochupurackal, J. (2013). In silico characterization of a novel β -1,3-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens* - A bacterial endophyte of *Hevea brasiliensis* antagonistic to *Phytophthora meadii*. *Journal of Molecular Modeling*, 19(3), 999–1007. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1645-3>
- Anderson, A. S., & Wellington, E. M. H. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 797–814. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-797>
- Andreou, A., Giastas, P., Christoforides, E., & Eliopoulos, E. E. (2018). Structural and evolutionary insights within the polysaccharide deacetylase gene family of *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus*. *Genes*, 9(8), 386. <https://doi.org/10.3390/genes9080386>
- Andrić, S., Meyer, T., & Ongena, M. (2020). *Bacillus* responses to plant-associated fungal and bacterial communities. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1350. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01350>
- Araújo, F. D. da S., Araújo, W. L., & Eberlin, M. N. (2017). Potential of *Burkholderia seminalis* TC3.4.2R3 as biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* evaluated by mass spectrometry imaging. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 28(5), 901–907. <https://doi.org/10.1007/s13361-017-1610-6>
- Armenta-Lopez, S. E., Valenzuela-Solano, C., & Hernández-Martínez, R. (2021). Identificación y análisis molecular de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* aisladas de jitomate en Baja California, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 39(2), 266–288. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2103-4>
- Arora, N., Ahmad, T., Rajagopal, R., & Bhatnagar, R. K. (2003). A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(3), 620–625. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(03\)01228-2](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(03)01228-2)
- Ascencio-Alvarez, A., López-Benitez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S. A., Flores-Olivas, A., Jiménez-Díaz, F., & Gámez-Vázquez, A. J. (2008). Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(2), 114–120.
- Avery, S. V., Singleton, I., Magan, N., & Goldman, G. H. (2019). The fungal threat to global food security. *Fungal Biology*, 123(8), 555–557. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.03.006>
- Aydi Ben Abdallah, R., Nefzi, A., Jabnoun-Khiareddine, H., Messaoud, C., Stedel, C., Papadopoulou, K. K., Mokni-Tlili, S., & Daami-Remadi, M. (2016). A putative endophytic *Bacillus cereus* str. S42 from *Nicotiana glauca* for biocontrol of *Fusarium* wilt disease in tomato and gas chromatography-mass spectrometry analysis of its chloroform extract. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 49(13–14), 343–361. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1206727>
- Barboza-Corona, J. E., Nieto-Mazzoco, E., Velázquez-Robledo, R., Salcedo-Hernandez, R., Bautista, M., Jiménez, B., & Ibarra, J. E. (2003). Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 1023–1029. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.2.1023-1029.2003>
- Barratt, B. I. P., Moran, V. C., Bigler, F., & Van Lenteren, J. C. (2018). The status of biological control

- and recommendations for improving uptake for the future. *BioControl*, 63(1), 155–167. <https://doi.org/10.1007/s10526-017-9831-y>
- Baruah, N., Mondal, S. C., Farooq, M., & Gogoi, N. (2019). Influence of heavy metals on seed germination and seedling growth of wheat, pea, and tomato. *Water, Air, and Soil Pollution*, 230(12), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s11270-019-4329-0>
- Baysal, Ö., Lai, D., Xu, H.-H., Siragusa, M., Çalışkan, M., Carimi, F., Teixeira da Silva, J. A., & Tör, M. (2013). A proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* species. *Plos One*, 8(1), e53182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053182>
- Bebber, D. P., & Gurr, S. J. G. (2015). Crop-destroying fungal and oomycete pathogens challenge food security. *Fungal Genetics and Biology*, 74, 62–64. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.10.012>
- Beier, S., & Bertilsson, S. (2013). Bacterial chitin degradation-mechanisms and ecophysiological strategies. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00149>
- Bernal-Ramírez, L. A., Zavala-Hurtado, J. A., Jiménez, M., Cano-Santana, Z., & Fornoni, J. (2019). Los microcosmos de *Prosopis laevigata* albergan una alta diversidad florística en el valle de Zapotitlán, Puebla. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90, 1–14. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2662>
- Bhunja, A. K. (2008). *Bacillus cereus* and *Bacillus anthracis*. In *Foodborne Microbial Pathogens* (pp. 135–148). Springer, New York, NY. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-0-387-74537-4_7
- Buendía-Gonzalez, L., Orozco-Villafuerte, J., Estrada-Zuñiga, M. E., Barrera-Diaz, C. E., Vernon-Carter, E. J., & Cruz-Sosa, F. (2010). Acumulación in vitro de plomo y níquel en plantulas de mezquite (*Prosopis laevigata*). *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 9(1), 1–9.
- Carvalho, F. P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, 6(2), 48–60. <https://doi.org/10.1002/fes3.108>
- Castañeda, E., & Sánchez, L. C. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 14(26), 53–62. <https://doi.org/doi.org/10.22490/24629448.1751>
- Chang, W. T., Chen, C. S., & Wang, S. L. (2003). An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Current Microbiology*, 47(2), 102–108. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3955-7>
- Chang, W. T., Hsieh, C. H., Hsieh, H. S., & Chen, C. (2009). Conversion of crude chitosan to an anti-fungal protease by *Bacillus cereus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(3), 375–382. <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9901-5>
- Chaves-Lopez, C., Serio, A., Gianotti, A., Sacchetti, G., Ndagijimana, M., Ciccarone, C., Stellarini, A., Corsetti, A., & Paparella, A. (2015). Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of Applied Microbiology*, 119(2), 487–499. <https://doi.org/10.1111/jam.12847>
- Cinar, A., & Onbasi, E. (2019). Mycotoxins: The hidden danger in foods. In *Mycotoxins and food safety* (pp. 1–21). IntechOpen. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.89001>
- Contesini, F. J., Melo, R. R., & Sato, H. H. (2017). An overview of *Bacillus* proteases: from production to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 38(3), 321–334. <https://doi.org/10.1080/07388551.2017.1354354>
- Deacon, J. W. (2006). *Fungal Biology* (4th ed.). Blackwell Publishers.
- Dean, R., Van Kan, J., Pretorius, Z., Hammond, K., Di Pietro, A., Spanu, P., Rudd, J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364->

3703.2011.00783.x

- Di Cera, E. (2009). Serine proteases. *IUBMB Life*, 61(5), 510–515. <https://doi.org/10.1002/iub.186>
- Drewnowska, J. M., Fiodor, A., Barboza-Corona, J. E., & Swiecicka, I. (2020). Chitinolytic activity of phylogenetically diverse *Bacillus cereus sensu lato* from natural environments. *Systematic and Applied Microbiology*, 43(3), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2020.126075>
- Droby, S., Wisniewski, M., Teixidó, N., Spadaro, D., & Jijakli, M. H. (2016). The science, development, and commercialization of postharvest biocontrol products. *Postharvest Biology and Technology*, 122, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.04.006>
- Dunlap, C. (2019). Phylogeny and taxonomy of agriculturally important *Bacillus* species. In *Bacilli and agrobiotechnology: Phytostimulation and biocontrol* (pp. 143–150). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-15175-1_8
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Zeigler, D. R. (2020). Promotion of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* and *Bacillus subtilis* subsp. *stercoris* to species status. *Antonie van Leeuwenhoek*, 113(1), 1–12. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01354-9>
- Edel-Hermann, V., & Lecomte, C. (2019). Current status of *Fusarium oxysporum formae speciales* and races. *Phytopathology*, 109(4), 512–530. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-18-0320-RVW>
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 387–400.
- El-Hamshary, O. I. M., Salem, H. H., & Soliman, N. A. (2008). Molecular screening of chitinase gene in *Bacillus* spp. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(9), 1118–1123.
- Elanchezhian, K., Keerthana, U., Nagendran, K., Prabhukarthikeyan, S., Prabakar, K., Raguchander, T., & Karthikeyan, G. (2018). Multifaceted benefits of *Bacillus amyloliquefaciens* strain FBZ24 in the management of wilt disease in tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103, 92–101. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.05.008>
- Eljounaidi, K., Lee, S. K., & Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biological Control*, 103, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.07.013>
- FAO, & OMS. (2019). *Objetivos de desarrollo sostenible*. Inocuidad de los Alimentos, un asunto de todos. <https://www.fao.org/3/ca4449es/ca4449es.pdf>
- FAOSTAT. (2021). *Rankings*. Countries by Commodities. [fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity](https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity)
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Fones, H. N., Bebbler, D. P., Chaloner, T. M., Kay, W. T., Steinberg, G., & Gurr, S. J. (2020). Threats to global food security from emerging fungal and oomycete crop pathogens. *Nature Food*, 1(6), 332–342. <https://doi.org/10.1038/s43016-020-0075-0>
- Ganivet, E. (2020). Growth in human population and consumption both need to be addressed to reach an ecologically sustainable future. *Environment, Development and Sustainability*, 22(6), 4979–4998. <https://doi.org/10.1007/s10668-019-00446-w>
- Garcia, S. N., Osburn, B. I., & Jay-Russell, M. T. (2020). One health for food safety, food security, and sustainable food production. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2020.00001>
- Goodfellow, M., Chairman, P. K., Chairman, V., De Vos, P., Rainey, F. A., Schleifer, K. H., & Whitman, W. B. (2009). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 3 - *The Firmicutes* (Second).

- Springer, New York, NY. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-0-387-68489-5>
- Gow, N. A. R., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: Structure, biosynthesis, and function. *Microbiology Spectrum*, 5(3), 267–292. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch12>
- Guleria, S., Walia, A., Chauhan, A., & Shirkot, C. K. (2016). Molecular characterization of alkaline protease of *Bacillus amyloliquefaciens* SP1 involved in biocontrol of *Fusarium oxysporum*. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.030>
- Gupta, V., Kumar, K., Fatima, K., Razdan, V. K., Sharma, B. C., Mahajan, V., Rai, P. K., Sharma, A., Gupta, V., Hassan, M. G. M., & Hussain, R. (2020). Role of biocontrol agents in management of corm rot of saffron caused by *Fusarium oxysporum*. *Agronomy*, 10(9), 1–12. <https://doi.org/10.3390/agronomy10091398>
- Hafiz, M. F., & Ma, L. (2021). Effect of chromium on seed germination, early seedling growth and chromium accumulation in tomato genotypes. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43(7), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11738-021-03267-5>
- Hartig, S. M. (2013). Basic image analysis and manipulation in imageJ. *Current Protocols in Molecular Biology*, 102, 14.15.1–14.15.12. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1415s102>
- Hernández, R., López, A., Borrego, F., Espinoza, J., Sánchez, D., Maldonado, I., & López, L. (2018). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7), 1169–1178. <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i7.838>
- Hu, K., Yang, H., Liu, G., & Tan, H. (2006). Identification and characterization of a polysaccharide deacetylase gene from *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(10), 935–941. <https://doi.org/10.1139/W06-045>
- Huang, C. J., & Chen, C. Y. (2004). Gene cloning and biochemical characterization of chitinase CH from *Bacillus cereus* 28-9. *Annals of Microbiology*, 54(3), 289–297.
- Isaac, M. R., Leyva-Mir, S. G., Sahagún-Castellanos, J., Câmara-Correia, K., Tovar-Pedraza, J. M., & Rodríguez-Pérez, J. E. (2018). Occurrence, identification, and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with tomato wilt in Mexico. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 46(2), 484–493. <https://doi.org/10.15835/nbha46211095>
- Islam, M. A., Nain, Z., Alam, M. K., Banu, N. A., & Islam, M. R. (2018). In vitro study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0097-1>
- Islam, M. R., Jeong, Y. T., Lee, Y. S., & Song, C. H. (2012). Isolation and identification of antifungal compounds from *Bacillus subtilis* C9 inhibiting the growth of plant pathogenic fungi. *Mycobiology*, 40(1), 59–66. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2012.40.1.059>
- Jaafar, N. R., Khoiri, N. M., Ismail, N. F., Mahmood, N. A. N., Abdul Murad, A. M., Abu Bakar, F. D., Mat Yajit, N. L., & Illias, R. M. (2020). Functional characterisation and product specificity of endo- β -1,3-glucanase from alkalophilic bacterium, *Bacillus lehensis* G1. *Enzyme and Microbial Technology*, 140, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.enzymictec.2020.109625>
- Janahiraman, V., Anandham, R., Kwon, S. W., Sundaram, S., Pandi, V. K., Krishnamoorthy, R., Kim, K., Samaddar, S., & Sa, T. (2016). Control of wilt and rot pathogens of tomato by antagonistic pink pigmented facultative methylotrophic *Delftia lacustris* and *Bacillus* spp. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01626>
- Jang, H. k., Hyoung, Y. J., Kim, J. T., Lee, K. E., & Choi, S. G. (2003). Purification, characterization, and gene cloning of chitosanase from *Bacillus cereus* H-1. *Korea Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(3), 216–223.
- Jangir, M., Pathak, R., Sharma, S., & Sharma, S. (2018). Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp.,

- isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biological Control*, 123, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.04.018>
- Ji, Z. L., Peng, S., Chen, L. L., Liu, Y., Yan, C., & Zhu, F. (2020). Identification and characterization of a serine protease from *Bacillus licheniformis* W10: A potential antifungal agent. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 594–603. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.216>
- Kamali, M., Ahmadi, J., Naeimi, S., & Guo, D. (2019). Characterization of *Bacillus* isolates from the rhizosphere of tomato suppressing *Fusarium* wilt disease. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 54(1), 53–68. <https://doi.org/10.1556/038.54.2019.006>
- Kang, B. R., Song, Y. S., & Jung, W. J. (2021). Differential expression of bio-active metabolites produced by chitosan polymers-based *Bacillus amyloliquefaciens* fermentation. *Carbohydrate Polymers*, 260, 117799. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117799>
- Kapli, P., Yang, Z., & Telford, M. J. (2020). Phylogenetic tree building in the genomic age. *Nature Reviews Genetics*, 21(7), 428–444. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0233-0>
- Khan, M. U., Sessitsch, A., Harris, M., Fatima, K., Imran, A., Arslan, M., Shabir, G., Khan, Q. M., & Afzal, M. (2015). Cr-resistant rhizo- and endophytic bacteria associated with *Prosopis juliflora* and their potential as phytoremediation enhancing agents in metal-degraded soils. *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00755>
- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Sanders, E. R., Kaplan, D., & Hirsch, A. M. (2018). Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>
- Kimura, S., & Sinha, N. (2008). Tomato (*Solanum lycopersicum*): A model fruit-bearing crop. *Cold Spring Harbor Protocols*, 3(11), 1–9. <https://doi.org/10.1101/pdb.emo105>
- Köhl, J., Kolnaar, R., & Ravensberg, W. J. (2019). Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kurakake, M., Amai, Y., Konishi, M., & Ikehira, K. (2018). Characteristics of an β -N-acetylhexosaminidase from *Bacillus* sp. CH11, including its transglycosylation activity. *Journal of Food Science*, 83(5), 1208–1214. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14125>
- Law, J. W. F., Ser, H. L., Khan, T. M., Chuah, L. H., Pusparajah, P., Chan, K. G., Goh, B. H., & Lee, L. H. (2017). The potential of *Streptomyces* as biocontrol agents against the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* (*Pyricularia oryzae*). *Frontiers in Microbiology*, 8(3), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00003>
- Le Mire, G., Nguyen, M. L., Fassotte, B., Du Jardin, P., Verheggen, F., Delaplace, P., & J., H. (2016). Implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. A review. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, 20(S1), 299–313. <https://doi.org/DOI: 10.25518/1780-4507.12717>
- Lee, H. S., Jang, J. S., Choi, S. K., Lee, D. W., Kim, E. J., Jung, H. C., & Pan, J. G. (2007). Identification and expression of GH-8 family chitosanases from several *Bacillus thuringiensis* subspecies. *FEMS Microbiology Letters*, 277(2), 133–141. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00944.x>
- Lee, T., Park, D., Kim, K., Lim, S. M., Yu, N. H., Kim, S., Kim, H. Y., Jung, K. S., Jang, J. Y., Park, J. C., Ham, H., Lee, S., Hong, S. K., & Kim, J. C. (2017). Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* DA12 showing potent antifungal activity against mycotoxigenic *Fusarium* species. *The Plant*

- Pathology Journal*, 33(5), 499–507. <https://doi.org/10.5423/PPJ.FT.06.2017.0126>
- Li, B., Li, Q., Xu, Z., Zhang, N., Shen, Q., & Zhang, R. (2014). Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in Microbiology*, 5, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00636>
- Li, Heng, Fei, Z., Gong, J., Yang, T., Xu, Z., & Shi, J. (2015). Screening and characterization of a highly active chitosanase based on metagenomic technology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 111, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.11.005>
- Li, Hui, Guan, Y., Dong, Y., Zhao, L., Rong, S., Chen, W., Lv, M., Xu, H., Gao, X., Chen, R., Li, L., & Xu, Z. (2018). Isolation and evaluation of endophytic *Bacillus tequilensis* GYLH001 with potential application for biological control of *Magnaporthe oryzae*. *Plos One*, 13(10), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203505>
- Liang, T. W., Chen, W. T., Lin, Z. H., Kuo, Y. H., Nguyen, A. D., Pan, P. S., & Wang, S. L. (2016). An amphiprotic novel chitosanase from *Bacillus mycoides* and its application in the production of chitooligomers with their antioxidant and anti-inflammatory evaluation. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms17081302>
- Lim, S. M., Yoon, M. Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., Park, H. W., Yu, N. H., Kim, Y. H., & Kim, J. C. (2017). Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal*, 33(5), 488–498. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073>
- Litzinger, S., Fischer, S., Polzer, P., Diederichs, K., Welte, W., & Mayer, C. (2010). Structural and kinetic analysis of *Bacillus subtilis* N- acetylglucosaminidase reveals a unique Asp-His dyad mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 285(46), 35675–35684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.131037>
- Liu, W., Mu, W., Zhu, B., Du, Y., & Liu, F. (2008). Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. *Agricultural Sciences in China*, 7(9), 1104–1114. [https://doi.org/10.1016/S1671-2927\(08\)60153-4](https://doi.org/10.1016/S1671-2927(08)60153-4)
- Liu, Y., Teng, K., Wang, T., Dong, E., Zhang, M., Tao, Y., & Zhong, J. (2020). Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize. *Journal of Applied Microbiology*, 128(1), 242–254. <https://doi.org/10.1111/jam.14459>
- Luo, Y., Sun, L., Zhu, Z., Ran, W., & Shen, Q. (2013). Identification and characterization of an anti-fungi *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerium* protease from the *Bacillus subtilis* strain N7. *Journal of Microbiology*, 51(3), 359–366. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-2627-6>
- Lyngwi, N. A., & Joshi, S. R. (2014). Economically important *Bacillus* and related genera : a mini review. In *Biology of useful plants and microbes* (pp. 33–43). Narosa Publishing House.
- Mahmoud, A., Kotb, E., Alqosaibi, A. I., Al-Karmalawy, A. A., Al-Dhuayan, I. S., & Alabkari, H. (2021). *In vitro* and *in silico* characterization of alkaline serine protease from *Bacillus subtilis* D9 recovered from Saudi Arabia. *Heliyon*, 7, e08148. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08148>
- Mami, Y., Ahmadi, G., Shahmoradi, M., & Ghorbani, H. R. (2011). Influence of different concentration of heavy metals on the seed germination and growth of tomato. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 5(6), 420–426. <http://www.academicjournals.org/AJEST>
- Matzen, N., Heick, T. M., & Jørgensen, L. N. (2019). Control of powdery mildew (*Blumeria graminis* spp.) in cereals by Serenade® ASO (*Bacillus amyloliquefaciens* (former *subtilis*) strain QST 713). *Biological Control*, 139, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104067>
- McDonald, B. A., & Stukenbrock, E. H. (2016). Rapid emergence of pathogens in agro-ecosystems: global threats to agricultural sustainability and food security. *Philosophical Transactions of the*

- Royal Society B: Biological Sciences*, 371(1709), 1–9. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0026>
- Mehmood, M. A., Xiao, X., Hafeez, F. Y., Gai, Y., & Wang, F. (2010). Molecular characterization of an endochitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *konkukian*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(12), 2171–2178. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0401-z>
- Mohkam, M., Nezafat, N., Berenjian, A., Mobasher, M. A., & Ghasemi, Y. (2016). Identification of *Bacillus* probiotics isolated from soil rhizosphere using 16S rRNA, *recA*, *rpoB* gene sequencing and RAPD-PCR. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(1), 8–18. <https://doi.org/10.1007/s12602-016-9208-z>
- Moriyama, R., Sugimoto, K., Zhang, H., Inoue, T., & Makino, S. (1998). A cysteine-dependent serine protease associated with the dormant spores of *Bacillus cereus*: Purification of the protein and cloning of the corresponding gene. In *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (Vol. 62, Issue 2, pp. 268–274). <https://doi.org/10.1271/bbb.62.268>
- Morris, C. E., & Moury, B. (2019). Revisiting the concept of host range of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 63–90. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718-100034>
- Naciones Unidas. (2019). *Department of Economic and Social Affairs. Population Division. World Population Prospects 2019, Highlights*. https://population.un.org/wpp/Publications/Files/WPP2019_Highlights.pdf
- Nayak, A. K., Panda, S. S., Basu, A., & Dhal, N. K. (2018). Enhancement of toxic Cr (VI), Fe, and other heavy metals phytoremediation by the synergistic combination of native *Bacillus cereus* strain and *Vetiveria zizanioides* L. *International Journal of Phytoremediation*, 20(7), 682–691. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1413332>
- Nazir, N., Bilal, S., Bhat, K. A., Shah, T. A., Badri, Z. A., Bhat, F. A., Wani, T. A., Parveen, S., Mugal, M. N., & Dorjey, S. (2018). Effect of climate change on plant diseases. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7(6), 250–256. <https://doi.org/https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.706.030>
- Oztopuz, O., Sarigul, N., Liaqat, F., Park, R. D., & Eltem, R. (2019). Chitinolytic *Bacillus subtilis* Ege-B-1.19 as a biocontrol agent against mycotoxigenic and phytopathogenic fungi. *Turkish Journal of Biochemistry*, 44(3), 323–331. <https://doi.org/10.1515/tjb-2018-0144>
- Palacios, A., Rodríguez, R., Hernández, M. de la L., Jimenez, E., & Tirado, D. (2017). Distribución potencial de *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston basada en un modelo de nicho ecológico. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 7(34), 35–46. <https://doi.org/10.29298/rmcf.v7i34.81>
- Palacios, R. A. (2006). Los mezquites mexicanos: biodiversidad y distribución geográfica. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, 41(1–2), 99–121.
- 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), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules26071863>
- Pérez, G., Tamariz, V., López, L., Hernandez, F., Castelán, R., Morán, J. L., García, W. A., Díaz, A., & Handal, A. (2018). Atoyac River pollution in the metropolitan area of Puebla, México. *Water*, 10(3), 1–17. <https://doi.org/10.3390/w10030267>
- Pleban, S., Chernin, L., & Chet, I. (1997). Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. *Letters in Applied Microbiology*, 25(4), 284–288. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00224.x>
- Prosekov, A. Y., & Ivanova, S. A. (2018). Food security: The challenge of the present. *Geoforum*, 91, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.geoforum.2018.02.030>
- Psylinakis, E., Boneca, I. G., Mavromatis, K., Deli, A., Hayhurst, E., Foster, S. J., Vårum, K. M., & Bouriotis, V. (2005). Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylases from *Bacillus cereus*,

- highly conserved proteins in *Bacillus anthracis*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(35), 30856–30863. <https://doi.org/10.1074/jbc.M407426200>
- Qin, Z., Luo, S., Li, Y., Chen, Q., Qiu, Y., Zhao, L., Jiang, L., & Zhou, J. (2018). Biochemical properties of a novel chitosanase from *Bacillus amyloliquefaciens* and its use in membrane reactor. *LWT - Food Science and Technology*, 97, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.027>
- Quinet, M., Angosto, T., Yuste-Lisbona, F. J., Blanchard-Gros, R., Bigot, S., Martinez, J. P., & Lutts, S. (2019). Tomato fruit development and metabolism. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–23. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01554>
- Ramírez, V., Baez, A., López, P., Bustillos, R., Villalobos, M. Á., Carreño, R., Contreras, J. L., Muñoz-Rojas, J., Fuentes, L. E., Martínez, J., & Munive, J. A. (2019). Chromium hyper-tolerant *Bacillus* sp. MH778713 assists phytoremediation of heavy metals by Mesquite trees (*Prosopis laevigata*). *Frontiers in Microbiology*, 10, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01833>
- Ramírez, V., Martínez, J., Bustillos-Cristales, M. del R., Catañeda-Antonio, D., Munive, J. A., & Baez, A. (2021). *Bacillus cereus* MH778713 elicits tomato plant protection against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, 1–13. <https://doi.org/10.1111/jam.15179>
- Ramírez, V., Munive, J. A., Cortes, L., Muñoz-Rojas, J., Portillo, R., & Baez, A. (2020). Long-chain hydrocarbons (C21, C24, and C31) released by *Bacillus* sp. MH778713 break dormancy of Mesquite seeds subjected to chromium stress. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00741>
- Ramyabharathi, S. A., & Raguchander, T. (2014). Mode of action of *Bacillus subtilis* EPCO16 against tomato *Fusarium wilt*. *Biochemical and Cellular Archives*, 14(1), 47–50.
- Rana, A., Sahgal, M., & Johri, B. N. (2017). *Fusarium oxysporum*: Genomics, diversity and plant-host interaction. In *Developments in fungal biology and applied mycology* (pp. 159–199). Springer, Singapore. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-981-10-4768-8_10
- Rathore, A. S., & Gupta, R. D. (2015). Chitinases from bacteria to human: properties, applications, and future perspectives. *Enzyme Research*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2015/791907>
- Razzaq, A., Shamsi, S., Ali, A., Ali, Q., Sajjad, M., Malik, A., & Ashraf, M. (2019). Microbial proteases applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00110>
- Reiss, A., & Jørgensen, L. (2017). Biological control of yellow rust of wheat (*Puccinia striiformis*) with Serenade®ASO (*Bacillus subtilis* strain QST713). *Crop Protection*, 93, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.009>
- Rodríguez, E. N., Rojo, G. E., Ramírez, B., Martínez, R., Cong, M., Medina, S. M., & Piña, H. H. (2014). Análisis técnico del árbol del mezquite (*Prosopis laevigata* Humb. & Bonpl. ex Willd.) en México. *Ra Ximhai*, 10(3), 173–193. <https://doi.org/10.35197/rx.10.01.e.2014.13.er>
- SADER. (2017). *Gobierno de México*. Planeación Agrícola Naional 2017-2030. Jitomate Mexicano. <https://www.gob.mx/agricultura/acciones-y-programas/planeacion-agricola-nacional-2017-2030-126813>
- Sakai, K., Narihara, M., Kasama, Y., Wakayama, M., & Moriguchi, M. (1994). Purification and characterization of thermostable β -N-acetylhexosaminidase of *Bacillus stearothermophilus* CH-4 isolated from chitin-containing compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(8), 2911–2915. <https://doi.org/10.1128/aem.60.8.2911-2915.1994>
- Sarwar, A., Brader, G., Corretto, E., Aleti, G., Abaidullah, M., Sessitsch, A., & Hafeez, F. Y. (2018). Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. *Plos One*, 13(6), 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198107.g002>
- Savary, S., & Willocquet, L. (2020). Modeling the impact of crop diseases on global food security. *Annual Review of Phytopathology*, 58, 313–341. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-010820-012856>

- Sawicka, B. (2019). Post-harvest losses of agricultural produce. In W. Filho, A. Azul, L. Brandli, P. Özuyar, & T. Wall (Eds.), *Zero Hunger. Encyclopedia of the UN sustainable development goals* (pp. 654–669). Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-69626-3_40-1
- Schoffemeer, E. A. M., Klis, F. M., Sietsma, J. H., & Cornelissen, B. J. C. (1999). The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*, 27(2–3), 275–282. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1153>
- Shackleton, R., Le Maitre, D. C., Pasiecznik, N. M., & Richardson, D. M. (2014). *Prosopis*: A global assessment of the biogeography, benefits, impacts and management of one of the world's worst woody invasive plant taxa. *AoB Plants*, 6, 1–18. <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu027>
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(3), 446–459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Shahzad, R., Khan, A. L., Bilal, S., Asaf, S., & Lee, I. J. (2017). Plant growth-promoting endophytic bacteria versus pathogenic infections: An example of *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. *PeerJ*, 5, 1–21. <https://doi.org/10.7717/peerj.3107>
- Shanmugam, V., Atri, K., Gupta, S., Kanoujia, N., & Naruka, D. S. (2011). Selection and differentiation of *Bacillus* spp. antagonistic to *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* and *Alternaria solani* infecting tomato. *Folia Microbiologica*, 56(2), 170–177. <https://doi.org/10.1007/s12223-011-0031-3>
- Shi, C., Yan, P., Li, J., Wu, H., Li, Q., & Guan, S. (2014). Biocontrol of *Fusarium graminearum* growth and deoxynivalenol production in wheat kernels with bacterial antagonists. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(1), 1094–1105. <https://doi.org/10.3390/ijerph110101094>
- Slámová, K., Bojarová, P., Petrásková, L., & Křen, V. (2010). B-N-acetylhexosaminidase: What's in a name...? *Biotechnology Advances*, 28(6), 682–693. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.04.004>
- Stenberg, J. A. (2017). A conceptual framework for integrated pest management. *Trends in Plant Science*, 22(9), 759–769. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.06.010>
- Su, C., Wang, D., Yao, L., & Yu, Z. (2006). Purification, characterization, and gene cloning of a chitosanase from *Bacillus* species strain S65. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4208–4214. <https://doi.org/10.1021/jf0600556>
- Syed Ab Rahman, S. F., Singh, E., Pieterse, C. M. J., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
- Tan, Y., & Donovan, W. P. (2000). Deletion of *aprA* and *nprA* genes for alkaline protease A and neutral protease A from *Bacillus thuringiensis*: Effect on insecticidal crystal proteins. *Journal of Biotechnology*, 84(1), 67–72. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00328-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00328-X)
- Tchounwou, P. B., Yedjou, C. G., Patlolla, A. K., & Sutton, D. J. (2012). Heavy metals toxicity and the environment. *Experientia Supplementum*, 101, 133–164. https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4_6
- Tomita, M., Kikuchi, A., Kobayashi, M., Yamaguchi, M., Ifuku, S., Yamashoji, S., Ando, A., & Saito, A. (2013). Characterization of antifungal activity of the GH-46 subclass III chitosanase from *Bacillus circulans* MH-K1. *Antonie van Leeuwenhoek*, 104(5), 737–748. <https://doi.org/10.1007/s10482-013-9982-5>
- Vásquez-Méndez, R., Ventura-Ramos, E., Oleschko, K., Hernández-Sandoval, L., Parrot, J. F., & Nearing, M. A. (2010). Soil erosion and runoff in different vegetation patches from semiarid central Mexico. *Catena*, 80(3), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2009.11.003>

- Veliz, E. A., Martínez-Hidalgo, P., & Hirsch, A. M. (2017). Chitinase-producing bacteria and their role in biocontrol. *AIMS Microbiology*, 3(3), 689–705. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2017.3.689>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., PARRA-Cota, 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*, 36(1), 95–130. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Wang, M., Zheng, F., Wang, T., Lyu, Y. M., Alteen, M. G., Cai, Z. P., Cui, Z. L., Liu, L., & Voglmeir, J. (2019). Characterization of *Stackebrandtia nassauensis* GH 20 beta-hexosaminidase, a versatile biocatalyst for chitobiose degradation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms20051243>
- Wang, S. Y., Moyne, A. L., Thottappilly, G., Wu, S. J., Locy, R. D., & Singh, N. K. (2001). Purification and characterization of a *Bacillus cereus* exochitinase. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(6), 492–498. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(00\)00362-8](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(00)00362-8)
- Wu, G., Liu, Y., Xu, Y., Zhang, G., Shen, Q., & Zhang, R. (2018). Exploring elicitors of the beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to induce plant systemic resistance and their interactions with plant signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31(5), 560–567. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0273-R>
- Wu, Y., Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., & Huang, Q. (2014). Biocontrol traits and antagonistic potential of *Bacillus amyloliquefaciens* strain NJZJSB3 against *Sclerotinia sclerotiorum*, a causal agent of canola stem rot. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(10), 1327–1336. <https://doi.org/10.4014/jmb.1402.02061>
- Yu, S., Teng, C., Bai, X., Liang, J., Song, T., Dong, L., Jin, Y., & Qu, J. (2017). Optimization of siderophore production by *Bacillus* sp. PZ-1 and its potential enhancement of phytoextraction of Pb from soil. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8), 1500–1512. <https://doi.org/10.4014/jmb.1705.05021>
- Zhang, W. (2018). Global pesticide use: Profile, trend, cost/benefit and more. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 8(1), 1–27.
- Zohora, U. S., Ano, T., & Rahman, M. S. (2016). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* K1 by iturin a producer *Bacillus subtilis* RB14 seed treatment in tomato plants. *Advances in Microbiology*, 6, 424–431. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4236/aim.2016.66042>