



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

“Análisis de la interacción de compuestos orgánicos producidos por *Bacillus velezensis* frente a hongos fitopatógenos (*Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*)”

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIATURA EN QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p.Q.F.B. Angelina Palomino García

DIRECTOR DE TESIS:

D.C Verónica Liliana Ramírez Falcón

ASESOR DE TESIS:

D.C José Antonio Munive Hernández

PUEBLA, PUE.

MARZO, 2023

INDICE

Resumen.....	5
1. Introducción.....	6
1.1 Bacterias promotoras del crecimiento.....	6
1.2 Biocontrol	6
1.2.1 Bacterias usadas en Biocontrol	8
1.2.2 <i>Bacillus velezensis</i> como herramienta de biocontrol.....	8
1.3 Hongos fitopatógenos.....	9
1.3.1 <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Fusarium fujikuroi</i>	10
1.3.2 <i>Alternaria alternata</i>	10
1.4 Efectos fungicidas.....	11
2. Antecedentes.....	12
3. Justificación.....	14
4. Objetivos.....	15
4.1 Objetivo General.....	15
4.2 Objetivos Específicos.....	15
5. Diagrama de trabajo.....	16
6. Material y métodos.....	21
6.1 Material.....	21
6.2 Material biológico.....	21
6.3 Equipos.....	22
6.4 Métodos.....	22
7. Metodología.....	23
7.1 Conservación de las cepas.....	23
7.1.1 Para bacterias.....	23
7.1.2 Para hongos.....	23
7.2 Prueba de inhibición en cultivo dual.....	23
7.3 Prueba de inhibición por compuestos orgánicos volátiles (VOC's).....	23
7.4 Prueba de inhibición por extractos orgánicos.....	24
7.5 Determinación de la promoción de la germinación.....	24
7.6 Detección de surfactantes producidos por <i>B. velezensis</i> LEM1054.....	25

8. Resultados y discusión.....	26
8.1 Prueba de inhibición en cultivo dual.....	26
8.2 Prueba de inhibición por compuestos orgánicos volátiles (VOC's).....	30
8.3 Prueba de inhibición por extractos orgánicos.....	34
8.4 Determinación de la promoción de la germinación.....	36
8.5 Detección de surfactantes producidos por <i>B. velezensis</i> LEM1054.....	39
9. Conclusión.....	41
10. Bibliografía.....	42
11. Anexos.....	50
11.1 Anexo 1.....	50
11.2 Anexo 2.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prueba de inhibición dual con <i>Alternaria alternata</i> CENAGRO3 durante 1, 2 y 3 semanas.....	26
Tabla 2. Prueba de inhibición dual con <i>Fusarium oxysporum</i> CENAGRO1 durante 1, 2 y 3 semanas.....	27
Tabla 3. Prueba de inhibición dual con <i>Fusarium fujikuroi</i> CENAGRO2 durante 1, 2 y 3 semanas.....	28
Tabla 4. Prueba de volátiles en <i>Fusarium oxysporum</i> CENAGRO1 a los 7 y 14 días de incubación.....	30
Tabla 5. Prueba de volátiles en <i>Fusarium fujikuroi</i> CENAGRO2 a los 10 y 14 días de incubación.....	31
Tabla 6. Prueba de volátiles en <i>Alternaria alternata</i> CENAGRO3 a los 14 y 20 días de incubación.....	32
Tabla 7. Prueba de inhibición contra <i>Fusarium oxysporum</i> CENAGRO1, <i>Fusarium fujikuroi</i> CENAGRO2 y <i>Alternaria alternata</i> CENAGRO3 utilizando fluconazol, extracto de <i>B. velezensis</i> LEM1054 con cloroformo, cloroformo y control negativo.....	34

Tabla 8. Promedio de diámetros de crecimiento de los hongos fitopatógenos (<i>Fusarium oxysporum</i> CENAGRO1, <i>Fusarium fujikuroi</i> CENAGRO2 y <i>Alternaria alternata</i> CENAGRO3) al ser expuestos con compuestos como cloroformo, fluconazol y extracto de cloroformo con <i>B. velezensis</i> LEM1054 incubados por 4 días.....	35
Tabla 9. Germinaciones obtenidas en las semillas de jitomate al ser inoculadas con las bacterias de estudio e infectadas con los hongos fitopatógenos, en cada condición se utilizaron 30 semillas.....	36
Tabla 10. Promedios y varianzas obtenidos de las semillas al ser expuestas con <i>Alternaria alternata</i> CENAGRO3 y una bacteria.....	50
Tabla 11. Análisis de varianza en semillas infectadas de <i>Alternaria alternata</i>	50
Tabla 12. Promedios y varianzas obtenidos de las semillas al ser expuestas con <i>Fusarium fujikuroi</i> CENAGRO2 y una bacteria.....	51
Tabla 13. Análisis de varianza en semillas infectadas de <i>Fusarium fujikuroi</i>	51
Tabla 14. Promedios y varianzas obtenidos de las semillas al ser expuestas con <i>Fusarium oxysporum</i> y una bacteria.....	51
Tabla 15. Análisis de varianza en semillas infectadas de <i>Fusarium oxysporum</i>	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de trabajo.....	16
Figura 2. Diagrama de microorganismos a conservar.....	16
Figura 3. Diagrama de trabajo para la prueba de inhibición por compuestos orgánicos volátiles (VOC's).....	17
Figura 4. Diagrama de trabajo para la prueba de inhibición en cultivo dual.....	18
Figura 5. Diagrama de trabajo para prueba de inhibición por extractos orgánicos.....	19
Figura 6. Diagrama de trabajo para la prueba de determinación de la promoción de la germinación.....	20
Figura 7. Diagrama de trabajo para la prueba de detección de surfactantes producidos por <i>B. velezensis</i> LEM1054.....	21

Figura 8. Prueba de detección de biosurfactantes utilizando 15, 30, 50 y 85 μ l de glicerol agregando la misma cantidad de sobrenadante con y sin *B. velezensis* LEM1054, agua y caldo YM modificado.....39

ÍNDICE DE GRAFICAS

Grafica 1. Promoción de la germinación con *Alternaria alternata*.....37

Grafica 2. Promoción de la germinación con *Fusarium fujikuroi*.....37

Grafica 3. Promoción de la germinación con *Fusarium oxysporum*.....38

RESUMEN

El jitomate (*Solanum lycopersicum* var. *esculentum*) es uno de los frutos de mayor consumo a nivel mundial. México es uno de los principales países exportadores de este producto en el mundo, por lo que los daños ocasionados en los cultivos de jitomate por la presencia de hongos fitopatógenos como *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata* ocasiona importantes pérdidas económicas al sector agrícola. La aplicación de técnicas biotecnológicas, obtenidos de la naturaleza, como la utilización de microorganismos como *Bacillus velezensis*, favorecen la disminución de riesgos y nos da una nueva alternativa utilizando los recursos de la naturaleza disminuyendo el uso de químicos dañinos. En este proyecto se realizó la investigación del efecto inhibitorio de *Bacillus velezensis* contra los hongos fitopatógenos *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*, en el cual se aprecia efectos inhibitorios por parte de la bacteria. Estos efectos inhibitorios se estudiaron por pruebas de inhibición en cultivo dual e inhibición por compuestos volátiles donde se observa efectos inhibitorios que se efectuaron por diversos mecanismos como la liberación de metabolitos secundarios, así como la presencia de enzimas y compuestos volátiles. También se estudió su efecto inhibitorio en semillas de jitomate (*Solanum lycopersicum* var. *esculentum*) en el cual se observan efectos inhibitorios, además de que también favorecen la promoción de la germinación debido a la liberación de compuestos como el ácido ftálico. En la prueba de inhibición por extractos orgánicos con cloroformo como solvente, se observó un posible efecto inhibitorio más no eficaz para aplicarlo a futuro por lo que se debe buscar un método de promoción de la inhibición con extractos. Finalmente, por el método del colapso de gota se determinó que la presencia de compuestos surfactantes es uno de los causantes de la inhibición de hongos fitopatógenos al degradar su membrana celular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Bacterias promotoras del crecimiento

Las bacterias promotoras del crecimiento en plantas son aquellas que tienen la capacidad de liberar compuestos, ya sean volátiles o no volátiles, que favorecen el desarrollo de una planta, otorgándoles diversas capacidades, entre ellas, una de las que destaca, es la inhibición de fitopatógenos por la liberación de dichos compuestos orgánicos (Lee *et al.*, 2012; Park *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2008). Se ha observado que las especies del género *Bacillus* sp. que son extraídas del suelo ayudan a las plantas en desarrollo a mejorar su crecimiento, dándoles protección contra hongos fitopatógenos (Wang *et al.*, 2013; Ryu *et al.*, 2004); así como para favorecer la obtención de nutrientes (Park *et al.*, 2013). Se han estudiado diversas especies de este género y se ha observado que presentan la producción de compuestos volátiles necesarios para inhibir agentes fitopatógenos, favoreciendo la germinación de semillas que fueron infectados con hongos (Gao *et al.*, 2018; Gotor-Vila *et al.*, 2017; Islam *et al.*, 2012) y se ha logrado observar que dicho efecto fue tan favorable como si las semillas no se hubiesen infectado con dicho fitopatógeno, por lo que la utilización de bacterias del género *Bacillus* sp. como promotoras de crecimiento de plantas podría ser un método de biocontrol favorable en los cultivos (Ramírez *et al.*, 2021), sustituyendo a aquellos fungicidas químicos que generan efectos negativos a nivel ambiental, dañando la calidad del cultivo así como el ambiente en donde es sembrado, así como la salud del consumidor de la fruta u hortaliza que se obtiene de dicha planta tratada con dicho fungicida químico (Ramírez *et al.*, 2021).

1.2 Biocontrol

El biocontrol o control biológico es un método de control de plagas en el cual se hace uso de organismos que tienen la capacidad de crear un efecto antagónico que impide el crecimiento o aparición de organismos que generen el daño o la muerte de algún ser vivo (Gardener y Fravel, 2002; Ippolito y Nigro, 2000). Este organismo biocontrol deberá ser lo suficientemente eficaz como para evitar la aparición del patógeno, así como para no generar contaminación en el ambiente, daños en la salud, o alteraciones en el organismo donde se aplique el biocontrol; cabe destacar que el uso de estos métodos deben de ser utilizados como una nueva alternativa que reemplace el uso de compuestos químicos y que sea igual o más eficientes que estos (Ulloa-Ogaz *et al.*, 2015; de la Fuente *et al.*, 2002, Hernández *et al.*, 2007).

Durante muchos años se han registrado casos de epidemias causadas por fitopatógenos que afectaron diversos cultivos como papa o maíz dulce, y en su momento no se supieron tratar adecuadamente (Ivanoff y Keitt, 1937; Bourke 1964). Con el paso del tiempo se implementó el uso de pesticidas químicos que al principio parecían ser una solución rápida con buenos resultados, siendo utilizados de manera desmedida en el campo, pero con el tiempo se descubrió los graves efectos negativos que generaban en el medio ambiente como la infertilidad de los suelos y en la salud de las personas, principalmente en las personas que trabajaban manipulando estos pesticidas (Miller *et al.*, 2017; Gupta y Ali, 2008; Miller, 2004; Mahmood *et al.* 2016). Es por ello por lo que se buscó una manera de implementar un nuevo método, menos dañino para las personas y el ambiente, siendo el biocontrol el método más natural y útil en aplicar, teniendo sus primeros registros alrededor del año 1919 con el uso de parasitoides, y hasta el día de hoy se continúa con la investigación y se han obtenido más resultados que amplían más la variedad de posibles agentes de biocontrol a utilizar (Smith, 1919; Tsujibo *et al.* 2003).

En plantas se ha observado que la presencia de ciertas especies bacterianas ayudan a inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos que son comunes en el deterioro de la planta, así como también se ha descubierto que en los suelos existe la presencia de hongos y bacterias que impiden el desarrollo de fitopatógenos (Ippolito y Nigro, 2000; Serrano y Galindo, 2007; Villoch *et al.*, 2003); estos microorganismos que habitan en la naturaleza forman un consorcio que libera componentes antagónicos en contra del crecimiento de microorganismos fitopatógenos, siendo este un método de biocontrol que no genera alteraciones que afecten a las plantas y al suelo (Gardi y Jeffrey, 2009). Es por ello por lo que en aquellos cultivos en los que se presente alguna infección por un fitopatógeno, al aplicarles un microorganismo de control biológico que tenga como hábitat común la planta o suelo de aplicación, se podrá generar un consorcio que fortalezca el cultivo y facilite la inhibición de patógenos (Compant *et al.*, 2005). Estos microorganismos que se extraen de los suelos pueden ser manipulados fácilmente por el hombre y comercializarse como biopesticidas para poder reemplazar el uso de productos químicos que generan diversos riesgos al momento de su uso. Es por ello por lo que es importante identificar cuáles son los microorganismos que pueden ser utilizados como control biológico y darles una aplicación (Slininger *et al.*, 2003).

1.2.1 Bacterias usadas en biocontrol

Diversas bacterias que son candidatas para uso como agentes de control biológico se encuentran en los suelos formando grandes consorcios; entre estos se encuentran bacterias como *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*, los cuales han demostrado tener la capacidad de inhibir a microorganismos patógenos presentes en diversos tipos de cosechas (Mathre *et al.*, 1999). Esta capacidad de inhibición se debe a que estas bacterias son capaces de liberar diversas enzimas que generan reacciones antagonistas contra patógenos. Se sabe que las enzimas que promueven una actividad inhibitoria son proteasas, celulosas, lipasas, lacasas, glucanasas y quitinasas, las cuales pueden ser usadas como protectoras de las plantas en contra de los fitopatógenos (Mishra *et al.*, 2020); también las bacterias de control biológico tienen un contenido genético en el cual algunos de sus genes ocasionan la liberación de sustancias volátiles que impiden el desarrollo de los fitopatógenos generando buenas herramientas para el biocontrol. Es por ello por lo que es de suma importancia conocer el código genético de los microorganismos utilizados para biocontrol, para saber que genes se encuentran presentes y aprovechar los estudios de inhibición (Mishra *et al.*, 2020) para desarrollar proyectos que se encarguen de la producción masiva de las enzimas o sustancias que libera la bacteria para inhibir fitopatógenos y enviarlas al mercado. Se han realizado diversos experimentos que buscan potencializar la genética y liberación enzimática de estos compuestos por las bacterias, los cuales, con el paso del tiempo, han estado obteniendo buenos resultados y mejores técnicas de desarrollo que implican menores gastos y buenos resultados (Lynd *et al.* 2002; Sukumaran *et al.* 2005; Arora y Mishra 2016; Mishra y Arora 2018).

1.2.2 *Bacillus velezensis* como herramienta de biocontrol

Bacillus velezensis es una bacteria Gram positiva, aerobia, formadora de esporas (Alenezi *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2006; Idris *et al.*, 2007; Le Mire *et al.*, 2016; Ye *et al.*, 2018; Nguyen *et al.*, 2019, Xu *et al.*, 2019), capaz de habitar distintos ambientes, entre ellos en los suelos, considerándose una bacteria endófito que habita en la rizosfera o en la filosfera (Hazarika *et al.*, 2019); destacando por las ventajas que presenta en diversos ámbitos, como la industria o la agricultura (Borris, 2015; Wu *et al.*, 2016; Al-Ali *et al.*, 2018; Belbahri *et al.*, 2017; Adeniji *et al.*, 2019; Guo *et al.*, 2019), y en investigaciones más recientes se ha estado descubriendo que presenta efectos inhibitorios de fitopatógenos en diversos cultivos. Uno de los ejemplos más recientes es aplicado en el camote, donde *B. velezensis* junto con *Bacillus safensis* demostraron una capacidad inhibitoria contra hongos fitopatógenos como

Plenodomus destruens; así como también se demostró que pueden sobrevivir un largo periodo de tiempo en el suelo y no generan ningún cambio en la microbiota de la rizosfera (Mateus *et al.*, 2021). Otros estudios demostraron que *B. velezensis* tiene efectos contra una gran variedad de fitopatógenos caracterizados por infectar a los cultivos de jitomate, tomando en cuenta un total de 14 fitopatógenos (Chen *et al.*, 2021). Se conoce que los microorganismos endófitos producen diversas sustancias que generan efectos antagónicos contra fitopatógenos los cuales se pueden aplicar en distintos ámbitos como la agricultura (Hazarika *et al.*, 2019). Realizando estudios genéticos en *Bacillus subtilis* se expresaron genes que codifican para la surfactina (*srfA*), bacillaeno (*baeR*), difficidina (*dfnD*), macrolactinas (*mlnA*) y fengicina (*fenA*) los cuales se definen como genes biosintéticos antifúngicos; esto demuestra que el género *Bacillus* sp. puede sintetizar sustancias que antagonizan el crecimiento de hongos (Hazarika *et al.*, 2019). La presencia de genes puede variar, dependiendo de la especie que se estudie, y se pueden encontrar otros genes biosintéticos antifúngicos en otras especies de *Bacillus* sp. En el caso de *Bacillus velezensis* se ha logrado la secuenciación de diversos genomas de varias cepas en los cuales han encontrado la presencia de genes que codifican metabolitos secundarios encargados de biosíntesis de lipopéptidos, como familias de la surfactina, fengicina, iturina y bacilisina; de bacteriocinas como amilociclina y amilolisina y de policétidos como el diffidina, bacillaene y macrolactinas (Palazzini *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Cawoy *et al.*, 2015; Babalola *et al.*, 2019; Ma y Hu, 2019). El conocimiento de este genoma y su variedad de metabolitos que libera nos ayuda a conocer cómo funcionan sus diversas capacidades que nos permiten utilizar a esta bacteria como un biofertilizante ya que esta ayuda a proteger a las plantas de los fitopatógenos, así como de que tiene la capacidad de favorecer el crecimiento de la planta incluso de dar respuestas favorables si se presenta en un estrés biótico o abiótico; es por ello que conocimiento del genoma de *B. velezensis*, y saber utilizar los distintos metabolitos secundarios producidos, nos ofrece la oportunidad de utilizarlo como nuevo método contra los diversos fitopatógenos que atacan los cultivos.

1.3 Hongos fitopatógenos

La presencia de hongos fitopatógenos ocasiona una alta alteración en la planta y su fruto, siendo poco accesible para su venta y consumo. Estos fitopatógenos infectan a la planta desde su siembra alterando todo su crecimiento debido a que su daño afecta desde la raíz, nódulos, tallo, hojas y fruto observando que el aspecto de las plantas no conserva sus características normales (Romero-Arenas *et al.*, 2018).

1.3.1 *Fusarium oxysporum* y *Fusarium fujikuroi*

Fusarium oxysporum y *Fusarium fujikuroi* son hongos fitopatógenos caracterizados por ocasionar marchitamiento en las plantas de jitomate de manera prematura (Ramírez *et al.*, 2021). En la planta se puede observar que el hongo ataca desde la raíz hasta llegar al tallo en el cual se le puede observar la marchitez dentro de este. Un ambiente húmedo puede favorecer el desarrollo de este hongo, llegando a fructificar en el tallo cuando la planta ya está muerta (Romero-Arenas *et al.*, 2018). Se ha observado que en cultivos como en la planta de arroz, las plántulas presentan un menor tamaño y los granos de arroz se presentan más alargados y delgados de lo que deberían (Niehaus *et al.*, 2017). También se menciona que estos hongos no solo generan las muertes de las plantas, si no que la producción de micotoxinas ocasiona daños en la salud en las personas y el ganado que entre en contacto con las plantas infectadas (Kai *et al.*, 2021).

Los hongos de este género tienen la capacidad de que, una vez entran en la planta, ocasionarán un colapso en el transporte del agua y obtención de sus nutrientes (Instituto Colombiano Agropecuario, 2018); esto a través de un diverso sistema de proteínas y enzimas que poco a poco irán marchitando la planta. Un ejemplo de su mecanismo de infección es la producción de la tomatinasa producido por el gen *Tom1* que se encarga de degradar la α -tomatina que es un método de defensa de las plantas de jitomate (Pareja-Jaime *et al.*, 2008; González *et al.*, 2012). También el hongo es capaz de producir una enzima pectato liasa que se encarga de degradar la pared celular (Di-Pietro *et al.*, 2001; González *et al.*, 2012).

1.3.2 *Alternaria alternata*

Este hongo es considerado como uno de los principales agentes patógenos en infectar a la planta de jitomate, caracterizándose por su alta transmisión entre plantas, que suele ser muy rápida, y su contagio por medio de los suelos donde es difícil de eliminar. Esta infección se observa con la presencia de manchas oscuras en las plantas (Akroum y Rouibah, 2020) las cuales se observan de color café o negras, así como las hojas amarillentas y secas, junto con esto la planta se estará marchitando de manera prematura (Mihnea *et al.*, 2016).

Entre sus mecanismos de infección a la planta se encuentra el uso de diversas micotoxinas que son liberadas durante su infección, como lo son el zinniol, el ácido tenuazónico (TeA) y la tentatoxina (Thomma, 2003). El TeA es capaz de generar una inhibición en la síntesis proteica (Thomma, 2003). El zinniol altera la permeabilidad de la membrana uniéndose a

los protoplastos estimulando los canales de calcio (Thuleau *et al.*, 1988; Thomma, 2003). La tentatoxina es un compuesto capaz de inhibir la fosforilación por su unión al cloroplasto ATP sintetasa ocasionando clorosis por la alteración del desarrollo del cloroplasto, así como también promueve la aparición de plástidos deformados (Halloin *et al.*, 1970; Thomma, 2003).

1.4 Efectos fungicidas

En el mundo actual, el uso de fungicidas es uno de los métodos más comunes en los cultivos para eliminar fitopatógenos y así evitar pérdidas económicas en la producción. En un principio parecía un método eficaz de eliminación de hongos, pero con el tiempo se fue descubriendo que estos químicos pueden ocasionar daños ambientales y en la salud del consumidor (Ramírez *et al.*, 2021; Mihnea *et al.*, 2016). También se ha descubierto que el uso excesivo de fungicidas puede ocasionar resistencia antifúngica (Akroum y Rouibah, 2020; Mihnea *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2019), lo cual genera el desarrollo de hongos más fuertes y difíciles de eliminar (Liu *et al.*, 2019), por lo cual se ha optado por hacer rotación de fungicidas para que se presente una variación de productos y los hongos no se adapten a ellos, aunque eso implica mayores costos y no elimina los riesgos ambientales y de salud (Liu *et al.*, 2019). También se ha documentado que el uso de fungicidas genera un riesgo en la reproducción celular de los humanos y animales (Runkle *et al.*, 2017), lo cual implica que la presencia de estos químicos en el cuerpo humano puede generar problemas de infertilidad a largo plazo debido al desarrollo de alteraciones fisiológicas y bioquímicas que pueden iniciar distintas enfermedades (Runkle *et al.*, 2017).

2. ANTECEDENTES

En México, la producción del jitomate es uno de los mayores ingresos económicos por parte del sector agrícola debido a su alto nivel de exportación e importación, reportándose en la primera mitad del 2022 una producción de 862 mil 557 toneladas de jitomate en 22,755 hectáreas de los cuales 160 mil toneladas fueron exportados. Analizando los datos recolectados en el país, los estados de mayor producción fueron Sinaloa, Baja California Sur y Sonora (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2022); así como también se reportó previamente que, en 2021, los países con los que se realizó la mayor exportación fueron Estados Unidos, Canadá, Japón, Emiratos Árabes Unidos y Singapur (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2021). Esta información nos corrobora la importancia del cuidado de los cultivos de jitomate y el riesgo que se puede tener en caso de tener pérdidas por infecciones por microorganismos fitopatógenos. Un ejemplo de este riesgo de pérdidas ocurrió en el país en el año 2010, cuando se implementó el aumento de uso de cultivos hidropónicos, y al no tener la capacitación sobre cómo cuidar los cultivos de dichas infecciones se llegó a presentar un fracaso en el 60% de los cultivos hidropónicos de todo el país, donde uno de sus principales productos fue el jitomate (Sánchez-Del Castillo, 2010).

El uso del biocontrol hoy en día es más utilizado e investigado debido al daño que se ha demostrado por el uso de pesticidas y fungicidas químicos. Harry Scott Smith es considerado uno de los principales pioneros en la aplicación del control biológico con sus investigaciones y campañas en las cuales buscó eliminar plagas en cultivos causado por insectos como la cochinilla harinosa, cochinilla citrophilus y cochinilla negra, utilizando parásitos; este trabajo le dio un gran prestigio y reconocimiento como investigador (Universidad de California, 1959) lo cual lo llevo a escribir un artículo en 1919 donde da por primera vez el termino control biológico (Smith, 1919). Los avances de Smith dieron lugar a que poco a poco aumentaran las investigaciones de biocontrol y hoy en día sea un tema de gran investigación al querer reducir el uso de compuestos químicos.

En investigaciones, utilizando bacterias del género *Bacillus* sp. inoculadas en plantas de ciertos cultivos, se demostró la capacidad que presentan para promover el crecimiento de las plantas, así como sus efectos antagónicos con fitopatógenos. Se ha demostrado que para promover el crecimiento en plántulas de jitomate (*Solanum lycopersicum*), la aplicación de bacterias del género *Bacillus* sp. (*Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*) pueden mejorar la calidad de las plántulas al momento de la aplicación de las bacterias en ellas. Esto se debe a que las bacterias de este género tienen la capacidad para solubilizar fosfatos y producir

compuestos indólicos del tipo Ácido Indol Acético, obteniendo así plántulas de mayor tamaño y masa a la esperada (Cabra-Cendales *et al.*, 2016).

Con el fin de demostrar el efecto de protección de *Bacillus cereus* contra *Fusarium oxysporum* en plantas de jitomate, se realizaron pruebas en placas Petri para demostrar el efecto antagónico de la bacteria contra el hongo; así también se buscó conocer que tan efectiva es su protección inoculando plantas de jitomate con la bacteria y el hongo. En esta investigación se demostró que, en la región donde se inoculó *B. cereus*, se inhibió el crecimiento del hongo impidiendo, su crecimiento en el resto de la placa. En el caso de las plantas que se inocularon con la bacteria y/o el hongo, se logró demostrar que aquellas que tenían inoculadas tanto la bacteria como al hongo presentaron un menor nivel de marchitez en comparación con las que solo se inocularon con el hongo; aquellas plantas inoculadas con *B. cereus* presentaron tallos fuertes, una buena coloración verde, así como un tamaño favorable (Ramírez *et al.*, 2021).

Utilizando a *Bacillus velezensis* como agente de biocontrol, se han demostrado efectos inhibitorios en las semillas de cultivos como jitomate o raíces como el camote. En raíces como el camote se descubrió que, junto con la cepa *B. safensis*, son capaces de crear efectos inhibitorios contra el hongo *P. destruens*, que comúnmente suele infectar a la raíz, así como también se demostró que elimina los signos de infección en la raíz (Mateus *et al.*, 2021). En las semillas de jitomate se demostró que *B. velezensis* es capaz de inhibir diversos hongos que infectan al jitomate como *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *F. moniliforme*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Alternaria nees* y *F. equiseti*, así como también favorece el crecimiento en las plántulas obteniendo mayor crecimiento, diámetro del tallo y buena coloración (Chen *et al.*, 2021).

3. JUSTIFICACIÓN

El jitomate es una de las frutas de mayor comercialización y consumo en México. Nuestro país es uno de los mayores exportadores en el mundo, por lo que la muerte de los cultivos por hongos fitopatógenos puede generar grandes pérdidas económicas. Hoy en día, los agricultores, para evitar dichos riesgos, aplican una gran cantidad de fungicidas químicos como un método rápido y sencillo que reduce el riesgo de infección del cultivo; sin embargo, el uso indiscriminado de estas sustancias químicas genera daños en la salud humana, contaminan el medio ambiente y contribuyen al deterioro de los suelos de cultivo.

El presente trabajo busca estudiar la interacción bacteria-hongo fitopatógeno, así como el posible desarrollo de una herramienta biotecnológica para ser utilizada en el biocontrol de fitopatógenos fúngicos, sin la necesidad de aplicar fungicidas químicos que afecten el desarrollo y crecimiento de las plantas. *Bacillus velezensis* es capaz de producir compuestos orgánicos que inhiben el crecimiento de hongos que causan pérdidas económicas en cultivos de jitomate, como *Fusarium oxysporum*, *Fusarium fujikuroi* y *Alternaria alternata*; por lo tanto, el estudio de la interacción entre esta bacteria y estos fitopatógenos nos podría orientar en el desarrollo de herramientas de biocontrol.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar la interacción de compuestos orgánicos producidos por *Bacillus velezensis* y su actividad biológica en contra de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium fujikuroi* y *Alternaria alternata*.

4.2 Objetivos específicos

- ☀ Determinar la capacidad de inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos por la bacteria *B. velezensis*, en pruebas in vitro en cultivo dual.
- ☀ Determinar la capacidad de producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC's) por *B. velezensis*, en cultivos en placa bipartida, para determinar el potencial de inhibición contra hongos fitopatógenos de interés agrícola.
- ☀ Determinar la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos utilizando extractos orgánicos obtenidos de *B. velezensis*.
- ☀ Determinar la promoción de la germinación de semillas de jitomate (*Solanum lycopersicum* var. *esculentum*) inoculadas con *B. velezensis* y expuesto a hongos fitopatógeno de interés agrícola.
- ☀ Determinar la presencia de compuestos surfactantes por *B. velezensis* por el método de colapso de gota para identificar el compuesto que genera la inhibición de fitopatógenos.

5. DIAGRAMA DE TRABAJO

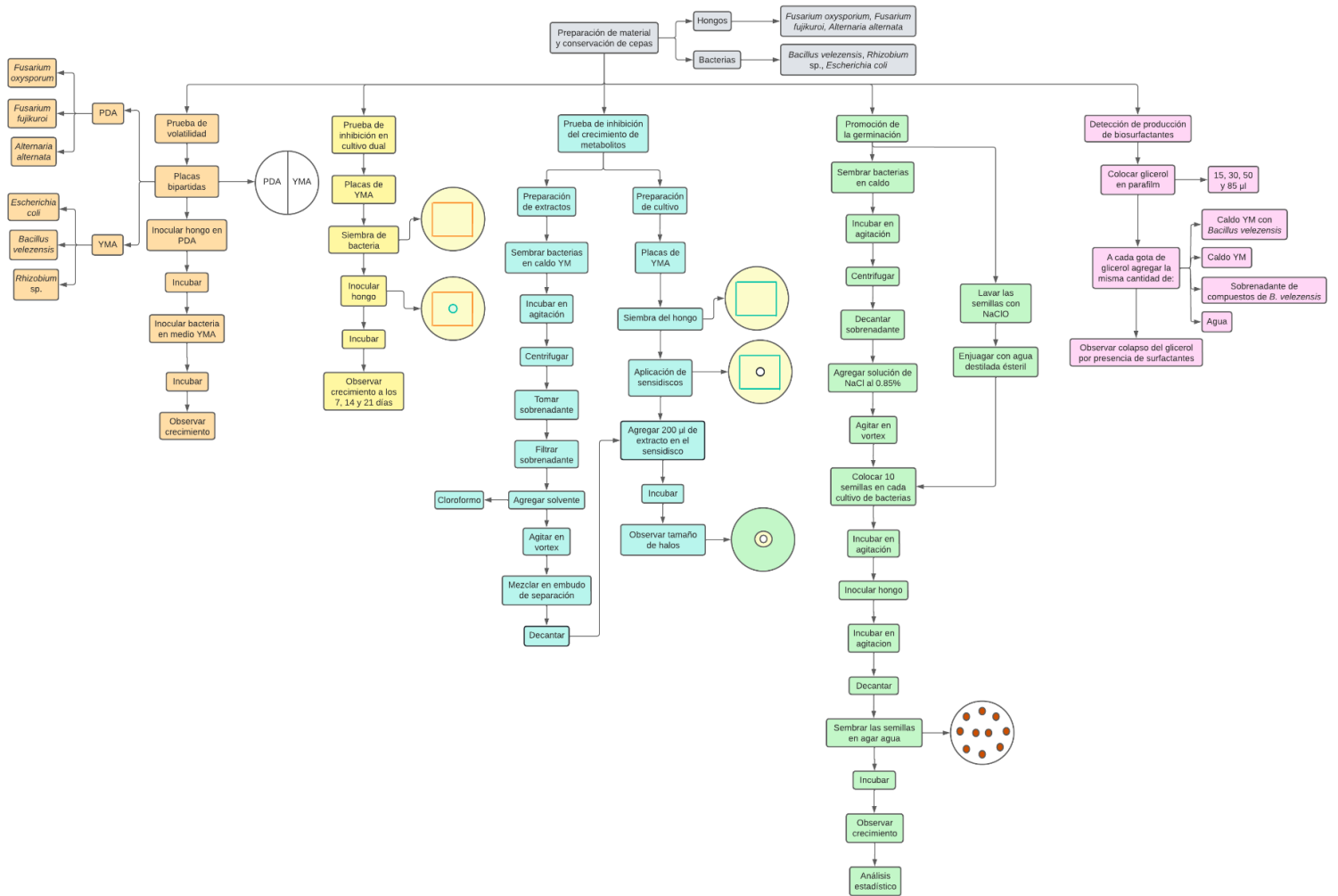


Figura 1. Diagrama de trabajo

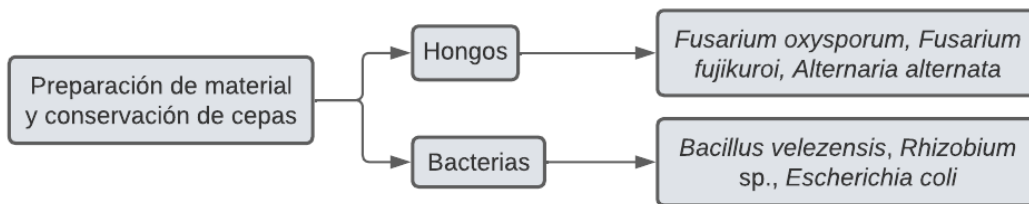


Figura 2. Diagrama de microorganismos a conservar

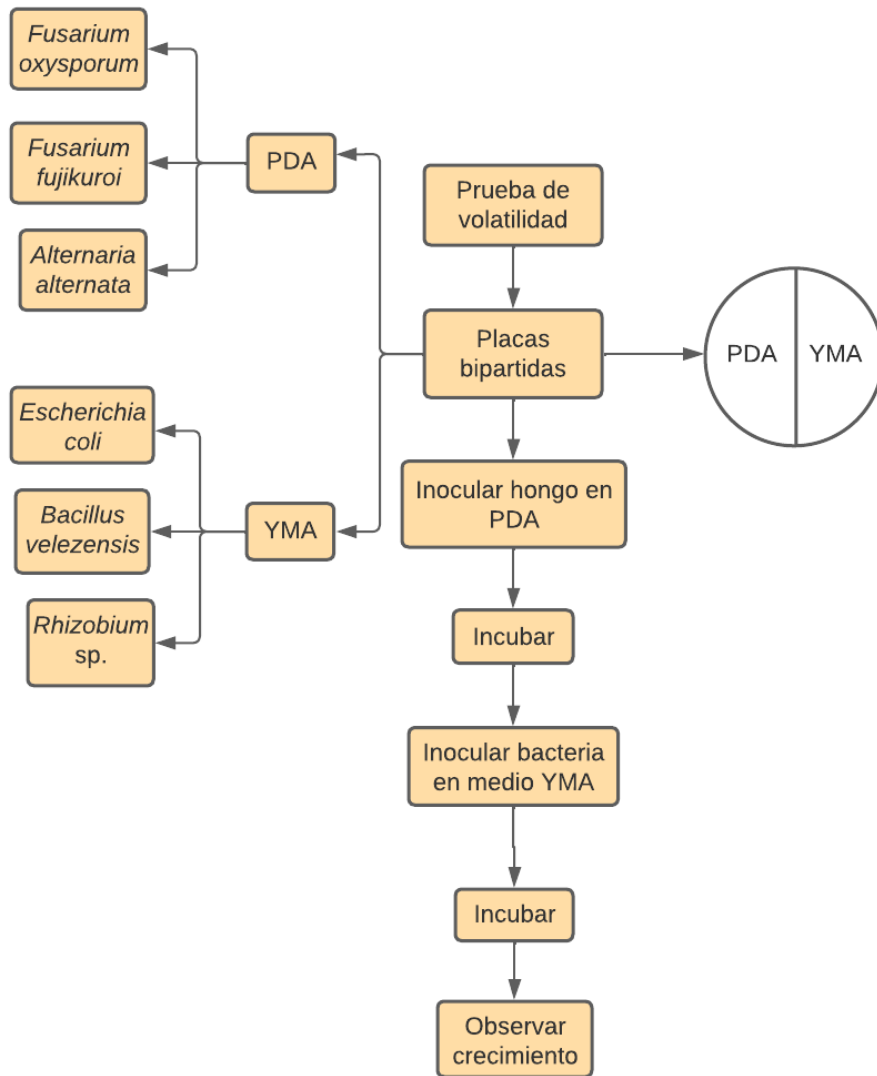


Figura 3. Diagrama de trabajo para la prueba de inhibición por compuestos orgánicos volátiles (VOC's)

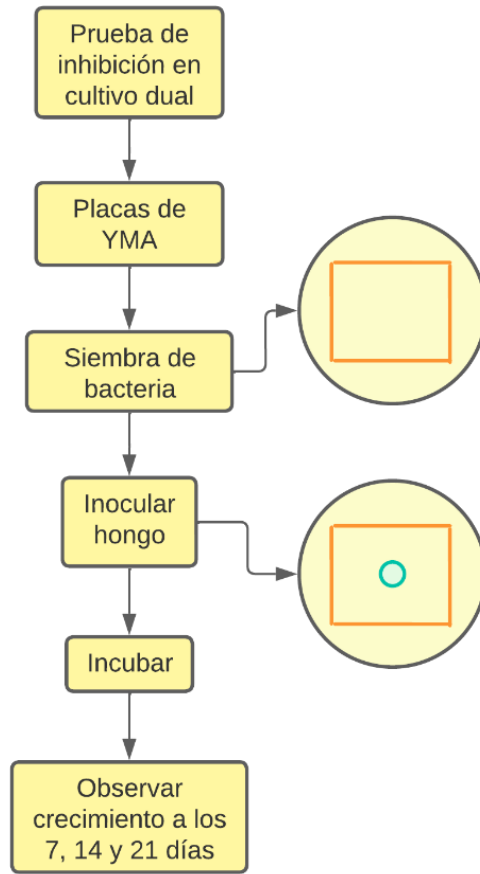


Figura 4. Diagrama de trabajo para la prueba de inhibición en cultivo dual

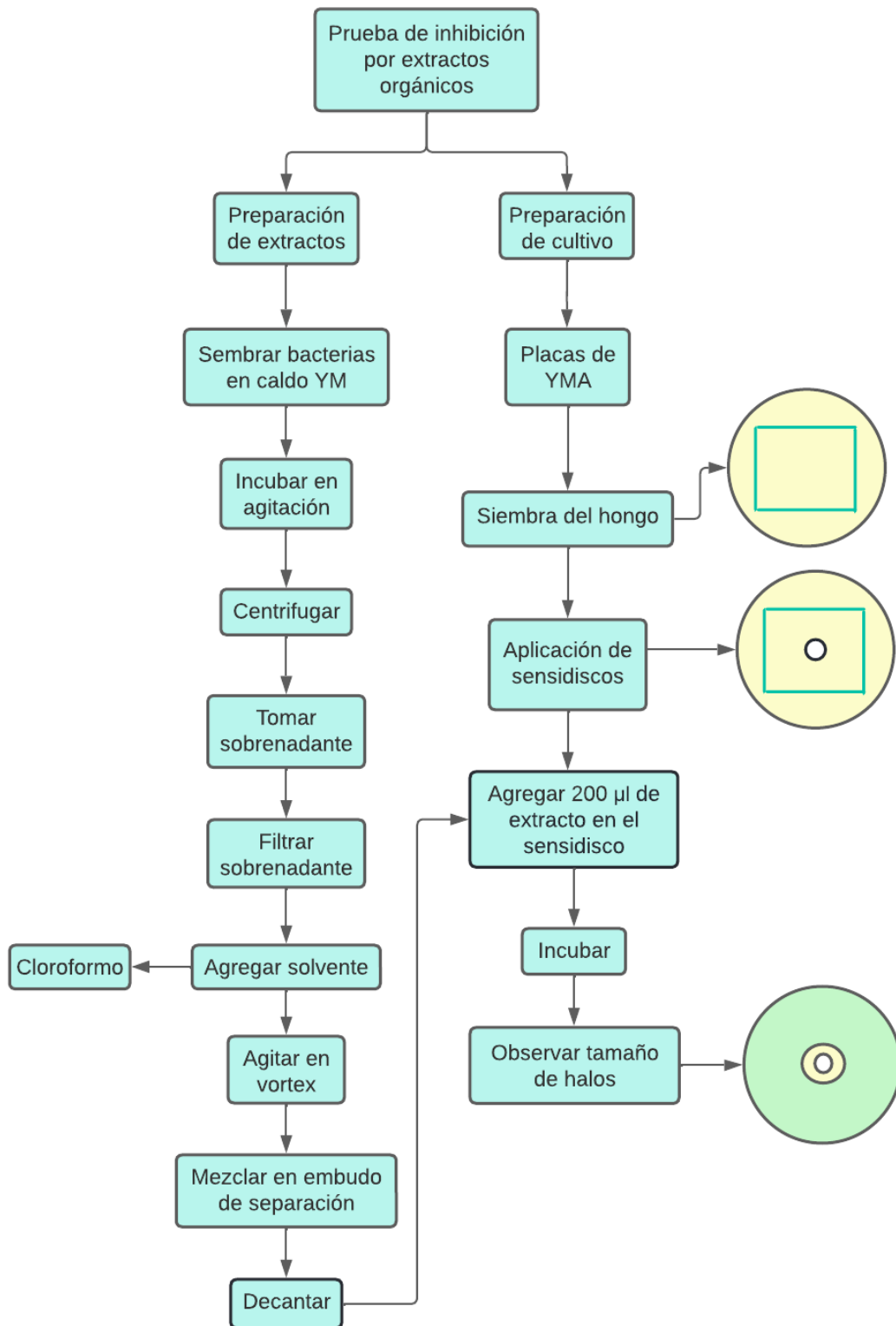


Figura 5. Diagrama de trabajo para prueba de inhibición por extractos orgánicos

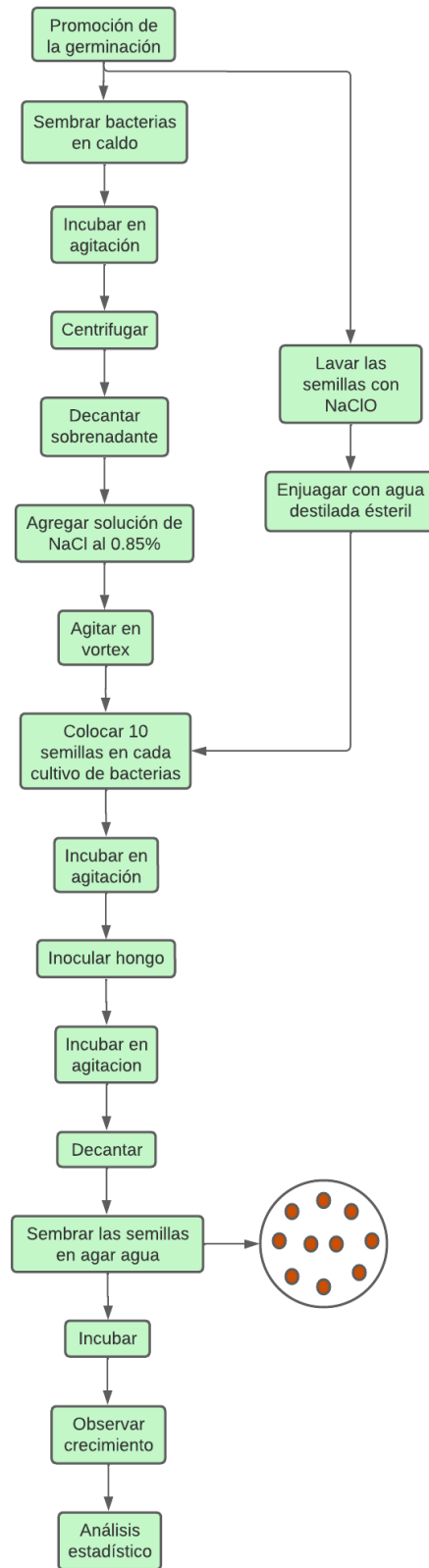


Figura 6. Diagrama de trabajo para la prueba de determinación de la promoción de la germinación

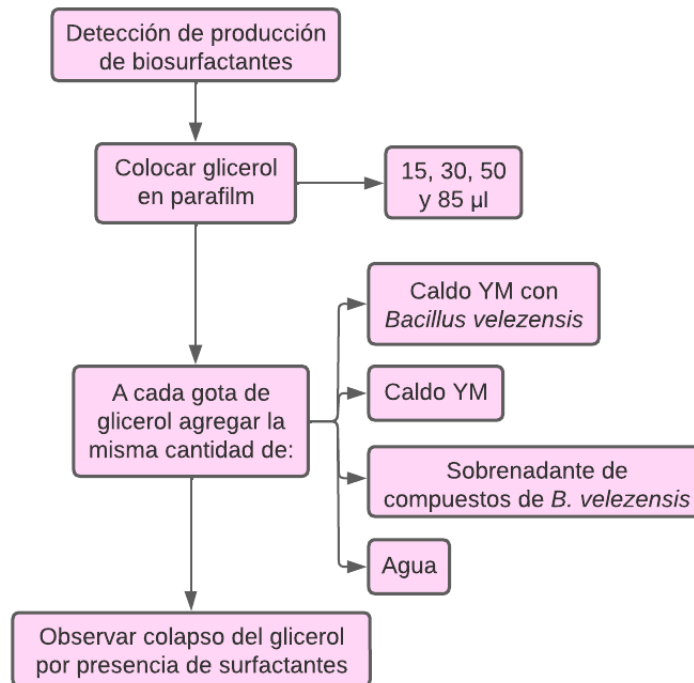


Figura 7. Diagrama de trabajo para la prueba de detección de surfactantes producidos por *B. velezensis* LEM1054

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales

Se utilizará material de vidrio y plástico, placas Petri, reactivos para preparación de medios de cultivo y germinación de semillas de jitomate, asa bacteriológica, micropipeta, mechero.

6.2 Material biológico

- ☼ Cepas bacterianas pertenecientes al Laboratorio de Ecología Microbiana del CICM del Instituto de Ciencias-BUAP: *Bacillus velezensis* LEM1054, *Rhizobium* sp. LEM1061 y *Escherichia coli* BL21DE3 (Thermo Fisher SCIENTIFIC CAS# C600003).
- ☼ Cepas micológicas *Fusarium oxysporum* CENAGRO1, *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 y *Alternaria alternata* CENAGRO3 donadas por el Laboratorio de Recursos Genéticos del Centro de Agroecología del Instituto de Ciencias-BUAP.
- ☼ Semillas de jitomate (*Solanum lycopersicum* var. *esculentum*) donado por el Dr. Carlos Contreras Paredes y el Dr. Omar Romero Arenas del Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Biología.

6.3 Equipos

Equipo	Marca	Modelo
Incubadora	Lab-Line	Imperial III
Incubadora con agitación	Labnet	Orbit 1900
Centrifuga	eppendorf	Centrifuge 5804 R
Vortex	VORTEX-GENIE-2 (Scientific Industries)	G-560
Campana de extracción	SEV	CFLV-102

6.4 Métodos

Determinación	Método	Referencia
Prueba de inhibición en cultivo dual	Cultivo dual de <i>B. velezensis</i> y fitopatógenos	Ramírez <i>et al.</i> , 2020
Prueba de inhibición por compuestos orgánicos volátiles (VOC's)	Cultivo en placas bipartidas de <i>B. velezensis</i> vs fitopatógenos (<i>Fusarium fujikuroi</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Alternaria alternata</i>)	Ramírez <i>et al.</i> , 2021
Prueba de inhibición por extractos orgánicos	Cultivo de fitopatógenos con extractos de <i>B. velezensis</i> en sensidiscos	Ramírez <i>et al.</i> , 2021
Pruebas de promoción de la germinación	Siembra in vitro de semillas de jitomate inoculadas con hongos fitopatógenos y <i>B. velezensis</i>	Ramírez <i>et al.</i> , 2021
% Germinación	Prueba ANOVA	Ramírez <i>et al.</i> , 2021
Detección de surfactantes producidos por <i>B. velezensis</i> LEM1054	Método de colapso de gotas con <i>B. velezensis</i> y sobrenadante de compuestos de <i>B. velezensis</i>	Bodour <i>et al.</i> , 1998

7. METODOLOGÍA

7.1 Conservación de los microorganismos:

7.1.1 Para bacterias:

Se sembraron las cepas de *Bacillus velezensis* LEM1054, *Rhizobium* sp. LEM1061 y *Escherichia coli* BL21DE3 en agar YMA modificado por el método de estría cruzada, se incubaron a 28°C y posteriormente se colocaron en refrigeración a -5°C.

7.1.2 Para hongos:

Se tomaron fragmentos de cultivos puros de los hongos *Alternaria alternata* CENAGRO3, *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 y *Fusarium oxysporum* CENAGRO1 y se sembraron en medio líquido YM modificado, se incubaron para su crecimiento en una incubadora de agitación a 28°C y posteriormente se conservaron a temperatura ambiente.

7.2 Prueba de inhibición en cultivo dual

Esta prueba se realizó en agar YMA modificado, la prueba consiste en inocular cuatro asadas de un cultivo fresco en medio sólido YMA modificado (*Bacillus velezensis* LEM1054, *Rhizobium* sp. LEM1061 o *E. coli* BL21DE3) en los cuatro lados de la caja Petri formando un cuadro, una cepa por caja y en el centro se inoculó 20 µl (1x10⁶ microconidias) de un cultivo fresco (O/N) en medio líquido YM modificado de uno de los hongos fitopatógenos, uno por caja de Petri (*Fusarium fujikuroi* CENAGRO2, *Fusarium oxysporum* CENAGRO1 o *Alternaria alternata* CENAGRO3), se incubaron a 28°C para ser revisados a los 7, 14 y 21 días para posteriormente analizar y observar si se presentó un efecto inhibitorio en el crecimiento de los hongos, cada ensayo se realizó por triplicado para cada una de las cepas y cada una de las condiciones (Ramírez *et al.*, 2020).

7.3 Prueba de inhibición por compuestos orgánicos volátiles (VOC's)

En placas Petri bipartidas se colocaron en una mitad medio PDA y en otra medio YMA modificado, en la mitad donde está el medio PDA, se colocó 20 µl (1x10⁶ microconidias) de *Fusarium oxysporum* CENAGRO1, *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 o *Alternaria alternata* CENAGRO3 una caja Petri por cada fitopatógeno y en la mitad de YMA modificado se colocó una asada de las bacterias *Bacillus velezensis* LEM1054, *Rhizobium* sp. LEM1061 o *E. coli* BL21DE3 después de 48 horas de incubación del hongo, una caja por cada cepa y se incubaron las placas a 28°C por 1 semana y posteriormente se observó el crecimiento

que se obtuvo, esto con el fin de conocer si las sustancias que liberan las bacterias pueden entrar en contacto con el hongo a cierta distancia de su siembra y generar una inhibición cada ensayo se realizó por triplicado para cada una de las cepas y cada una de las condiciones (Ramírez *et al.*, 2021).

7.4 Prueba de inhibición por extractos orgánicos

Se tomaron asadas de *Bacillus velezensis* LEM1054 y se colocaron en tubos con caldo YM modificado (20 ml) para incubarse en agitación por 24 h a 28°C (O/N), después los cultivos se centrifugaron por 20 minutos a 5000 rpm donde posteriormente se tomó el sobrenadante y se desechó la pastilla, una vez con el sobrenadante se agregaron 20 ml del solvente para realizar los extractos, en este caso se utilizó cloroformo. Se colocaron en vórtex por 10 minutos para separar la fase acuosa de la orgánica. Después el extracto se colocó en un embudo de separación donde se agitó y se separaron las fases obteniendo la fase orgánica que es la fase de interés. Posteriormente se tomaron asadas de los hongos fitopatógenos y se les realizó una siembra en forma de cuadro en medio YMA, a esa siembra se le agregó en el centro del medio un sensidisco y se le agregaron 200 µl de la fase orgánica de los extractos, junto con controles negativos (agua destilada y cloroformo) y un control positivo (fluconazol). Se incubaron a 28°C por 4 días y se buscó observar la formación de halos de inhibición. Este ensayo se realizó por triplicado (Ramírez *et al.*, 2021).

7.5 Determinación de la promoción de la germinación

Se tomaron asadas de *E. coli* BL21DE3, *Bacillus velezensis* LEM1054 o *Rhizobium* sp. LEM1061 y se colocaron en tubos con 10 ml de YM modificado para incubarse en agitación por 24 h a 28°C, después los cultivos se centrifugaron por 20 minutos a 5000 rpm donde posteriormente se decantó el sobrenadante, una vez sin el sobrenadante se agregaron 10 ml de solución al 0.85% de NaCl las cuales pasaron por el vórtex y se les agregaron 10 semillas de jitomate las cuales se lavaron previamente con NaClO al 4% de manera directa y se enjuagaron con agua destilada estéril hasta eliminar el olor del NaClO, una vez colocadas las semillas en los tubos junto con un control negativo (sin inoculación bacteriana) se incubaron en agitación nuevamente por 24 horas a 28°C. Después de la incubación se le agregaron 20 µl de los hongos *Alternaria alternata* CENAGRO3, *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 o *Fusarium oxysporum* CENAGRO1 y se incubaron en agitación por 30 minutos para posteriormente decantar el sobrenadante, las semillas se colocaron en agar agua y se observó su germinación. Posteriormente se realizó un análisis estadístico a

través de la prueba ANOVA en la cual se buscó una diferencia significativa en la germinación de las plantas. Cada ensayo se realizó por triplicado para cada una de las condiciones (Ramírez *et al.*, 2021).

7.6 Detección de surfactantes producidos por *B. velezensis* LEM1054

En papel parafilm se colocaron gotas de glicerol en distintas cantidades (15, 30, 50 y 85 μ l), a estas gotas se les agregó la misma cantidad de las sustancias a estudiar que fueron caldo YM modificado, *B. velezensis* LEM1054, sobrenadante de los componentes de *B. velezensis* LEM1054 y como control negativo se usó agua. Una vez que se le agregó las sustancias al glicerol se esperó observar el colapso de algunas de las gotas de glicerol para determinar la presencia de la producción de biosurfactantes (Bodour *et al.*, 1998).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Prueba de inhibición en cultivo dual

Tabla 1. Prueba de inhibición dual con *Alternaria alternata* CENAGRO3 durante 1, 2 y 3 semanas


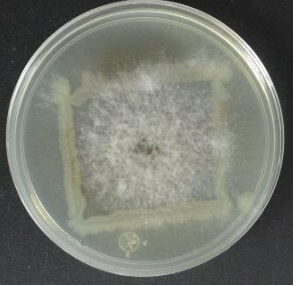
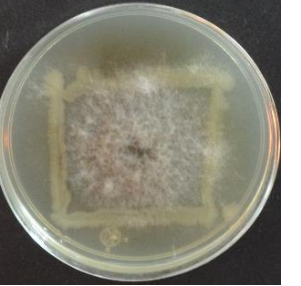
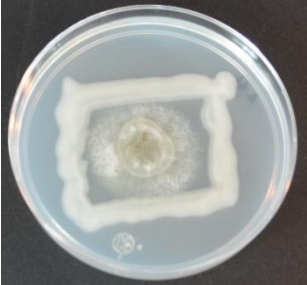
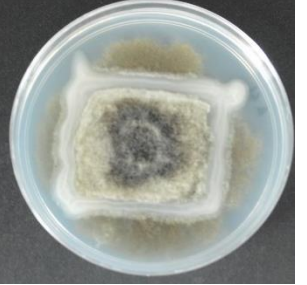
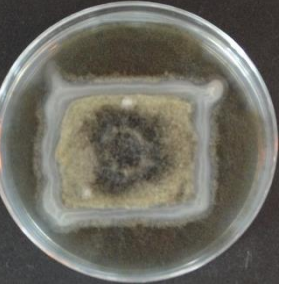


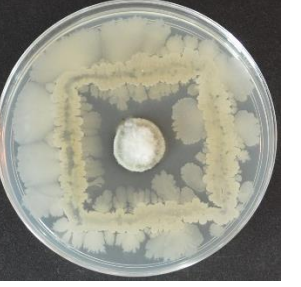


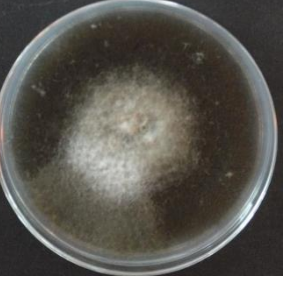
<i>Alternaria alternata</i> CENAGRO3	Semana 1	Semana 2	Semana 3
<i>E. coli</i> BL21DE3			
<i>Rhizobium</i> sp. LEM1061			
<i>Bacillus velezensis</i> LEM1054			
Negativo			

Tabla 2. Prueba de inhibición dual con *Fusarium oxysporum* CENAGRO1 durante 1, 2 y 3 semanas

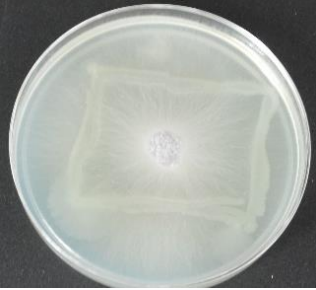
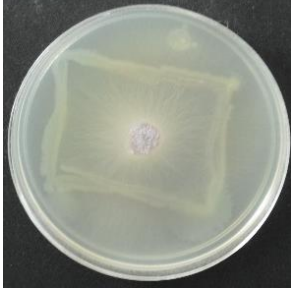
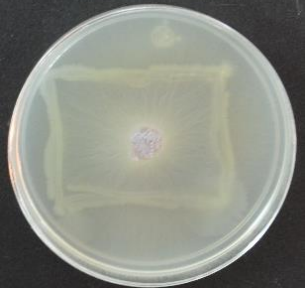
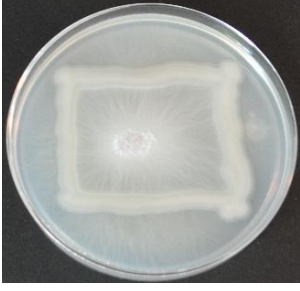
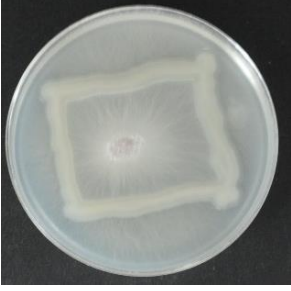
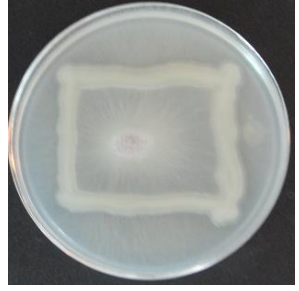

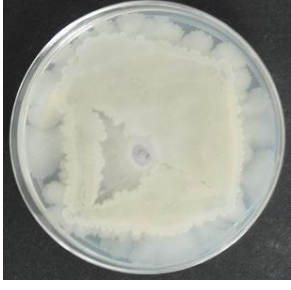




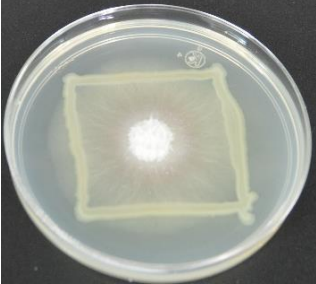
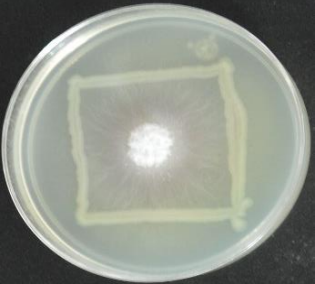
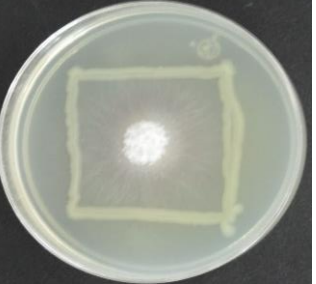
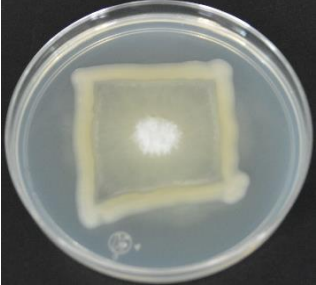
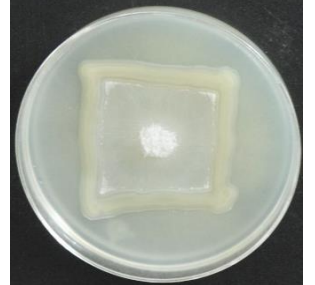
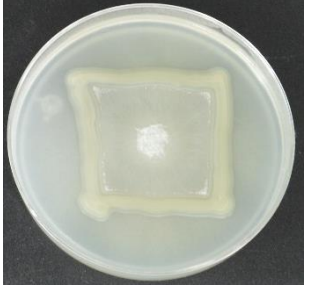

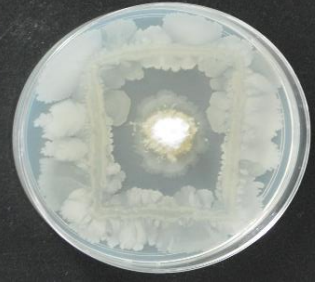
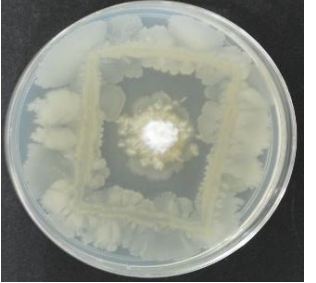
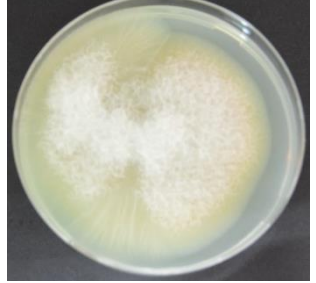


<i>Fusarium oxysporum</i> CENAGRO1	Semana 1	Semana 2	Semana 3
<i>E. coli</i> BL21DE3			
<i>Rhizobium</i> sp. LEM1061			
<i>Bacillus velezensis</i> LEM1054			
Negativo			

Tabla 3. Prueba de inhibición dual con *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 durante 1, 2 y 3 semanas

<i>Fusarium fujikuroi</i> CENAGRO2	Semana 1	Semana 2	Semana 3
<i>E. coli</i> BL21DE3			
<i>Rhizobium</i> sp. LEM1061			
<i>Bacillus velezensis</i> LEM1054			
Negativo			

En la prueba de inhibición por cultivo dual se realizaron cultivos con tres bacterias y un control negativo para analizar los efectos que pueden presentar las bacterias contra el crecimiento de los hongos fitopatógenos de interés, en el caso del control negativo se aprecia como ocurre normalmente el crecimiento del hongo durante tres semanas sin la

intervención de algún otro microorganismo, en este control se puede apreciar que para *Alternaria alternata* CENAGRO3 el hongo cubre por completo la placa Petri en la semana 2 y alcanza su máximo crecimiento en la semana 3 (Tabla 1), para *Fusarium oxysporum* CENAGRO1 desde la semana 1 su crecimiento abarca toda la placa Petri (Tabla 2) y en el caso de *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 su crecimiento máximo se observa en la semana 2 (Tabla 3). Una vez que se conoce el crecimiento de los hongos de estudio se realiza la comparación de su crecimiento contra las bacterias de interés.

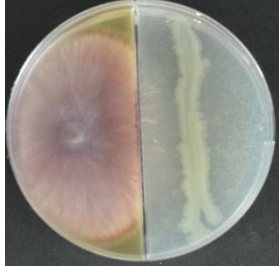
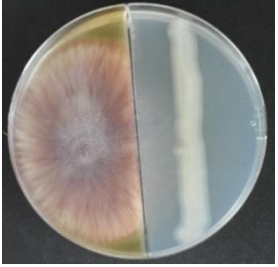

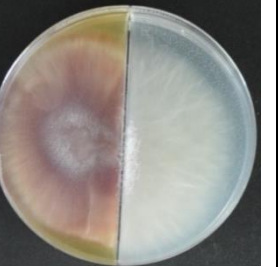
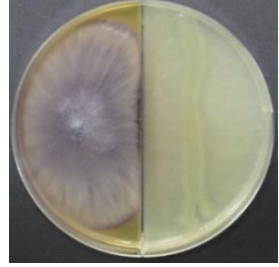
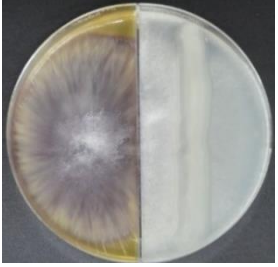
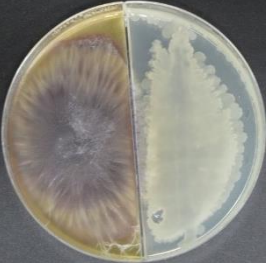
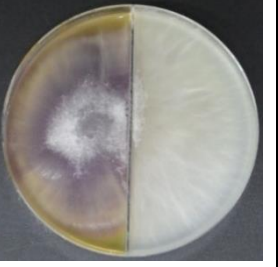
En el caso de los cultivos que se realizaron con las cepas de *E. coli* BL21DE3 y *Rhizobium* sp. LEM1061 los hongos presentaron un crecimiento más lento al que se presentó en el control negativo (Tablas 1, 2 y 3), esto puede ser debido a que puede existir una competencia entre estas bacteria y los hongos para sobrevivir y obtener los nutrientes presentes en el medio de cultivo, pero al ser bacterias que no producen compuestos que generen la inhibición del fitopatógeno el hongo seguirá su crecimiento hasta cubrir toda la placa y ser el principal microorganismo en recibir los nutrientes del medio de cultivo, este crecimiento se puede observar desde la semana 1 en donde los hongos sobrepasan los límites marcados por las bacterias que fueron sembradas en forma de cuadro con el fin de rodear el hongo y para la semana 3 el hongo cubrirá todo el medio (Tablas 1, 2 y 3).

En el caso de los hongos que fueron rodeados de *B. velezensis* LEM1054 se logra apreciar una inhibición en el crecimiento de estos, en el caso de *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 y *Alternaria alternata* CENAGRO3 se puede apreciar como el hongo detiene su crecimiento al estar rodeado de la bacteria y crece de una manera limitada (Tablas 1 y 3), en el caso de *Fusarium oxysporum* CENAGRO1 se observa que la bacteria inhibió por completo el crecimiento del hongo, en este caso se observa como la bacteria logra crecer por toda la placa y casi no deja rastro del hongo (Tabla 2). La inhibición del crecimiento de los hongos ocasionado por *B. velezensis* es un indicador de que la bacteria es capaz de liberar compuestos que al interaccionar con el hongo se inhibe su crecimiento, estos compuestos pueden ser aquellos que se han encontrado en su genoma que presentan efectos antagónicos en hongos fitopatógenos los cuales son metabolitos secundarios para la biosíntesis de lipopéptidos, bacteriocinas y policétidos (Palazzini *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Cawoy *et al.*, 2015; Babalola *et al.*, 2019; Ma y Hu, 2019).

8.2 Prueba de inhibición por compuestos orgánicos volátiles (VOC's)


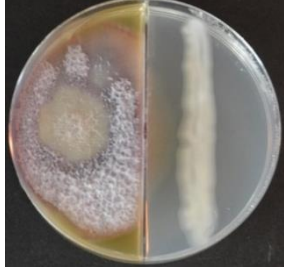
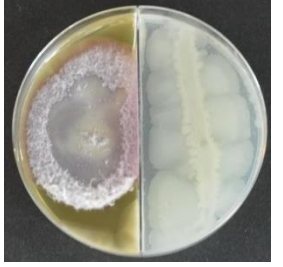
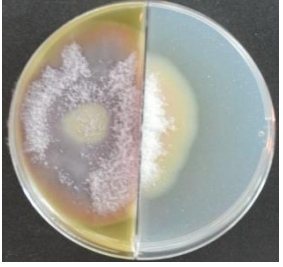

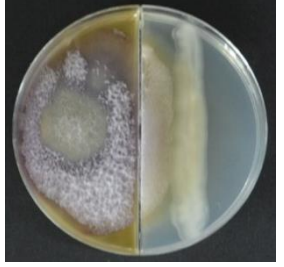
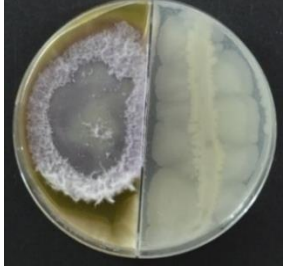
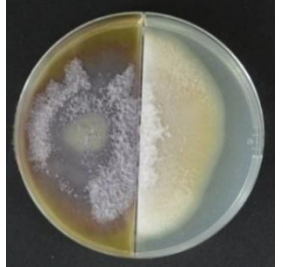
Para *Fusarium oxysporum* CENAGRO1:

Tabla 4. Prueba de volátiles en *Fusarium oxysporum* CENAGRO1 a los 7 y 14 días de incubación

Tiempo	<i>E. coli</i> BL21DE3	<i>Rhizobium</i> sp. LEM1061	<i>B. velezensis</i> LEM1054	Control negativo
7 días				
14 días				

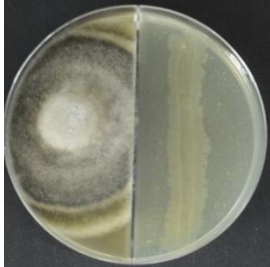
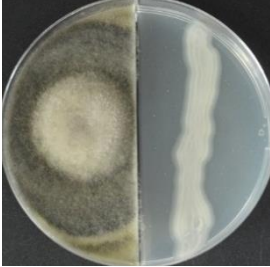

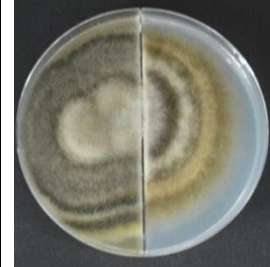
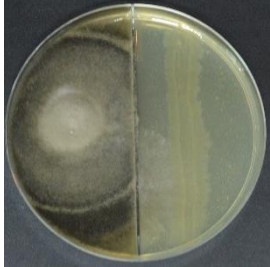


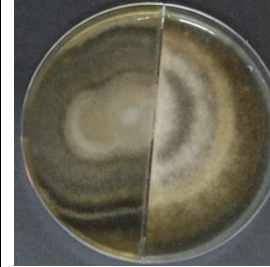
Para *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2:

Tabla 5. Prueba de volátiles en *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 a los 10 y 14 días de incubación

Tiempo	<i>E. coli</i> BL21DE3	<i>Rhizobium</i> sp. LEM1061	<i>B. velezensis</i> LEM1054	Control negativo
10 días				
14 días				

Para *Alternaria alternata* CENAGRO3:

Tabla 6. Prueba de volátiles en *Alternaria alternata* CENAGRO3 a los 14 y 20 días de incubación

Tiempo	<i>E. coli</i> BL21DE3	<i>Rhizobium</i> sp. LEM1061	<i>B. velezensis</i> LEM1054	Control negativo
14 días				
20 días				

Durante varios días se estudió el crecimiento que presentaban los hongos de estudio contra diversas bacterias y un control negativo sin bacteria, esto para conocer los efectos que tienen *B. velezensis* LEM1054 contra los hongos fitopatógenos utilizando compuestos volátiles. Para el caso de los controles negativos se logró apreciar un crecimiento que abarcó toda la placa Petri a pesar de estar dividida, para el caso de *Fusarium oxysporum* CENAGRO1 (Tabla 4) y *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 (Tabla 5) los hongos lograron abarcar por completo la placa en el día 14 y *Alternaria alternata* CENAGRO3 (Tabla 6) abarcó su crecimiento hasta el día 20 siendo este hongo el que presentó un crecimiento y resultados más lentos.

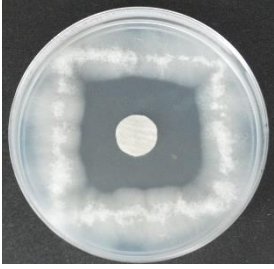


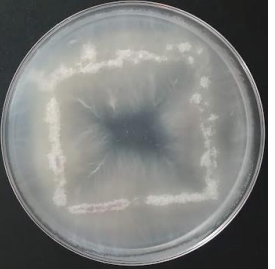
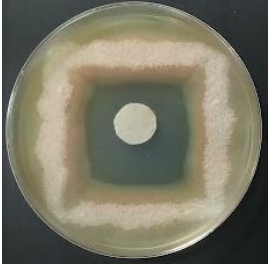


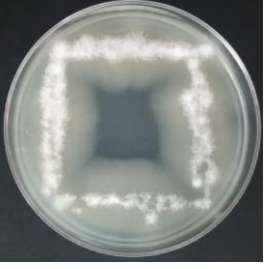


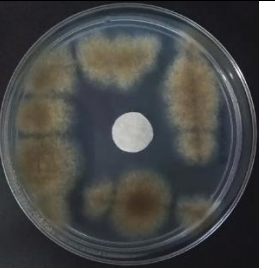

En el caso de las placas que tenían inoculadas en la mitad con medio YMA modificado las bacterias de *E. coli* BL21DE3 y *Rhizobium* sp. LEM1061 (Tablas 4, 5 y 6) se observó que el crecimiento de los hongos fue más lento que en el caso del control negativo, esto se puede deber a que las bacterias y los hongos generan mecanismos de defensa para sobrevivir pero no son los suficientemente eficaces para poder detener el crecimiento de los hongos y al final estos si logran invadir la otra mitad de la placa, para el caso de *Fusarium oxysporum* CENAGRO1 se observa que el hongo logra invadir la mitad con *E. coli* BL21DE3

y *Rhizobium* sp. LEM1061 desde el día 7 y para el día 14 el hongo cubría por completo la placa incluso donde se presentaban las bacterias (Tabla 4); en el caso de *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 a los 10 días se observa que el hongo empieza a invadir la mitad de la placa donde se encuentran las bacterias, a los 14 días se observa que en la placa con la bacteria de *Rhizobium* sp. LEM1061 el hongo logra invadir aún más la zona de la bacteria mientras en el caso del medio con *E. coli* BL21DE3 se observa un mayor crecimiento del hongo el cual no se logra apreciar por una forma micelar pero si en la coloración amarilla que presenta el medio con la bacteria (Tabla 5); en el caso de *Alternaria alternata* CENAGRO3 la invasión es más lenta pero a partir del día 20 se aprecia que el hongo empieza a invadir la mitad donde se encuentra *E. coli* BL21DE3 y *Rhizobium* sp. LEM1061 (Tabla 6).

Las pruebas que tienen a los hongos contra *B. velezensis* LEM1054 presentaron resultados donde se demuestra actividad de inhibición, el hongo no logra invadir apropiadamente la mitad donde está presente la bacteria, en cambio la bacteria empieza a invadir la mitad donde se encuentran los hongos haciendo que estos no logren desarrollarse completamente en su mitad de la placa obteniendo un tamaño menor al esperado (Tablas 4, 5 y 6). La disminución del crecimiento de los tres hongos se puede deber a que *B. velezensis* es una bacteria capaz de liberar compuestos volátiles que impiden a las esporas de los hongos fitopatógenos sigan su crecimiento hacia otras partes del medio, existen una variedad de compuestos volátiles como 2,4-di-terc butilfenol, heneicosano, hentriacontano y tetracosano que pueden ocasionar esta inhibición, estos compuestos son conocidos por estar presentes en bacterias del género *Bacillus* sp. como *Bacillus cereus* (Ramírez *et al.*, 2020), también cabe destacar que no solo la actividad de los volátiles puedan ser la causa única de la actividad antifúngica, también hay que resaltar la posibilidad de la actividad de los metabolitos secundarios como los lipopéptidos, las toxinas y las enzimas hidrolíticas que podrían también participar en este proceso (Ramírez *et al.*, 2021).

8.3 Prueba de inhibición por extractos orgánicos

Tabla 7. Prueba de inhibición contra *Fusarium oxysporum* CENAGRO1, *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 y *Alternaria alternata* CENAGRO3 utilizando fluconazol, extracto de *B. velezensis* LEM1054 con cloroformo, cloroformo y control negativo

<i>Fusarium oxysporum</i> CENAGRO1			
Fluconazol	Extracto	Cloroformo	Negativo
			
<i>Fusarium fujikuroi</i> CENAGRO2			
Fluconazol	Extracto	Cloroformo	Negativo
			
<i>Alternaria alternata</i> CENAGRO3			
Fluconazol	Extracto	Cloroformo	Negativo
			

En esta prueba se midieron los diámetros de crecimiento de los hongos después de un crecimiento de 4 días en los que fueron expuestos con extractos de *B. velezensis* LEM1054 con cloroformo y fueron comparados con los diámetros de sus controles negativos (cloroformo, sin sensidisco) y positivos (fluconazol), obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 8. Promedio de diámetros de crecimiento de los hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum* CENAGRO1, *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 y *Alternaria alternata* CENAGRO3) al ser expuestos con compuestos como cloroformo, fluconazol y extracto de cloroformo con *B. velezensis* LEM1054 incubados por 4 días

Para <i>Fusarium oxysporum</i> :	Promedio
Extracto	1.9 cm
Cloroformo	1.75 cm
Fluconazol	4 cm
Negativo	0.65 cm
Para <i>Fusarium fujikuroi</i> :	
Extracto	3.8 cm
Cloroformo	2.5 cm
Fluconazol	3.7 cm
Negativo	1.9 cm
Para <i>Alternaria alternata</i> :	
Extracto	2.7 cm
Cloroformo	2.16 cm
Fluconazol	4.6 cm
Negativo	2.5 cm

Para *Fusarium oxysporum* CENAGRO1 se logra apreciar que los diámetros obtenidos por parte del extracto no son lo suficientemente significativos en comparación con la prueba realizada con fluconazol, aunque si se llega a observar un diámetro mayor al que se observa en el control negativo (Tabla 7) y si se comparan los diámetros del control de cloroformo con el extracto se observa mucha similitud entre ellos aunque en el caso del extracto el diámetro es ligeramente mayor al de cloroformo (Tabla 8) lo que puede indicar una débil actividad por parte de los metabolitos. Para *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 se observa que la actividad del extracto forma un diámetro mayor al de los dos controles negativos y más cercano al control positivo (Tabla 7), el diámetro observado en el extracto tiene una medida igual al fluconazol (Tabla 8), esto podría indicar que el extracto presenta una mejor función de inhibición al aplicarlo contra este hongo. Para *Alternaria alternata* CENAGRO3 se obtuvo que los diámetros obtenidos del extracto son similares al control negativo y el control de fluconazol presenta un diámetro muy alto (Tablas 7 y 8), esto indica que el extracto al igual que con *Fusarium oxysporum* CENAGRO1 no presenta una efectividad ideal a comparación

del antifúngico aunque si presenta una ligera diferencia favorable en comparación con los controles negativo y de cloroformo por lo que puede indicar que si hay un ligero efecto inhibitorio pero se debe de buscar una manera de mejorar la actividad de los metabolitos.

Estos resultados nos pueden indicar que puede haber cierto efecto de inhibición de los extractos con los hongos fitopatógenos, aunque no tan eficaz como lo es con fluconazol por lo que se puede proponer la búsqueda de un método para poder potencializar el efecto de los metabolitos del extracto y así aumentar la inhibición para mejorar el efecto antagónico contra los hongos fitopatógenos. Existen diversos metabolitos que se pueden obtener de los extractos de *Bacillus* sp. para ayudar a obtener efectos inhibitorios contra los hongos fitopatógenos como los lipopéptidos o las toxinas (Ramírez *et al.*, 2021) algunos de los metabolitos secundarios documentados previamente por parte de *B. velezensis* son surfactina, fengicina, iturina, bacilisina, amilociclina, amilolisina, diffidina, bacillaene y macrolactinas (Palazzini *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Cawoy *et al.*, 2015; Babalola *et al.*, 2019; Ma y Hu, 2019), estos compuestos presentan efectos antagónicos contra hongos fitopatógenos por lo que se pueden crear extractos con el sobrenadante de la bacteria.

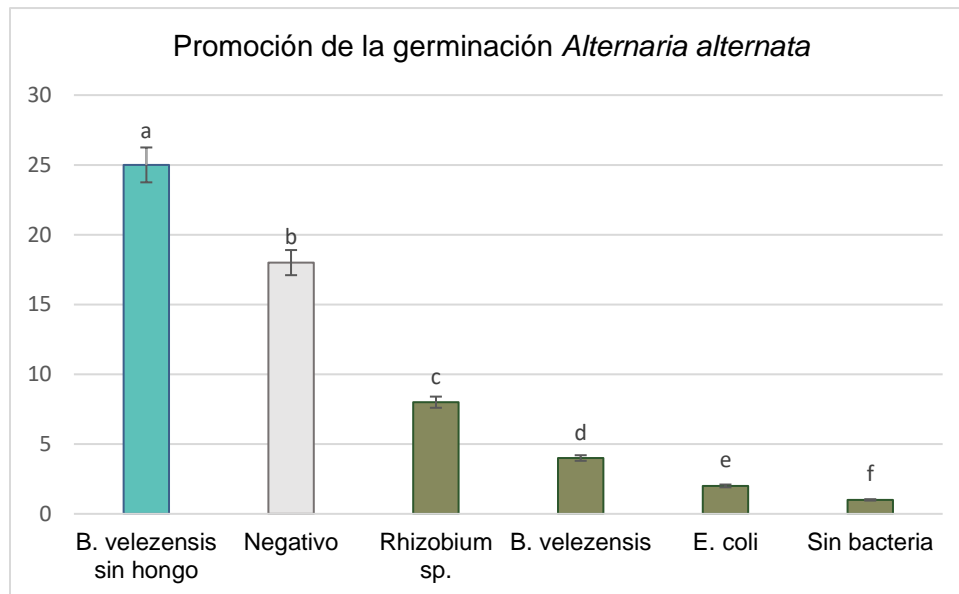
8.4 Determinación de la promoción de la germinación

Se realizó el conteo de semillas germinadas en cada condición y los resultados fueron:

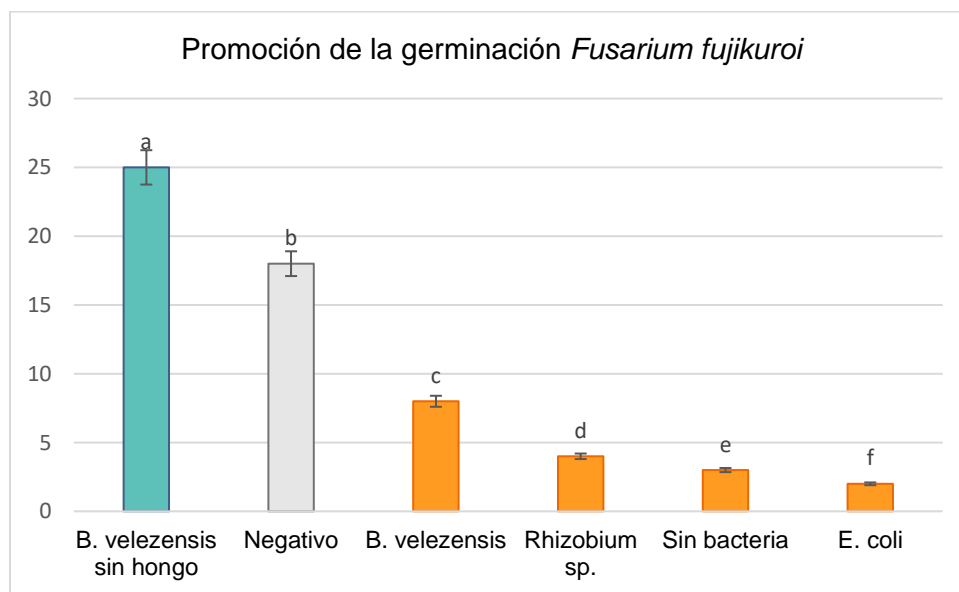
Tabla 9. Germinaciones obtenidas en las semillas de jitomate al ser inoculadas con las bacterias de estudio e infectadas con los hongos fitopatógenos, en cada condición se utilizaron 30 semillas

<i>Fusarium oxysporum</i> CENAGRO1			
<i>B. velezensis</i> LEM1054	Sin bacteria	<i>E. coli</i> BL21DE3	<i>Rhizobium</i> sp. LEM1061
17	8	5	4
<i>Fusarium fujikuroi</i> CENAGRO2			
<i>B. velezensis</i> LEM1054	<i>Rhizobium</i> sp. LEM1061	Sin bacteria	<i>E. coli</i> BL21DE3
8	4	3	2
<i>Alternaria alternata</i> CENAGRO3			
<i>Rhizobium</i> sp. LEM1061	<i>B. velezensis</i> LEM1054	<i>E. coli</i> BL21DE3	Sin bacteria
8	4	2	1
Sin hongo / Sin bacteria		Sin hongo / <i>B. velezensis</i> LEM1054	
18		25	

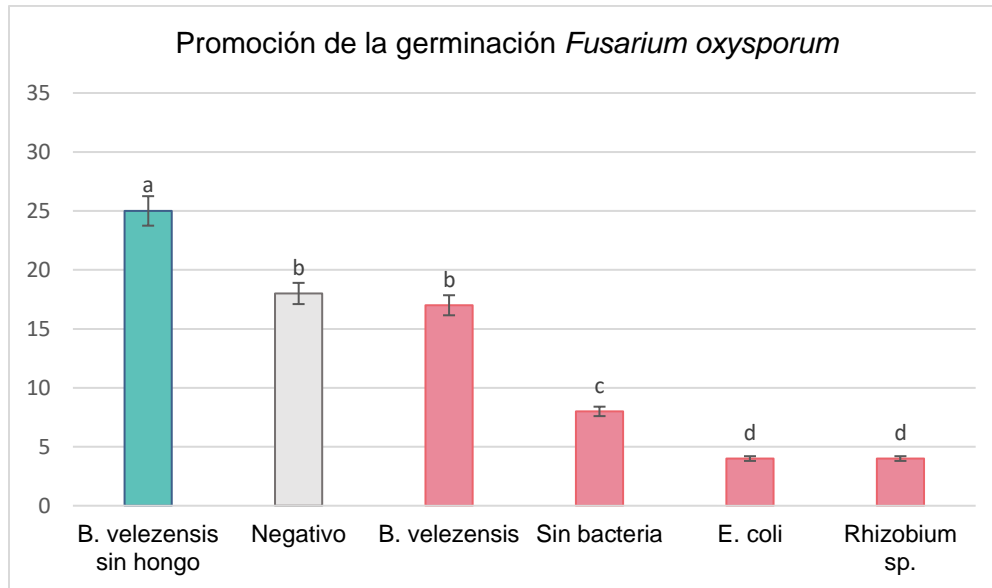
Al realizar la prueba estadística por el método ANOVA se obtuvo que todos los resultados de p en los tres hongos fueron $p < 1$ lo que significa que los valores son significativos estadísticamente, esto se puede analizar en las gráficas:



Grafica 1. Promoción de la germinación con *Alternaria alternata*



Grafica 2. Promoción de la germinación con *Fusarium fujikuroi*



Grafica 3. Promoción de la germinación con *Fusarium oxysporum*

Al observar las gráficas se puede apreciar cómo fue la germinación de las semillas al ser expuestas en distintas condiciones, se puede ver como las semillas a las que solo se les inoculó la cepa de *B. velezensis* LEM1054 presentaron una mejor germinación frente a aquellas semillas que no tuvieron ninguna inoculación (Tabla 9) demostrando así que la bacteria tiene propiedades que favorecen la promoción de la germinación en las semillas de jitomate. *B. velezensis* LEM1054 es una bacteria que se obtuvo de aislamiento de nódulos de *Prosopis laevigata* lo cual es un tipo de bacteria ideal que favorece la protección de las plantas de jitomate, así como presenta influencia en su crecimiento (Ramírez *et al.*, 2021; Subramanian *et al.*, 2016)

Analizando también las semillas que fueron inoculadas con los hongos fitopatógenos se obtuvo que en el caso de las semillas inoculadas con *Fusarium oxysporum* CENAGRO1 y *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 (Gráficas 2 y 3) presentaron un mejor crecimiento al también haber sido inoculadas con *B. velezensis* LEM1054 en comparación a las otras semillas que tenían el hongo con *E. coli* BL21DE3, *Rhizobium* sp. LEM1061 y el control sin bacteria, demostrando que *B. velezensis* es una bacteria que inhibe el crecimiento de hongos fitopatógenos así como también presenta una capacidad de promoción de la germinación y así favoreciendo el crecimiento de la planta, la protección que tiene la planta por parte de *B. velezensis* se debe mucho a que la bacteria genera un mecanismo de resistencia al ser inducido como mecanismo principal de control biológico, es decir, su protección aumenta al ser inoculado antes de la aparición del hongo (Ramírez *et al.*, 2021), la inoculación

temprana de la bacteria a las semillas favorece una buena producción de enzimas, lipopéptidos, bacteriocinas o compuestos de ácido ftálico que se encargaran de la protección de las semillas de los hongos al germinar (Chang *et al.*, 2007; Ferraz *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2011; Romeiro *et al.*, 2010). Aunque en el caso de *Alternaria alternata* CENAGRO3 se obtuvo una mayor promoción de germinación con la bacteria *Rhizobium* sp. LEM1061 dejando a *B. velezensis* LEM1054 en segundo lugar (Gráfica 1), esto se puede deber a que *Rhizobium* sp. LEM1061 es una bacteria que tiene la propiedad de promover el crecimiento en las plantas debido a que es una bacteria aislada de nódulos de *Prosopis laevigata* misma donde se aisló *B. velezensis* LEM1054, al ser rizobacterias tienen la capacidad de favorecer el crecimiento de las plantas ocasionando que presentaran una buena germinación (Subramanian *et al.*, 2016), a pesar de presentar una favorable promoción a la germinación no genera la inhibición del hongo fitopatógeno como se ha demostrado en las pruebas anteriores donde está en contacto el hongo con la bacteria.

8.5 Detección de surfactantes producidos por *B. velezensis* LEM1054

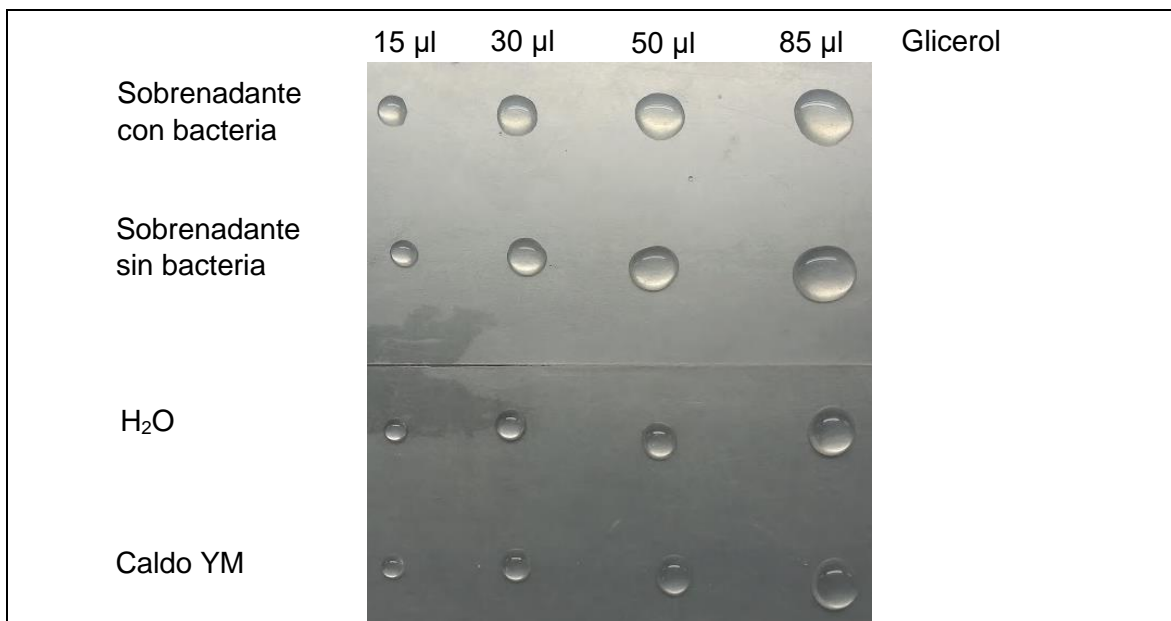


Figura 8. Prueba de detección de biosurfactantes utilizando 15, 30, 50 y 85 µl de glicerol agregando la misma cantidad de sobrenadante con y sin *B. velezensis* LEM1054, agua y caldo YM modificado

En esta prueba se observa la capacidad que presenta *B. velezensis* de liberar compuestos surfactantes que son capaces de ocasionar el colapso de la gota de glicerol (Figura 8), en esta prueba se observa que al agregar una determinada cantidad de glicerol junto con la misma cantidad de caldo YM con la bacteria *B. velezensis* LEM1054 se genera un

esparcimiento haciendo que la gota formada pierda sus propiedades de tensión interfacial entre el glicerol y el caldo reduciendo la superficie hidrófoba y así ocasionando que la parte acuosa se extienda sobre la superficie hidrófoba observando que pierde esa característica forma aperlada (Bodour *et al.*, 1998), si se centrifuga el caldo con el inóculo y tomamos solo el sobrenadante se puede observar que se forma dicho colapso, demostrando que la bacteria libera suficientes compuestos surfactantes que ocasionan la disminución de la tensión interfacial del glicerol, demostrando que el sobrenadante es efectivo para utilizarlo como antagonista de hongos fitopatógenos. En todas las concentraciones se logró apreciar dicha pérdida de la tensión interfacial siendo en una concentración de 15 μl la que presentó un colapso a los 5 segundos de inocular el sobrenadante con la bacteria y con 85 μl se presentó el colapso a los 30 segundos de la inoculación, en el caso del sobrenadante sin la bacteria el colapso se presentó en un tiempo de 15 segundos en la concentración de 15 μl y de un minuto para la concentración de 85 μl , esto nos indica que el sobrenadante sin la bacteria presenta una menor cantidad de biosurfactantes pero aun así es efectiva para ocasionar el colapso de la gota de glicerol.

En esta prueba se agregaron controles negativos los cuales sirvieron para conocer como se ve el glicerol sin presentar los efectos de las surfactinas, en los cuales se puede observar que las gotas se mantienen completamente redondas y sin sufrir ningún efecto de derrame, se utilizó control negativo de agua como referencia principal y se utilizó caldo YM, esto con el fin de demostrar que dicho caldo no genera ningún efecto aglutinante y no influye en la realización de la prueba al utilizar el medio con la bacteria y sus metabolitos. Las gotas del control negativo permanecerán con su forma aperlada debido a que el glicerol al ser un componente hidrofóbico sin tensioactivos repelerá el agua o caldo YM rechazando sus moléculas polares en la superficie hidrófoba y por lo tanto mantendrá esta forma esférica (Bodour *et al.*, 1998).

Los compuestos surfactantes han demostrado tener la capacidad de alterar la membrana celular de los microorganismos, aun no se conoce en totalidad el mecanismo de acción que presentan, pero hoy en día se conoce que actúan de manera similar a un detergente y alteran la integridad de los fosfolípidos ocasionando su degradación (Usmanova *et al.*, 2018), así como también la pérdida de contenido vesicular (Carrillo *et al.*, 2003; Sheppard *et al.*, 1991), provocando fluctuaciones estructurales (Nitschke, 2004).

9. CONCLUSIÓN

Bacillus velezensis es una bacteria que presenta la capacidad para inhibir el desarrollo de hongos fitopatógenos, demostrándose su efecto en *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*.

Se demostró que *B. velezensis* libera compuestos orgánicos volátiles que limitan el crecimiento de hongos fitopatógenos.

Se comprobó que *B. velezensis* presenta efectos positivos en la promoción de la germinación del jitomate, incluso en presencia de hongos fitopatógenos causantes de estrés biótico.

Los extractos obtenidos de *B. velezensis*, utilizando cloroformo como solvente, presentan propiedades inhibitorias, pero se deben de buscar métodos de extracción más eficientes para que los metabolitos presenten resultados más favorables de inhibición.

Se demostró que *B. velezensis* es capaz de liberar compuestos surfactantes, los cuales son de naturaleza lipopeptídica, que promueven la inhibición de hongos fitopatógenos.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Adeniji, A. A., Loots, D. T., & Babalola, O. O. (2019). *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103(9), 3669-3682. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09710-5>
- 2) Agencia de Noticias Mvt, (2010, 30 agosto). Fracasan 60% de invernaderos de hidroponía por falta de capacitación. *Agencia de Noticias MVT*. <https://mvt.com.mx/fracasan-60-de-invernaderos-de-hidroponia-por-falta-de-capacitacion/>
- 3) Akroum, S., & Rouibah, M. (2020). Utilisation d'extraits méthanoliques de plantes pour la protection des cultures de tomates-cerises (*Solanum lycopersicum var. cerasiforme*) contre l'infection fongique par *Alternaria alternata*. *Biologie Aujourd'hui*, 214(1-2), 55-61. <https://doi.org/10.1051/jbio/2020001>
- 4) Al-Ali, A., Deravel, J., Krier, F., Béchet, M., Ongena, M., & Jacques, P. (2017). Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(30), 29910-29920. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0469-1>
- 5) Alenezi, F. N., Slama, H. B., Bouket, A. C., Cherif-Silini, H., Silini, A., Luptakova, L., Nowakowska, J. A., Oszako, T., & Belbahri, L. (2021). *Bacillus velezensis*: A Treasure House of Bioactive Compounds of Medicinal, Biocontrol and Environmental Importance. *Forests*, 12(12), 1714. <https://doi.org/10.3390/f12121714>
- 6) Arora, N. K., & Mishra, J. (2016). Prospecting the roles of metabolites and additives in future bioformulations for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 107, 405-407. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.05.020>
- 7) Arora, N. K., Mishra, J., & Mishra, V. (2020). *Microbial Enzymes: Roles and Applications in Industries: 11* (2020 ed.). Springer.
- 8) Babalola, O. O., Ayangbenro, A. S., & Olanrewaju, O. S. (2019). Draft Genome Sequences of Three Rhizospheric Plant Growth-Promoting Bacteria. *Microbiology Resource Announcements*, 8(26). <https://doi.org/10.1128/mra.00455-19>
- 9) Belbahri, L., Chenari Bouket, A., Rekik, I., Alenezi, F. N., Vallat, A., Luptakova, L., Petrovova, E., Oszako, T., Cherrad, S., Vacher, S., & Rateb, M. E. (2017). Comparative Genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* Strains Reveals a Core Genome with Traits for Habitat Adaptation and a Secondary Metabolites Rich Accessory Genome. *Frontiers in Microbiology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01438>
- 10) Bodour, A. A., & Miller-Maier, R. M. (1998). Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 32(3), 273-280. [https://doi.org/10.1016/s0167-7012\(98\)00031-1](https://doi.org/10.1016/s0167-7012(98)00031-1)
- 11) Borriss, R. (2014). *Bacillus*, A Plant-Beneficial Bacterium. *Principles of Plant-Microbe Interactions*, 379-391. https://doi.org/10.1007/978-3-319-08575-3_40

- 12) Bourke, A. (1964). Emergence of Potato Blight, 1843–46. *Nature*, 203(4947), 805-808. <https://doi.org/10.1038/203805a0>
- 13) Cabra Cendales, T., Rodríguez González, C. A., Villota Cuásquer, C. P., Tapasco Alzate, O. A., & Hernández Rodríguez, A. (2017). *Bacillus* effect on the germination and growth of tomato seedlings (*Solanum lycopersicum* L). *Acta Biológica Colombiana*, 22(1), 37. <https://doi.org/10.15446/abc.v22n1.57375>
- 14) Carrillo, C. I., Teruel, J. L. C., Aranda, F. J., & Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochimica Et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1611(1-2), 91-97. [https://doi.org/10.1016/s0005-2736\(03\)00029-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2736(03)00029-4)
- 15) Cawoy, H., Debois, D., Franzil, L., De Pauw, E., Thonart, P., & Ongena, M. (2014). Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*, 8(2), 281-295. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12238>
- 16) Chang, W. T., Chen, Y. C., & Jao, C. L. (2007). Antifungal activity and enhancement of plant growth by *Bacillus cereus* grown on shellfish chitin wastes. *Bioresource Technology*, 98(6), 1224-1230. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.005>
- 17) Chen, X., Huang, H., Zhang, S., Zhang, Y., Jiang, J., Qiu, Y., Liu, J., & Wang, A. (2021). *Bacillus velezensis* WZ-37, a New Broad-Spectrum Biocontrol Strain, Promotes the Growth of Tomato Seedlings. *Agriculture*, 11(7), 581. <https://doi.org/10.3390/agriculture11070581>
- 18) Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. A. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9), 4951-4959. <https://doi.org/10.1128/aem.71.9.4951-4959.2005>
- 19) De La Fuente, L., Quagliotto, L., Bajsa, N., Fabiano, E., Altier, N., & Arias, A. (2002). Inoculation with *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains does not affect the symbiosis between rhizobia and forage legumes. *Soil Biology and Biochemistry*, 34(4), 545-548. [https://doi.org/10.1016/s0038-0717\(01\)00194-8](https://doi.org/10.1016/s0038-0717(01)00194-8)
- 20) Di Pietro, A., García-Maceira, F. I., Megléc, E., & Roncero, M. B. (2001). A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 39(5), 1140-1152. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2001.02307.x>
- 21) Ferraz, H. G. M., Resende, R. S., Silveira, P. R., Andrade, C. C. L., Milagres, E. A., Oliveira, J. R., & Rodrigues, F. D. V. (2014). Rhizobacteria induces resistance against *Fusarium* wilt of tomato by increasing the activity of defense enzymes. *Bragantia*, 73(3), 274-283. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.0124>
- 22) Gao, H., Li, P., Xu, X., Zeng, Q., & Guan, W. (2018). Research on Volatile Organic Compounds From *Bacillus subtilis* CF-3: Biocontrol Effects on Fruit Fungal Pathogens and

- Dynamic Changes During Fermentation. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00456>
- 23) Gardener, B. B. M., & Fravel, D. R. (2002). Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. *Plant Health Progress*, 3(1). <https://doi.org/10.1094/php-2002-0510-01-rv>
- 24) Gardi C, Jeffrey S. (2009) Soil biodiversity. *Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability. Ed. Scientific and Technical Research series*, p. 16-18. <https://doi.org/10.2788/7831>
- 25) González, I., Yailén, A., & Peteira, B. (2012). ASPECTOS GENERALES DE LA INTERACCIÓN *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-TOMATE. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1), 1-7. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v27n1/rpv01112.pdf>
- 26) Gotor-Vila, A., Teixidó, N., Di Francesco, A., Usall, J., Ugolini, L., Torres, R., & Mari, M. (2017). Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. *Food Microbiology*, 64, 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.006>
- 27) Guo, Q., Li, Y., Lou, Y., Shi, M., Jiang, Y., Zhou, J., Sun, Y., Xue, Q., & Lai, H. (2019). *Bacillus amyloliquefaciens* Ba13 induces plant systemic resistance and improves rhizosphere microecology against tomato yellow leaf curl virus disease. *Applied Soil Ecology*, 137, 154-166. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.01.015>
- 28) Gupta, V. K., & Ali, I. (2008). Removal of Endosulfan and Methoxychlor from Water on Carbon Slurry. *Environmental Science & Technology*, 42(3), 766-770. <https://doi.org/10.1021/es7025032>
- 29) Halloin, J. M., De Zoeten, G., Gaard, G., & Walker, J. C. (1970). The Effects of Tentoxin on Chlorophyll Synthesis and Plastid Structure in Cucumber and Cabbage. *Plant Physiology*, 45(3), 310-314. <https://doi.org/10.1104/pp.45.3.310>
- 30) Hazarika, D. J., Goswami, G., Gautom, T., Parveen, A., Das, P., Barooah, M., & Boro, R. C. (2019). Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. *BMC Microbiology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1440-8>
- 31) Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Valle, M. G. V., & Hernández-Rodríguez, A. (2006). Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(1), 66-74. <http://www.redalyc.org/pdf/612/61225109.pdf>
- 32) Idris, E. E., Iglesias, D. J., Talon, M., & Borriss, R. (2007). Tryptophan-Dependent Production of Indole-3-Acetic Acid (IAA) Affects Level of Plant Growth Promotion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 20(6), 619-626. <https://doi.org/10.1094/mpmi-20-6-0619>
- 33) Instituto Colombiano Agropecuario (2018). *FUSARIUM R4T*. Comunicaciones del Instituto Colombiano Agropecuario. <https://www.ica.gov.co/icacomunica/pyp/fusarium-r4t>

- 34) Ippolito, A., & Nigro, F. (2000). Impact of preharvest application of biological control agents on postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Crop Protection*, 19(8-10), 715-723. [https://doi.org/10.1016/s0261-2194\(00\)00095-8](https://doi.org/10.1016/s0261-2194(00)00095-8)
- 35) 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), 59-65. <https://doi.org/10.5941/myco.2012.40.1.059>
- 36) Ivanoff, S. S., & Keitt, G. W. (1937). The occurrence of aerial bacterial strands on blossoms, fruits, and shoots blighted by *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 27(6), 702-709. <https://eurekamag.com/research/025/871/025871156.php>
- 37) Kai, K., Wang, R., Bi, W., Ma, Z., Shi, W., Ye, Y., & Zhang, D. (2021). Chlorogenic acid induces ROS-dependent apoptosis in *Fusarium fujikuroi* and decreases the postharvest rot of cherry tomato. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 37(6). <https://doi.org/10.1007/s11274-021-03062-x>
- 38) Lee, B., Farag, M. A., Park, H. B., Kloepper, J. W., Lee, S. H., & Ryu, C. M. (2012). Induced Resistance by a Long-Chain Bacterial Volatile: Elicitation of Plant Systemic Defense by a C13 Volatile Produced by *Paenibacillus polymyxa*. *PLoS ONE*, 7(11), e48744. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048744>
- 39) Liu, G., Kong, Y., Fan, Y., Geng, C., Peng, D., & Sun, M. (2017). Whole-genome sequencing of *Bacillus velezensis* LS69, a strain with a broad inhibitory spectrum against pathogenic bacteria. *Journal of Biotechnology*, 249, 20-24. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.03.018>
- 40) Liu, S., Fu, L., Wang, S., Chen, J., Jiang, J., Che, Z., Tian, Y., & Chen, G. (2019). Carbendazim Resistance of *Fusarium graminearum* From Henan Wheat. *Plant Disease*, 103(10), 2536-2540. <https://doi.org/10.1094/pdis-02-19-0391-re>
- 41) Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 506-577. <https://doi.org/10.1128/mnbr.66.3.506-577.2002>
- 42) Ma, Z., & Hu, J. (2019). Complete genome sequence of a marine-sediment-derived bacterial strain *Bacillus velezensis* SH-B74, a cyclic lipopeptides producer and a biopesticide. *3 Biotech*, 9(4). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1694-8>
- 43) Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R. (2016). Effects of Pesticides on Environment. *Plant, Soil and Microbes*, 253-269. https://doi.org/10.1007/978-3-319-27455-3_13
- 44) Mateus, J. R., Dal'Rio, I., Jurelevicius, D., da Mota, F. F., Marques, J. M., Ramos, R. T. J., da Costa da Silva, A. L., Gagliardi, P. R., & Seldin, L. (2021). *Bacillus velezensis* T149-19 and *Bacillus safensis* T052-76 as Potential Biocontrol Agents against Foot Rot Disease in Sweet Potato. *Agriculture*, 11(11), 1046. <https://doi.org/10.3390/agriculture11111046>

- 45) Mathre, D. E., Cook, R. J., & Callan, N. W. (1999). From Discovery to Use: *Traversing the World of Commercializing Biocontrol Agents for Plant Disease Control*. *Plant Disease*, 83(11), 972-983. <https://doi.org/10.1094/pdis.1999.83.11.972>
- 46) Miller, R. N. G., Costa Alves, G. S., & Van Sluys, M. A. (2017). Plant immunity: unravelling the complexity of plant responses to biotic stresses. *Annals of Botany*, 119(5), 681-687. <https://doi.org/10.1093/aob/mcw284>
- 47) Miller, T. G. (2004). *Sustaining the Earth: An Integrated Approach* (6.^a ed.). Brooks Cole.
- 48) Mire, G. L., Nguyen, M. L., Fassotte, B., Jardin, P. D., Verheggen, F., Delaplace, P., & Jijakli, M. H. (2016). Review: implementing plant biostimulants and biocontrol strategies in the agroecological management of cultivated ecosystems. *BASE*, 299-313. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.12717>
- 49) Mishra, J., & Arora, N. K. (2018). Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture. *Applied Soil Ecology*, 125, 35-45. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.12.004>
- 50) Nguyen, M. L., Glaes, J., Spaepen, S., Bodson, B., Jardin, P., & Delaplace, P. (2019). Biostimulant effects of *Bacillus* strains on wheat from *in vitro* towards field conditions are modulated by nitrogen supply. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 182(3), 325-334. <https://doi.org/10.1002/jpln.201700610>
- 51) Niehaus, E. M., Kim, H. K., Münsterkötter, M., Janevska, S., Arndt, B., Kalinina, S. A., Houterman, P. M., Ahn, I. P., Alberti, I., Tonti, S., Kim, D. W., Sieber, C. M. K., Humpf, H. U., Yun, S. H., Güldener, U., & Tudzynski, B. (2017). Comparative genomics of geographically distant *Fusarium fujikuroi* isolates revealed two distinct pathotypes correlating with secondary metabolite profiles. *PLOS Pathogens*, 13(10), e1006670. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006670>
- 52) Nitschke, M. (2004). *Produção e caracterização de biossurfatantes de B. subtilis utilizando manipueira como substrato*. Universidade Estadual de Campinas.
- 53) Niu, D. D., Liu, H. X., Jiang, C. H., Wang, Y. P., Wang, Q. Y., Jin, H. L., & Guo, J. H. (2011). The Plant Growth-Promoting Rhizobacterium *Bacillus cereus* AR156 Induces Systemic Resistance in *Arabidopsis thaliana* by Simultaneously Activating Salicylate- and Jasmonate/Ethylene-Dependent Signaling Pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions®*, 24(5), 533-542. <https://doi.org/10.1094/mpmi-09-10-0213>
- 54) Palazzini, J. M., Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Chulze, S. N. (2016). *Bacillus velezensis* RC 218 as a biocontrol agent to reduce *Fusarium* head blight and deoxynivalenol accumulation: Genome sequencing and secondary metabolite cluster profiles. *Microbiological Research*, 192, 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.06.002>
- 55) Pareja-Jaime, Y., Roncero, M. B., & Ruiz-Roldán, M. C. (2008). Tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Is Required for Full Virulence on Tomato Plants. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 21(6), 728-736. <https://doi.org/10.1094/mpmi-21-6-0728>

- 56) Park, B. H., Lee, B., Kloepper, J. W., & Ryu, C. M. (2013). One shot-two pathogens blocked: exposure of *Arabidopsis* to hexadecane, a long chain volatile organic compound, confers induced resistance against both *Pectobacterium carotovorum* and *Pseudomonas syringae*. *Plant Signaling & Behavior*, 8(7), e24619. <https://doi.org/10.4161/psb.24619>
- 57) Ramírez, V., Baez, A., López, P., Bustillos, R., Villalobos, M. N., 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01833>
- 58) Ramírez, V., Martínez, J., Bustillos-Cristales, M. D. R., Catañeda-Antonio, D., Munive, J., & Baez, A. (2021). *Bacillus cereus* MH778713 elicits tomato plant protection against *Fusarium oxysporum*. *Journal of Applied Microbiology*, 132(1), 470-482. <https://doi.org/10.1111/jam.15179>
- 59) 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00741>
- 60) Romeiro, R. S., Lanna Filho, R., Macagnan, D., Garcia, F. A., & Silva, H. S. (2010). Evidence that the biocontrol agent *Bacillus cereus* synthesizes protein that can elicit increased resistance of tomato leaves to *Corynespora cassicola*. *Trans/Form/Ação*, 35(1). <https://doi.org/10.1590/s1982-56762010000100002>
- 61) Romero-Arenas, O., Olguín, J. F. L., Ramón, D. J., Sangerman-Jarquín, D. M., Lezama, C. P., Morales, P. S., & Lara, M. H. (2018). Biological Control of *Fusarium oxysporum* in Tomato Seedling Production with Mexican Strains of *Trichoderma*. *Fusarium - Plant Diseases, Pathogen Diversity, Genetic Diversity, Resistance and Molecular Markers*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.72878>
- 62) Runkle, J., Flocks, J., Economos, J., & Dunlop, A. L. (2017). A systematic review of Mancozeb as a reproductive and developmental hazard. *Environment International*, 99, 29-42. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.006>
- 63) Ryu, C. M., Farag, M. A., Hu, C. H., Reddy, M. S., Kloepper, J. W., & Paré, P. W. (2004). Bacterial Volatiles Induce Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 134(3), 1017-1026. <https://doi.org/10.1104/pp.103.026583>
- 64) Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2021). *Escenario mensual de productos agroalimentarios: Tomate rojo (Jitomate)*. Gobierno de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/687048/Escenario_jitomate_nov21.pdf
- 65) Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2022). *Escenario mensual de productos agroalimentarios: Tomate rojo (Jitomate)*. Gobierno de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/753618/Jitomate_Julio.pdf

- 66) Serrano -Carreón, L. & Galindo-Fentanes, E. (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia - Academia Mexicana de Ciencias*, 58(1), 77-89. <https://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-academia-mexicana-de-ciencias/articulo/control-biologico-de-organismos-fitopatogenos-un-reto-multidisciplinario>
- 67) Sheppard, J. D., Jumarie, C., Cooper, D. G., & Laprade, R. (1991). Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1064(1), 13-23. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(91\)90406-x](https://doi.org/10.1016/0005-2736(91)90406-x)
- 68) Slininger, P. J., Behle, R. W., Jackson, M. A., & Schisler, D. A. (2003). Discovery and development of biological agents to control crop pests. *Neotropical Entomology*, 32(2), 183-195. <https://doi.org/10.1590/s1519-566x2003000200001>
- 69) Smith, H. S. (1919). On Some Phases of Insect Control by the Biological Method. *Journal of Economic Entomology*, 12(4), 288-292. <https://doi.org/10.1093/jee/12.4.288>
- 70) Subramanian, S., Souleimanov, A., & Smith, D. L. (2016). Proteomic Studies on the Effects of Lipo-Chitooligosaccharide and Thuricin 17 under Unstressed and Salt Stressed Conditions in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01314>
- 71) Sukumaran, R. K., Singhania, R. R., & Pandey, A. (2005). Microbial cellulases — Production, applications, and challenges. *Journal of Scientific & Industrial Research*, 64(11), 832-844. <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/5375>
- 72) Thomma, B. P. H. J. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4), 225-236. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2003.00173.x>
- 73) Tsujibo, H., Kubota, T., Yamamoto, M., Miyamoto, K., & Inamori, Y. (2003). Characterization of Chitinase Genes from an Alkaliphilic Actinomycete, *Nocardiaopsis prasina* OPC-131. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(2), 894-900. <https://doi.org/10.1128/aem.69.2.894-900.2003>
- 74) Thuleau, P., Graziana, A., Rossignol, M., Kauss, H., Auriol, P., & Ranjeva, R. (1988). Binding of the phytotoxin zinniol stimulates the entry of calcium into plant protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(16), 5932-5935. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.16.5932>
- 75) Ulloa-Ogaz, A. L., Muñoz-Castellanos, L. N., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2015). Biocontrol of phytopathogens: Antibiotic production as mechanism of control. *Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, 305–309.
- 76) Usmanova, L. S., Ziganshin, M. A., Rakipov, I. T., Lyadov, N. M., Klimovitskii, A. E., Mukhametzyanov, T. A., & Gerasimov, A. V. (2018). Microspherical Particles of Solid Dispersion of Polyvinylpyrrolidone K29-32 for Inhalation Administration. *BioMed Research International*, 2018, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2018/2412156>
- 77) Villoch A, Montes de Oca N, Hidalgo L. Elaboration of a guideline of good practices for biocontrol production. (2003) *Rev. Protección Veg.* 18:92-97

- 78) Wang, C., Wang, Z., Qiao, X., Li, Z., Li, F., Chen, M., Wang, Y., Huang, Y., & Cui, H. (2013). Antifungal activity of volatile organic compounds from *Streptomyces alboflavus* TD-1. *FEMS Microbiology Letters*, *341*(1), 45-51. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12088>
- 79) Wu, B., Wang, X., Yang, L., Yang, H., Zeng, H., Qiu, Y., Wang, C., Yu, J., Li, J., Xu, D., He, Z., & Chen, S. (2016). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* ZM9 on bacterial wilt and rhizosphere microbial communities of tobacco. *Applied Soil Ecology*, *103*, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.03.002>
- 80) Xu, Z., Zhang, H., Sun, X., Liu, Y., Yan, W., Xun, W., Shen, Q., & Zhang, R. (2019). *Bacillus velezensis* Wall Teichoic Acids Are Required for Biofilm Formation and Root Colonization. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(5). <https://doi.org/10.1128/aem.02116-18>
- 81) Yao, A. V., Bochow, H., Karimov, S., Boturov, U., Sanginboy, S., & Sharipov, A. K. (2006). Effect of FZB 24® *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*, *39*(4), 323-328. <https://doi.org/10.1080/03235400600655347>
- 82) Ye, M., Tang, X., Yang, R., Zhang, H., Li, F., Tao, F., Li, F., & Wang, Z. (2018). Characteristics and Application of a Novel Species of *Bacillus*: *Bacillus velezensis*. *ACS Chemical Biology*, *13*(3), 500-505. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00874>
- 83) Zhang, H., Kim, M. S., Sun, Y., Dowd, S. E., Shi, H., & Paré, P. W. (2008). Soil Bacteria Confer Plant Salt Tolerance by Tissue-Specific Regulation of the Sodium Transporter *HKT1*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, *21*(6), 737-744. <https://doi.org/10.1094/mpmi-21-6-0737>

11. ANEXOS

11.1 Anexo 1

Preparación de medios YMA y YM modificado

Estos medios se preparaban con el siguiente material para 1 litro:

- 10 g de manitol
- 1 g de extracto de levadura
- 0.5 g de ácido glutámico
- Agua destilada
- Para YMA 14 g de agar

Esta preparación fue preparada a un pH de 6.8 la cual es ideal en el medio.

11.2 Anexo 2

Prueba ANOVA para determinar % de germinación

Con estos resultados se realizaron las pruebas ANOVA para cada hongo y se mostraron los siguientes valores estadísticos:

Para *Alternaria alternata* CENAGRO3:

Tabla 10. Promedios y varianzas obtenidos de las semillas al ser expuestas con *Alternaria alternata* CENAGRO3 con una bacteria

Grupos	Suma	Promedio	Varianza
<i>B. velezensis</i> LEM1054	4	1.33	0.33
<i>Rhizobium</i> sp. LEM1061	8	2.67	1.33
<i>E. coli</i> BL21DE3	2	0.67	1.33
Sin bacteria	1	0.33	0.33

Tabla 11. Análisis de varianza en semillas infectadas de *Alternaria alternata*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	9.58333333	3	3.19444444	3.83333333	0.057072006	4.066180551
Dentro de los grupos	6.66666667	8	0.83333333			
Total	16.25	11				

Para *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2:

Tabla 12. Promedios y varianzas obtenidos de las semillas al ser expuestas con *Fusarium fujikuroi* CENAGRO2 con una bacteria

Grupos	Suma	Promedio	Varianza
<i>B. velezensis</i> LEM1054	8	2.67	0.33
<i>Rhizobium</i> sp. LEM1061	4	1.33	0.33
<i>E. coli</i> BL21DE3	2	0.67	0.33
Sin bacteria	3	1	0

Tabla 13. Análisis de varianza en semillas infectadas de *Fusarium fujikuroi*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	6.916666667	3	2.305555556	9.2222222	0.00564105	4.066180551
Dentro de los grupos	2	8	0.25			
Total	8.916666667	11				

Para *Fusarium oxysporum* CENAGRO1:

Tabla 14. Promedios y varianzas obtenidos de las semillas al ser expuestas con *Fusarium oxysporum* con una bacteria

Grupos	Suma	Promedio	Varianza
<i>B. velezensis</i> LEM1054	17	5.67	2.33
<i>Rhizobium</i> sp. LEM1061	4	1.33	1.33
<i>E. coli</i> BL21DE3	4	1.33	0.33
Sin bacteria	8	2.67	6.33

Tabla 15. Análisis de varianza en semillas infectadas de *Fusarium oxysporum*

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	37.58333333	3	12.52777778	4.84946237	0.032973323	4.066180551
Dentro de los grupos	20.66666667	8	2.583333333			
Total	58.25	11				