

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA
ESCUELA DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS**



**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE
BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL
Y SUS METABOLITOS CONTRA FITOPATÓGENOS DEL
CULTIVO DE FRIJOL”**

Presentada por:

MIRIAM ESTELA MEMENZA ZEGARRA

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTORIS PHILOSOPHIAE EN CIENCIAS E INGENIERÍA
BIOLÓGICAS**

























Lima - Perú

2023

Document Information

Analyzed document	tesis final reporte similitud.pdf (D164794011)
Submitted	4/23/2023 3:58:00 PM
Submitted by	Doris Zúñiga
Submitter email	dzuniga@lamolina.edu.pe
Similarity	1%
Analysis address	dzuniga.unalm@analysis.arkund.com

Sources included in the report

SA	submission.pptx Document submission.pptx (D134834951)	 	1
SA	TESIS Valeria Cos - Urkund.docx Document TESIS Valeria Cos - Urkund.docx (D98479849)	 	1
SA	Perfil de tesis Mauricio Lema PDF 1.pdf Document Perfil de tesis Mauricio Lema PDF 1.pdf (D127793333)	 	1
SA	TAPIA ANALISIS POR URKUND.docx Document TAPIA ANALISIS POR URKUND.docx (D138859767)	 	1
SA	Trabajo_de_titulación_Tambo_Gabriela-R-L_PLA.pdf Document Trabajo_de_titulación_Tambo_Gabriela-R-L_PLA.pdf (D155486019)	 	2
W	URL: https://link.springer.com/article/10.1186/1475-2859-12-29 Fetched: 10/3/2022 10:35:02 AM	 	1
SA	Perfil de tesis Mauricio Lema (1) (1).docx Document Perfil de tesis Mauricio Lema (1) (1).docx (D143167929)	 	2
W	URL: https://www.nature.com/articles/s41598-020-61729-1 Fetched: 5/2/2020 1:33:07 AM	 	1
SA	ERICK CHIZA_ANTEPROYECTO.docx Document ERICK CHIZA_ANTEPROYECTO.docx (D44280353)	 	1
W	URL: https://www.vanderbilt.edu/viibre/CryoPreservationManual.pdf Fetched: 4/23/2023 3:58:00 PM	 	1
SA	TESIS NORMA CAHUANA LAURA FINAL.pdf Document TESIS NORMA CAHUANA LAURA FINAL.pdf (D111611693)	 	3
SA	HFC PGPR genes de activación.docx Document HFC PGPR genes de activación.docx (D14962281)	 	1

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA BIOLÓGICAS

**“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE
BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL
Y SUS METABOLITOS CONTRA FITOPATÓGENOS DEL
CULTIVO DE FRIJOL”**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE DOCTOR

Doctoris Philosophiae

Presentada por:

MIRIAM ESTELA MEMENZA ZEGARRA

Sustentada y aprobada ante el siguiente jurado:

Ph.D. Gretty Villena Chávez
PRESIDENTE

Dra. Doris Zúñiga Dávila
ASESORA

Dr. Ernesto Ormeño Orrillo
MIEMBRO

Dra. Carmen Velezmoro Sánchez
MIEMBRO

Ph.D. Galdino Andrade Filho
MIEMBRO EXTERNO

DEDICATORIA

A Dios

Quien siempre me acompaña y me bendice, por permitirme culminar una etapa más de mi vida.

A mi familia

A mi esposo José y mis hijos Miriam Rosario y José Benjamín por ser el motor que me inspira a seguir siempre adelante en la realización de mis proyectos, mis sueños y en mi vocación de investigadora.

A mi madre

Estela Zegarra Sánchez por su amor y por su constante y valioso apoyo en toda mi vida personal y profesional y por impulsarme a lograr todos mis sueños.

A mi hermano

Por su apoyo, confianza y cariño que siempre me ha demostrado.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora de tesis, la Dra. Doris Zúñiga Dávila, por sus enseñanzas y consejos invaluable que me brindo para llevar a cabo esta investigación, y sobre todo por su confianza, estima y amistad durante todo este proceso.

A los miembros del jurado, la Dra. Gretty Villena, la Dra. Carmen Velezmoro, el Dr. Ernesto Ormeño y el Dr. Galdino Andrade por las valiosas contribuciones que hicieron al trabajo final y por el tiempo que dedicaron para revisarlo.

Al Dr. Galdino Andrade Filho por su acogida en su laboratorio de investigación de Ecología Microbiana en la universidad Estadual de Londrina, Brasil, así también, por su valioso apoyo y consejos durante la realización del trabajo de investigación.

Al Sr. Renán Moyano Córdova y el Sr. Napoleón Sánchez Alfaro por su valioso apoyo en todo momento durante la recolecta de material biológico en las zonas de Ica y Cajamarca, respectivamente.

A los agricultores de la zona de muestreo por su colaboración y recomendaciones en el manejo del cultivo durante la realización del trabajo.

A todos mis familiares y amigos que me apoyaron brindándome su tiempo para lograr la realización de este trabajo de investigación.

A los proyectos ITUNALM 04-2013 de la UNALM, N° 158-PNCIP-PIAP-2015 de Innóvate Perú, N° 009-2017 de Fondecyt y al proyecto 007-2000-Fondecyt-BM de ProCiencia los cuales financiaron la realización de este trabajo de investigación.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
2.1. Importancia del frijol común y la ocurrencia de enfermedades fúngicas.....	5
2.2. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal como agentes promotores en el control biológico de enfermedades.....	6
2.2.1. Colonización competitiva de la raíz.....	8
2.2.2. Actividad de biocontrol mediada por la síntesis de metabolitos.....	10
a. Competencia del hierro y el rol de los sideróforos.....	10
b. Antibiosis.....	11
c. Producción de enzimas líticas.....	12
d. Producción de compuestos orgánicos volátiles	13
e. Resistencia sistémica inducida.....	13
2.3. <i>Bacillus</i> agente de biocontrol.....	14
2.3.1. Enzimas líticas.....	15
2.3.2. Producción de compuestos orgánicos volátiles.....	16
2.3.3. Producción de sideróforos.....	17
2.3.4. Lipopéptidos biosurfactantes producidos por <i>Bacillus</i> sp.....	17
2.3.4.1. Surfactina.....	19
2.3.4.2. Iturina.....	19
2.3.4.3. Fengicina.....	20
2.3.5. Actividad antifúngica de los lipopéptidos biosurfactantes.....	20
2.4. <i>Pseudomonas</i> agente de control biológico.....	22
2.4.1. Antibiosis.....	23
a. Fenazinas.....	24
b. 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG).....	24
c. Pioluteorina	24
d. Pirrolnitrina.....	25
e. Cianuro de hidrógeno.....	25
f. Lipopéptidos.....	25
g. Sideróforos.....	26

2.4.2. Cepas de biocontrol de <i>Pseudomonas</i> : subgrupo de <i>Pseudomonas chlororaphis</i>	26
2.5. <i>Alcaligenes</i> agente de control biológico.....	27
2.6. <i>Serratia</i> agente de control biológico.....	27
2.7. <i>Achromobacter</i> agente de biocontrol.....	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.1. Recolección del suelo rizosférico y raíces con nódulos de rizobios en los campos de frijol.....	30
3.2. Caracterización del suelo rizosférico.....	30
3.3. Aislamiento de bacterias de la rizósfera de plantas de frijol.....	31
3.3.1. Aislamiento de bacterias Gram positivas esporuladas.....	31
3.3.2. Aislamiento de bacterias Gram negativas.....	31
3.3.3. Aislamiento y autenticación <i>in vitro</i> del género <i>Rhizobium</i>	32
a. Aislamiento de <i>Rhizobium</i>	32
b. Autenticación de las cepas de <i>Rhizobium</i>	32
3.4. Conservación de las bacterias aisladas.....	33
3.5. Recolección de material vegetal infectado por hongos fitopatógenos.....	33
3.6. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos de plantas de frijol infectadas.....	33
3.7. Selección <i>in vitro</i> de rizobacterias con actividad antifúngica.....	34
3.8. Caracterización molecular de las cepas bacterianas con actividad antagonista.....	34
3.8.1. Extracción de ADN genómico.....	35
3.8.2. Verificación de la calidad del ADN extraído.....	36
a. Preparación del gel de agarosa 1 por ciento.....	36
b. Corrida electroforética de las muestras.....	36
c. Tinción y revelado del gel.....	36
3.8.3. Amplificación del gen ARNr 16S.....	37
a. Bacterias Gram + y Gram –.....	37
b. <i>Rhizobium</i> sp.....	37
3.8.4. Purificación del producto de PCR.....	38
3.8.5. Secuenciamiento del gen ribosomal 16S y establecimiento de las relaciones filogenéticas.....	38

3.9. Caracterización bioquímica y fisiológica de las cepas bacterianas antagonistas.....	39
3.10. Caracterización de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de bacterias de la rizósfera con capacidad antifúngica.....	39
3.10.1 Producción de precursores de ácido indolacético (AIA).....	40
3.10.2. Determinación de la solubilización de fosfatos.....	40
3.11. Caracterización de la actividad antifúngica de rizobacterias mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles y no volátiles.....	41
3.11.1. Evaluación de la actividad antifúngica de rizobacterias mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs).....	41
3.11.2. Evaluación de la actividad antifúngica de rizobacterias mediante la producción de compuestos orgánicos no volátiles.....	42
3.11.2.1. Producción de enzimas hidrolíticas relacionadas a la actividad antagonista.....	42
a. Producción de lipasas.....	42
b. Producción de celulasas.....	42
c. Producción de proteasas.....	42
d. Producción de Quitinasas.....	43
3.11.2.2. Producción de sideróforos.....	43
3.11.2.3. Producción de lipopéptidos con actividad antifúngica.....	43
3.12. Determinación del tiempo de cultivo para la mayor producción de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica.....	44
3.13. Optimización de los componentes del cultivo para incrementar la producción de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica a nivel de matraz.....	45
3.14. Incremento de la producción de metabolitos antifúngicos por <i>Bacillus</i> IcBac2.1 usando biorreactor de tanque agitado modificado	48
3.15. Modelamiento matemático de la producción de metabolitos extracelulares.....	50
3.16. Purificación y caracterización de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica.....	51
3.16.1. Extracción de metabolitos con actividad antifúngica a partir del cultivo bacteriano.....	51
3.16.2. Purificación por cromatografía líquida al vacío y cromatografía Flash.....	52
3.16.3. Cromatografía en capa fina.....	53
3.16.4. Purificación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa.....	53

3.17. Identificación de los compuestos con actividad antifúngica por LC-MC.....	53
3.18. Caracterización de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica.....	54
3.18.1. Estabilidad a diferentes temperaturas y pH.....	54
3.18.2. Solubilidad en disolvente orgánico.....	54
3.18.3. Índice de emulsificación (E24).....	55
3.19. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	54
3.20. Identificación de metabolitos volátiles con actividad antifúngica por microextracción en fase sólida – cromatografía de gases – espectrometría de masas (SPME-GS-MS).....	55
3.21. Evaluación de la eficacia de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en el control de hongos fitopatógenos a nivel de campo.....	56
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.1. Caracterización de los suelos rizosféricos muestreados.....	58
4.2. Aislamiento y selección de bacterias de la rizósfera de plantas de frijol.....	62
4.3. Aislamiento y autenticación <i>in vitro</i> del género <i>Rhizobium</i>	65
4.4. Aislamiento e identificación de hongos fitopatógenos de plantas de frijol infectadas.....	66
4.5. Análisis filogenético e identificación molecular de bacterias antagonistas de la rizósfera de plantas de frijol.....	68
4.6. Análisis filogenético e identificación molecular del género <i>Rhizobium</i>	71
4.7. Caracterización bioquímica y fisiológica de las cepas bacterianas antagonistas.....	72
4.8. Caracterización de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de bacterias de la rizósfera con capacidad antifúngica.....	75
4.9. Caracterización de la actividad antifúngica de rizobacterias mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles y no volátiles.....	77
4.9.1. Actividad antifúngica de rizobacterias mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs).....	78
4.9.2. Actividad antifúngica de rizobacterias mediante la producción de compuestos orgánicos no volátiles.....	80
4.10. Determinación del tiempo de cultivo para la producción de metabolitos no volátiles con mayor actividad antifúngica.....	83
4.11. Optimización de los componentes del cultivo para la mayor producción de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica a nivel de matraz.....	83

4.11.1. Optimización de las fuentes de carbono y nitrógeno.....	83
4.11.2. Optimización de los elementos trazas.....	86
4.12. Incremento de la producción de metabolitos antifúngicos no volátiles por <i>Bacillus</i> IcBac2.1 usando biorreactor de tanque agitado modificado.....	92
4.13. Modelamiento matemático de la producción de metabolitos extracelulares.....	96
4.14. Caracterización de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica.....	98
4.14.1. Estabilidad a diferentes temperaturas y pH.....	98
4.14.2. Solubilidad en disolvente orgánico.....	99
4.14.3. Índice de emulsificación (E24).....	99
4.15. Purificación de metabolitos no volátiles con actividad antifúngica.....	100
4.16. Identificación de los compuestos con actividad antifúngica por LC-MC.....	104
4.17. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	108
4.18. Identificación de metabolitos volátiles con actividad antifúngica por microextracción en fase sólida – cromatografía de gases – espectrometría de masas (SPME-GS- MS).....	109
4.19. Evaluación de la eficacia de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en el control de hongos fitopatógenos a nivel de campo.....	111
V. CONCLUSIONES.....	116
VI. RECOMENDACIONES.....	118
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1: Condiciones de amplificación de PCR.....	38
Cuadro 2: Componentes del medio por cada factor propuesto en el diseño Plackett – Burman.....	46
Cuadro 3: Matriz del diseño Plackett – Burman mostrando las diferentes combinaciones de los 7 factores y sus niveles.....	47
Cuadro 4: Características de los campos muestreados.....	58
Cuadro 5: Parámetros meteorológicos de las localidades muestreadas.....	59
Cuadro 6: Características fisicoquímicas de las muestras de suelo rizosférico.....	60
Cuadro 7: Análisis poblacional de los microorganismos aislados a partir de las muestras suelo rizosférico.....	61
Cuadro 8: Total de cepas aisladas a partir de las diferentes muestras de suelo rizosférico y total de cepas antagonistas seleccionadas con sus respectivos códigos.....	62
Cuadro 9: Coeficiente de correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos del suelo, temperatura del suelo y el número total de bacterias aisladas.....	64
Cuadro 10: Perfil metabólico de las cepas antagonistas seleccionadas.....	65
Cuadro 11: Total de cepas aisladas a partir de nódulos colectados de campos de frijol común.....	66
Cuadro 12: Número de nódulos y peso seco de la parte aérea en la prueba de autenticación in vitro de la cepa MFC-2A.....	73
Cuadro 13: Perfil metabólico de las cepas antagonistas seleccionadas.....	77
Cuadro 14: Caracterización de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de las bacterias antagonistas seleccionadas.....	82
Cuadro 15: Producción de compuestos antifúngicos por las cepas seleccionadas.....	82
Cuadro 16: Actividad antagonista del crudo de lipopéptidos aislados del sobrenadante libre de células contra los hongos evaluados.....	87

Cuadro 17: Matriz del diseño Plackett - Burman mostrando las diferentes combinaciones de los 7 factores y sus niveles.....	88
Cuadro 18: Análisis de varianza de la producción de metabolitos antifúngicos del diseño Plackett – Burman.....	88
Cuadro 19: Matriz del diseño Box-Behnken para la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos por <i>Bacillus</i> IcBac2.1.....	89
Cuadro 20: ANOVA de la producción de metabolitos antifúngicos del diseño Box-Behnken.....	90
Cuadro 21: Parámetros cinéticos del crecimiento exponencial en los diferentes tratamientos evaluados.....	96
Cuadro 22: Parámetros cinéticos de la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos.....	97
Cuadro 23: Caracterización bioquímica del crudo de lipopéptidos producidos por <i>Bacillus</i> IcBac2.1.....	99
Cuadro 24: Actividad antifúngica contra <i>R. solani</i> , <i>S. sclerotiorum</i> y <i>F. oxysporum</i> obtenida a partir del sobrenadante libre de células de <i>Bacillus</i> IcBac2.1 cultivada en medio mínimo mineral. La actividad se midió por el halo de inhibición formado alrededor de la colonia (mm). Los resultados corresponden a una media de dos repeticiones.....	100
Cuadro 25: Características de lipopéptidos producidos por especies de <i>Bacillus</i>	107
Cuadro 26: CMI de extractos orgánicos de metabolitos antifúngicos obtenidos a partir del cultivo de <i>Bacillus</i> IcBac2.1.....	108
Cuadro 27: Perfil VOCs a partir de cultivos de cepas antagonistas usando microextracción en fase sólida (SPME).....	110
Cuadro 28: Análisis de ANOVA de la incidencia de la enfermedad causada por <i>S. sclerotiorum</i> en los tratamientos evaluados.....	111
Cuadro 29: Análisis de ANOVA del rendimiento de grano en los tratamientos evaluados.....	113

Cuadro 30: Efecto de *Bacillus* IcBac2.1 en el porcentaje de germinación de semillas y parámetros de crecimiento en plantas de frijol común en condiciones de campo..... 113

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Diagrama del proceso de producción a nivel de biorreactor de tanque agitado. 49
- Figura 2A:** Actividad antagonista de bacterias aisladas de la rizósfera de frijol procedente de campos localizados en Ica, Trujillo, Lambayeque, Virú y Huacho. Las barras representan los valores medios \pm SE..... 63
- Figura 2B:** Porcentaje de cepas antagonistas seleccionadas capaces de reducir el crecimiento micelial de 2 y 3 hongos fitopatógenos del suelo..... 63
- Figura 3:** A y B. Nódulos de *Rhizobium* MFC-2a de color rosado y amarillo con estrías blancas distribuidas de manera simétrica. C. *P. vulgaris* mostrando nódulos en el sistema radicular de plantas crecidas in vitro..... 66
- Figura 4:** A. Plantas con síntomas de enfermedad colectadas en campos de frijol común con focos de infección causadas por la proliferación de hongos fitopatógenos del suelo. B. Plantas con pudrición seca y presencia de micelio blanquecino algodonoso en raíz, cuello, tallo y ramas. C. Plantas con marchitez. D. Cancros a nivel del cuello de la planta..... 67
- Figura 5:** Características macroscópicas y microscópicas de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* y *R. solani*. A. Colonia blanquecina algodonosa de *S. sclerotiorum* con presencia de esclerotes (flecha roja) e B. hifas con formación..... 68
- Figura 6:** Árbol filogenético de Neighbor Joining basado en el gen ARNr 16S de las cepas antagonistas. Las cepas usadas en este estudio están indicadas en negrita. Los números de accesión de cada cepa están en paréntesis. Solo se muestran los valores bootstrap mayores a 60 por ciento (1.000 réplicas)..... 70
- Figura 7:** Árbol filogenético de Neighbor Joining basado en el gen ARNr 16S de la cepa MFC-2a aislada a partir de nódulos. La cepa usada en este estudio está indicada en negrita. Los números de accesión de cada cepa están en paréntesis..... 71
- Figura 8:** Actividad antifúngica de los VOCs producidos por *Bacillus* IcBac2.16, *Bacillus* IcBac3.3, *Alcaligenes* TvPs2.4 y *Pseudomonas* TvPs1.6 contra hongos fitopatógenos por el método de sellado en placa. La fila superior muestra las colonias bacterianas crecidas en Agar TSA. La fila del centro muestra pérdida de pigmentación en el micelio de *F. oxysporum*, inhibición del crecimiento micelial en *R. solani* e inhibición del crecimiento

micelial y formación de esclerotes en *S. sclerotiorum* en presencia de la bacteria. La tercera fila corresponde a los controles de *S. sclerotiorum*, *R. solani* and *F. oxysporum* crecidos en Agar Papa Dextrosa..... 79

Figura 9: Efecto del periodo de incubación sobre el porcentaje de inhibición frente a *R. solani* por *Bacillus* IcBac2.1. PI: Porcentaje de inhibición. Cada valor representa la media \pm SE (n= 2)..... 83

Figura 10: Efecto de las fuentes de carbono (A) y nitrógeno (B) sobre el crecimiento y la producción de compuestos antifúngicos por *Bacillus* sp IcBac2. Las barras representan los valores medios \pm SE. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en la prueba de rangos múltiples de Duncan para el ensayo de halos de inhibición..... 84

Figura 11: Gráfico de contornos 2-D mostrando el efecto de la interacción entre las variables H_3BO_3 y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (A), entre las variables $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (B) y entre las variables H_3BO_3 y $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ en la producción de metabolitos antifúngicos por *Bacillus* IcBac2.1..... 91

Figura 12: Producción de biosurfactantes por *Bacillus* IcBac2.1 a través de fermentación Batch en biorreactor de tanque agitado mostrando la formación excesiva de espuma y la colección y recirculación de la espuma en el biorreactor..... 92

Figura 13: Producción de biosurfactantes por *Bacillus* IcBac2.1 en diferentes condiciones de agitación y aireación a nivel de biorreactor de tanque agitado: A. 300 rpm y 1 vvm. B. 300 rpm y 1.5 vvm. C. 400 rpm y 1 vvm. D. 500 rpm y 0.5 vvm..... 95

Figura 14: Estimación de los parámetros del modelo cinético de la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos producidos por *Bacillus* IcBac2.1: “ α ” Coeficiente de formación del producto asociado al crecimiento y “ β ” Coeficiente de formación del producto no-asociado al crecimiento..... 97

Figura 15: Comparación del perfil cinético del valor experimental (■) y del modelo Luedeking y Piuret (●) en la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos por *Bacillus* IcBac2.1 a nivel de biorreactor de tanque agitado..... 98

Figura 16: Actividad antifúngica contra <i>R. solani</i> mediante la técnica de difusión en agar del extracto crudo obtenido a partir del sobrenadante libre de células del cultivo de <i>Bacillus</i> IcBac2.1 separado con diferentes solventes orgánicos.....	101
Figura 17: TLC mostrando las manchas correspondientes a la porción lipolítica de los compuestos lipopeptídicos en los extractos orgánicos de butanol (b), Cloroformo (cl), metanol (m), acetato de etilo (ae), éter de petróleo (ep) comparado con la corrida cromatográfica del lipopéptido control iturina (i).....	102
Figura 18: Prueba en disco mostrando inhibición del crecimiento fúngico del hongo fitopatógeno <i>R. solani</i> en las fracciones N° 9, 10 y 11, mientras que, las demás fracciones fueron no mostraron actividad antagonista. C: control.....	102
Figura 19: Cromatograma del análisis de HPLC mostrando 6 picos, de los cuales el pico Nro. 6 con mayor actividad antagonista mostró un tiempo de retención de 21.17 minutos.....	103
Figura 20: Prueba de difusión en placa mostrando inhibición del crecimiento fúngico del hongo fitopatógeno <i>R. solani</i> en las fracciones N° 5 y 6, mientras que, las demás fracciones fueron no mostraron actividad antagonista.....	103
Figura 21: Espectros LC-MS de los extractos butanólicos obtenidos a partir del cultivo de <i>Bacillus</i> IcBac2.1 A. Escaneo de espectro de 5 muestras en modo de ionización positiva [M+H] ⁺ . B. Espectro MS/MS de ion m/z [M+H] ⁺ 368.4250. C. Espectro MS/MS de ion m/z [M+H] ⁺ 701.4925. D. Espectro de MS/MS do íon m/z [M+H] ⁺ 475.3242. E. Espectro de MS/MS do íon m/z [M+H] ⁺ 164.9301.....	105
Figura 22: Efecto de rizobacterias sobre la incidencia de la enfermedad causada por <i>S. sclerotiorum</i> entre los tratamientos evaluados. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas (p 0.05) en la prueba LSD.....	112
Figura 23: Efecto de rizobacterias sobre el rendimiento de grano entre los tratamientos evaluados. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas (p 0.05) en la prueba LSD.....	114

RESUMEN

Phaseolus vulgaris es originario del continente americano. En el Perú es una de las legumbres más consumidas por su alto contenido de nutrientes. El objetivo de esta investigación fue realizar el estudio de la actividad antifúngica de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y sus metabolitos en el control de hongos fitopatógenos en el cultivo del frijol. Para lo cual se realizó la bioprospección de bacterias nativas de la rizosfera de plantas de frijol común crecidas en diferentes ecosistemas de la zona costera del Perú. A partir de las cepas aisladas se realizó la selección de bacterias antagonistas contra hongos fitopatógenos del suelo *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* mediante la técnica de cultivo dual. La capacidad antifúngica de las cepas seleccionadas se evaluó a través de la producción de compuestos orgánicos volátiles y no volátiles. Los metabolitos volátiles fueron identificados por microextracción en fase sólida - cromatografía de gases - espectrometría de masas; mientras que la evaluación de la actividad antifúngica por compuestos no volátiles incluyó la producción de compuestos extracelulares antibióticos, sideróforos y de las enzimas hidrolíticas lipasas, celulasas, proteasas y quitinasas. Para la purificación de los compuestos extracelulares antibióticos con actividad antifúngica se realizó la precipitación del sobrenadante libre de células añadiendo HCl 2N hasta un pH 2, posteriormente se realizó la extracción líquido - líquido utilizando solventes orgánicos polares y apolares. El extracto crudo fue purificado por cromatografía líquida al vacío, cromatografía Flash y HPLC en fase reversa. La caracterización de los compuestos antifúngicos se realizó por LC-MC. Así también, se realizó la caracterización de estabilidad frente a diferentes valores de temperaturas y pH, se evaluó su capacidad biosurfactante y se determinó la concentración mínima inhibitoria. A partir de la cepa con mayor actividad antifúngica se realizó la optimización del medio de cultivo para incrementar la producción de compuestos extracelulares antibióticos a nivel de matraz seleccionando la mejor fuente de carbono, nitrógeno y elementos traza y a nivel de biorreactor de tanque agitado modificado de 3 L de capacidad se evaluó el efecto de la agitación y aireación en el incremento de la producción de compuestos extracelulares antibióticos. Se realizó el modelamiento matemático para la producción de compuestos antifúngicos extracelulares. En campo se evaluó la eficacia de rizobacteria en la reducción de la incidencia de la enfermedad causada por *Sclerotinia*, en los parámetros de crecimiento vegetal y en el rendimiento de grano. Veintiséis cepas aisladas mostraron la capacidad de controlar el crecimiento micelial

de *Sclerotinia*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* debido a la producción de compuestos orgánicos volátiles y no volátiles. La secuencia del gen ARNr 16S mostró que las cepas estaban estrechamente relacionadas con *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Alcaligenes*. Las cepas *Alcaligenes* TvPs2.4 y *Pseudomonas* TvPs1.6 mostraron la mayor inhibición contra los fitopatógenos probados a través de la producción de compuestos orgánicos volátiles estas cepas produjeron 21 compuestos orgánicos volátiles. Los principales compuestos fueron disulfuro de dimetilo, D-limoneno, 2-nonanona y o-cimeno. *Bacillus* IcBac2.1 mostró la mayor capacidad de controlar el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos evaluados a través de la producción de proteasas, celulasas, sideróforos y metabolitos extracelulares antibióticos. Los metabolitos extracelulares antibióticos aislados del sobrenadante libre de células por precipitación a pH 2 se caracterizaron por ser compuestos anfífilicos mostrando actividad antifúngica como extractos crudos en solventes polares como cloroformo, butanol, acetona y metanol inhibiendo el crecimiento micelial de *R. solani*. Así también, TLC reveló la presencia de compuestos lipídicos cuando se utilizó vapor de yodo como reactivo. El extracto crudo mostró actividad biosurfactante y fueron estables a altas temperaturas y pH ácidos. Este resultado mostró el carácter anfífilicos de los compuestos antifúngicos producidos por *Bacillus* IcBac2.1 que probablemente corresponden a lipopéptidos, a nivel de matraz se formuló el medio de cultivo a base de almidón (20 gL^{-1}) y extracto de levadura (8 gL^{-1}) incrementando el peso seco de biomasa celular ($1,44 \text{ gL}^{-1}$) y la concentración del crudo de compuestos antibióticos ($1,76 \text{ g l}^{-1}$) de *Bacillus* IcBac2.1 contra *R. solani*. Así también, los elementos traza H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mostraron un efecto estadísticamente significativo y positivo con un coeficiente mayor a 0.99 en la producción de metabolitos antifúngicos. A nivel de biorreactor de tanque agitado modificado de 3 L de capacidad con saturación inicial del 100 por ciento, con una velocidad de agitación de 400 rpm; velocidad de aireación de 1,0 vvm, pH de 6,8-7,2 de y a 28°C produjo una alta concentración del crudo de compuestos antibióticos (11.18 gL^{-1}) y concentración celular (5.18 gL^{-1}) a las 48 horas de cultivo. El modelo matemático Luedeking y Piuret estimó la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos producidos por *Bacillus* IcBac2.1 a nivel de tanque agitado modificado en condiciones de 400 rpm, 1 vvm a pH 6,8-7,2 y 28°C durante 72 horas de cultivo. El análisis de LC-MS de la fracción semipurificada del crudo de lipopéptidos mostró cuatro moléculas pequeñas con diferente peso molecular en el rango de 164 a 701 Da. Y a nivel de campo, el tratamiento *Bacillus* IcBac2.1 + *Rhizobium* E10

presentó el menor porcentaje de incidencia de la enfermedad (dos por ciento DI) sin diferencia significativa en comparación con el control químico (dos por ciento DI). Así también, las tratadas con este tratamiento presentaron mayor altura de planta (46 cm), peso fresco (82,88 g) y peso seco (23,43 g) de la parte aérea y número de botones florales (17), en comparación con el control sin tratar. Así también, presentó el mayor rendimiento de grano (1717,8 kg/ha). El resultado de esta investigación demostró la actividad antifúngica de bacterias y sus metabolitos aisladas de la rizósfera del cultivo del frijol en el control de hongos fitopatógenos del suelo a nivel in vitro y de campo a través de la producción de diferentes compuestos que incluyen enzimas hidrolíticas, compuestos extracelulares antibióticos, sideróforos y compuestos orgánicos volátiles, las cuales representan una alternativa para el biocontrol de enfermedades fúngicas dentro del manejo sustentable del cultivo.

Palabras claves: *Bacillus*, compuestos volátiles, antibiosis, crecimiento vegetal

ABSTRACT

Phaseolus vulgaris is original from the American continent. In Peru it is one of the most consumed legumes due to its high content of nutrients. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of plant growth-promoting bacteria and their metabolites in the control of phytopathogenic fungi in bean crops. The bioprospecting of native bacteria from the rhizosphere of common bean plants grown in different ecosystems of the coastal zone of Peru was carried out. From the isolated strains, the selection of antagonistic strains against phytopathogenic soil fungi *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani* was carried out using the dual culture technique. The antifungal capacity of the selected strains was evaluated through the production of volatile and non-volatile organic compounds. Volatile metabolites were identified by solid phase microextraction - gas chromatography - mass spectrometry. The evaluation of the antifungal activity by non-volatile compounds included the production of extracellular antibiotic compounds, siderophores and the hydrolytic enzymes lipases, cellulases, proteases and chitinases. For the purification of the extracellular antibiotic compounds with antifungal activity, the cell-free supernatant was precipitated by adding HCl 2N until a final pH 2. Subsequently, the liquid-liquid extraction was carried out using polar and nonpolar organic solvents. The crude extract was purified by vacuum liquid chromatography, Flash chromatography and reverse phase HPLC. The characterization of the antifungal compounds was carried out by LC-MC. Likewise, the characterization of stability against different values of temperatures and pH, its biosurfactant capacity and the minimum inhibitory concentration was determined. From the strain with the highest antifungal activity, the optimization of the culture medium was carried out to increase the production of antibiotic extracellular compounds at the flask level, selecting the best source of carbon, nitrogen and trace elements. At the level of a 3 L modified stirred tank bioreactor, the effect of agitation and aeration on the increase in the production of antibiotic extracellular compounds was evaluated. Mathematical modeling for the production of extracellular antifungal compounds was performed. In the field, the efficacy of rhizobacteria in reducing the incidence of the disease caused by *Sclerotinia*, in plant growth parameters and in grain yield was evaluated. Twenty-six strains isolated from the rhizosphere of common bean plants showed potential ability to control the growth of *Sclerotinia*, *Fusarium* and *Rhizoctonia* due to the production of both volatile and non-volatile organic compounds. The sequence of 16S rRNA gene showed that strains most

closely related to *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* and *Alcaligenes*. *Alcaligenes* TvPs2.4 and *Pseudomonas* TvPs1.6 showed the highest inhibition against the phytopathogens tested. Each strain produced 21 volatile organic compounds detected by SPME/GC–MS analysis. The major compounds were Dimethyl disulfide, D-Limonene, 2-Nonanone and o-Cymene. *Bacillus* IcBac2.1 strain showed the highest control against the majority of phytopathogens producing proteases, cellulases, siderophores and antibiotic extracellular metabolites. The antibiotic extracellular metabolites isolated from the cell-free supernatant by precipitation at pH 2 were characterized as being amphiphilic compounds showing antifungal activity as crude extracts in polar solvents such as chloroform, butanol, acetone and methanol, inhibiting the mycelial growth of *R. solani*. Likewise, TLC revealed the presence of lipid compounds when iodine vapor was used as reagent. The crude extract showed biosurfactant activity and were stable at high temperatures and acidic pH. This result showed the amphiphilic nature of the antifungal compounds produced by *Bacillus* IcBac2.1, which probably correspond to lipopeptides. At the flask level, the culture medium based on starch (20 gL⁻¹) and yeast extract (8 gL⁻¹) was formulated, increasing the dry weight of cell biomass (1.44 gL⁻¹) and the concentration of crude extract of antibiotic compounds (1.76 g l⁻¹) of *Bacillus* IcBac2.1 against *R. solani*. Likewise, the trace elements H₃BO₃, CuSO₄.5H₂O, Na₂MoO₄.2H₂O showed a statistically significant and positive effect with a coefficient greater than 0.99 in the production of antifungal metabolites. At the level of 3 L modified stirred tank bioreactor with initial saturation of 100 por ciento, with 400 rpm stirring speed; 1.0 vvm aeration rate, pH 6.8-7.2 and at 28° C produced a high concentration of antibiotic compounds (11.18 gL⁻¹) and cell concentration (5.18 gL⁻¹) at 48 hours. crop hours. The Luedeking and Piuret mathematical model estimated the production of antifungal extracellular metabolites produced by *Bacillus* IcBac2.1. LC-MS analysis of the semi-purified fraction of the crude lipopeptides showed four small molecules with different molecular weights in the range of 164 to 701 Da. At the field level, the treatment *Bacillus* IcBac2.1 + *Rhizobium* E10 presented the lowest percentage of incidence of the disease (two percentage ID) with no significant difference compared to the chemical control (two percentage ID). Likewise, plants treated with this treatment presented higher plant height (46 cm), fresh weight (82.88 g) and dry weight (23.43 g) of the aerial part and number of flower buds (17), compared to with the untreated control. Besides, it presented the highest grain yield (1717.8 kg/ha). The result of this research demonstrated the antifungal activity of bacteria and their metabolites isolated from the

rhizosphere of the common bean crop in the control of phytopathogenic fungi of the soil at in vitro and field level through the production of different compounds that include hydrolytic enzymes, antibiotic extracellular compounds, siderophores and volatile organic compounds, which represent an alternative for the biocontrol of fungal diseases within the sustainable management of the crop.

Key words: *Bacillus*, volatile compounds, antibiosis, plant growth

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris*) es originario del continente americano y un gran número de sus especies son encontradas en Mesoamérica y en lado oriental de los Andes de Sudamérica (Freytag and Debouck 2002).

El frijol es entre las leguminosas, una de las especies más importantes del Perú y América Latina destacando como la de mayor consumo en el país por ser el principal sustento alimenticio por su alto contenido de proteínas, lípidos, carbohidratos y minerales con incidencia directa en la seguridad alimentaria, con un consumo promedio anual del 61.11 por ciento entre las especies de leguminosas a nivel nacional (INEI 2022).

El frijol es entre las leguminosas, una de las especies más importantes del Perú destacando como la de mayor consumo en el país por ser el principal sustento alimenticio por su alto contenido con incidencia directa en la seguridad alimentaria, con una producción nacional de 287.000 Tn. Del total de la producción nacional, el 36 por ciento se cultiva en la costa en los diferentes pisos ecológicos, destacando los departamentos para el cultivo de frijol común de Piura, Lambayeque, Trujillo La Libertad, Huacho – Lima e Ica y Chinca (MINAGRI 2022).

Uno de los principales problemas que merman la producción del frijol es el daño por hongos fitopatógenos. El control de fitopatógenos se realiza mediante el uso de fungicidas químicos, los cuales no resuelven en su totalidad los problemas ocasionados por los diversos fitopatógenos, ya que pueden generar efectos negativos, como problemas de salud del hombre, plantas y animales, pérdida de diversidad y bioacumulación de sustancias tóxicas reconocidos por contaminar el ambiente (Khatoon *et al.* 2020).

Actualmente, el manejo de plagas se realiza principalmente mediante el uso de plaguicidas y agroquímicos. El 80 por ciento de estas enfermedades son causadas por patógenos fúngicos capaces de infectar los tejidos de la planta de frijol en los diferentes estados fenológicos del cultivo causando necrosis, pudrición, defoliación, pústulas, canchales, marchitez, entre otros.

Los principales hongos patógenos son la roya *Erysiphe polygoni*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phoma exigua*, *Uromyces appendiculatus*, *Uromyces phaseoli* y *Sclerotinia sclerotiorum*, este último hongo ataca tallos, peciolos y vainas apareciendo primero lesiones húmedas y luego un moho blanco; tanto los tallos como peciolos se ponen blancos y se secan, mientras que las vainas se pudren; así también, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Rizoctonia solani* causantes de marchitamiento a nivel de plántulas (Camarena *et al.* 2012).

Es ampliamente conocido que el manejo del cultivo se realiza mediante el uso excesivo de pesticidas químicos que acarrear serios problemas ambientales y sociales, además de incrementar el costo de producción.

La aplicación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGP) y sus metabolitos con capacidad de controlar hongos fitopatógenos, en suelos donde su presencia natural puede ser reducida por la propia actividad agrícola, debe darse a través de la inoculación, práctica todavía limitada debida a la falta de tecnologías que generen alternativas amigables con el ambiente. Además, considerando que en nuestro país actualmente la producción de bioplaguicidas se encuentra en desarrollo debido a la falta de herramientas biotecnológicas disponibles y a la falta de difusión en la importancia del uso de estas tecnologías limpias. La aplicación de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) es una estrategia eficaz y ambientalmente segura para lograr un crecimiento vegetal sostenible y la fertilidad del suelo. Este enfoque fomenta la manipulación de PGPR de amplio alcance para suprimir el crecimiento de patógenos (Hakim *et al.* 2021).

En los últimos años ha surgido el biocontrol de microbios fitopatógenos a través de otros microorganismos para la agricultura sostenible (Karthika *et al.* 2020). Las características antagonicas de PGPR juegan un papel clave en el manejo de enfermedades de las plantas mientras mejoran la fertilidad del suelo y la producción de cultivos (Liu *et al.* 2017). Dentro de los géneros más representativos de las PGPR's tenemos: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Micrococcus* (Adesemoye y Egamberdieva 2013). Varios estudios revelaron que la inoculación de las plantas con consorcios de PGPR tiene un efecto sinérgico en el crecimiento de la planta y ayuda a reducir el estrés abiótico y biótico al producir varios compuestos de defensa (Hakim *et al.* 2021). La co-inoculación de *Bacillus megaterium* y *Paenibacillus polymyxa* junto con *Rhizobium* demostró un incremento en la biomasa vegetal

de *Phaseolus vulgaris* en comparación con la inoculación solo de *Rhizobium* (Korir *et al.* 2017). El uso de agentes de control biológico como pesticidas ha reducido la demanda de agroquímicos porque utilizan varios mecanismos para matar los fitopatógenos.

Así también, se han realizado muchos estudios sobre la capacidad de las bacterias PGPR's de producir una amplia variedad de metabolitos con diversidad estructural y funcional para el biocontrol de microorganismos patogénicos. Una gran variedad de antibióticos ha sido identificada de los cuales los lipopéptidos son ampliamente utilizados en el control de enfermedades en plantas. Se ha reportado tres familias de lipopéptidos aislados a partir de especies del género *Bacillus*, de los cuales tenemos surfactinas, iturinas y fengicinas, e incluyen compuestos tales como Iturina A, C, D y E, Bacillomicina D, F y L, y micosubtilina, Subtilina, Subilosina A, Sublancina, amfisina y lipopéptidos cíclicos (Das *et al.* 2008). Así también, ha sido comprobada la capacidad de los microorganismos de la rizósfera en inducir resistencia sistémica en plantas regulando la expresión de genes que participan en los mecanismos de defensa contra la infección por hongos patógenos, tales como ACC-desaminasa, sideróforos, quitinasas, β -1,3-glucanasas, Lipooxigenasas, peroxidases y resistencia sistémica inducida (ISR) reduciéndose significativamente la severidad de la enfermedad (Ali *et al.* 2020; Chen *et al.* 2020; Rodríguez *et al.* 2020).

Por ello, el presente trabajo presenta los siguientes objetivos de investigación:

Objetivo general:

Estudio de la actividad antifúngica de bacterias promotoras del crecimiento vegetal y sus metabolitos en el control de hongos fitopatógenos del cultivo de frijol.

Objetivos específicos:

1. Aislamiento de bacterias nativas de la rizósfera de frijol y selección in vitro de rizobacterias con capacidad de promover el crecimiento vegetal.
2. Selección in vitro de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con actividad antifúngica contra diferentes hongos fitopatógenos del cultivo de frijol.
3. Caracterización molecular de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con actividad antifúngica.
4. Purificación, caracterización e identificación del metabolito microbiano con mayor actividad antifúngica.

5. Optimización de los componentes del cultivo en la producción de metabolitos con la mayor actividad antifúngica utilizando el diseño estadístico de Plackett - Burman y Box – Behnken.
6. Evaluación de la eficacia de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y de sus metabolitos antifúngicos en el control de fitopatógenos a nivel de campo.

II. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. IMPORTANCIA DEL FRIJOL COMÚN Y LA OCURRENCIA DE ENFERMEDADES FÚNGICAS

El frijol común (*Phaseolus vulgaris*) es la leguminosa más importante del mundo debido a su alto contenido de proteínas, grasas, carbohidratos y minerales y su adaptabilidad a diferentes climas y suelos. El Perú cuenta con una amplia gama de ecosistemas que permiten el crecimiento de diferentes especies de leguminosas, donde el cultivo del frijol común está muy extendido en la región costera. Esta región está dominada por un extenso desierto y primeras estribaciones andinas, se extiende desde el nivel del mar hasta los 1500-2000 m.s.n.m. aproximadamente. La zona sur y central, dominada por planicies y cerros, corresponde a un ecosistema desértico en el que, debido a las neblinas invernales, pueden desarrollarse comunidades vegetales. La región de bosque seco de la costa norte, también conocida como bosque seco ecuatorial, es una región con precipitaciones estacionales y escasas. Perú ocupa el tercer lugar entre los países con mayor extensión de tierras secas en América del Sur, ocupando el 40,2 por ciento del territorio nacional peruano. Esta zona solo recibe el dos por ciento de la precipitación total del país (MINAGRI 2018).

Los fitopatógenos del suelo también se ven favorecidos por el suelo y el clima de la costa peruana, que reducen la producción del cultivo de frijol común. Los patógenos fúngicos causan la mayoría de las enfermedades que ocurren en instalaciones agrícolas y hortícolas (Agrios 2011). Las enfermedades causadas por los patógenos fúngicos son las principales causas de las pérdidas de rendimiento de los cultivos y la disminución de la calidad de los cultivos (Iqbal *et al.* 2018). Estos organismos son capaces de infectar diferentes tejidos de la planta provocando diferentes síntomas y/o signos. Los patógenos fúngicos transmitidos por el suelo pueden causar daños generalizados, reduciendo el rendimiento de muchos cultivos económicamente importantes (Ampt *et al.* 2019).

Fusarium, *Rhizoctonia* y *Sclerotinia* se consideran los patógenos fúngicos transmitidos por el suelo más prevalentes en los campos de leguminosas en Perú (Camarena *et al.* 2009).

Fusarium spp. y *Rhizoctonia* spp. son los más frecuentemente asociados con la enfermedad del damping-off. *Sclerotinia* spp. puede causar tizón común.

Los miembros del género *Fusarium* exhiben una extraordinaria flexibilidad genética y una gran persistencia en el suelo. Debido a las prácticas agrícolas convencionales repetidas e intensivas, en particular los pesticidas; *Fusarium* ha desarrollado resistencia, así como otras enfermedades fúngicas transmitidas por el suelo (Kistler y Rep 2010).

2.2. BACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL COMO AGENTES PROMISORES EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES

Existe una gran cantidad de trabajos que describen el uso potencial de microorganismos que habitan la rizosfera con capacidad antagónica contra un amplio rango de enfermedades de origen fúngico, en las cuales se encuentran aquellas capaces de habitar la rizósfera. A este grupo bacteriano se les conoce con el nombre de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper y Schroth 1978). Los miembros de las PGPR corresponden a la comunidad de bacterias que colonizan la rizosfera, en la superficie de la raíz, o en los espacios entre las células en la corteza de la raíz o en las propias células de la raíz (Gray y Smith 2005; Inui Kishi *et al.* 2017). Dentro de los géneros más representativos de las PGPR's tenemos: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, y *Thiobacillus*.

PGPR puede promover directamente el crecimiento de las plantas al actuar como biofertilizante y bioestimulante aumentando la producción en diferentes cultivos. Las PGPR actúan como bioestimulante al regular la fisiología de las plantas al sintetizar diferentes hormonas similares a las fitohormonas como el ácido 3-indol acético (IAA), ácido giberélico, o reguladores de fitohormonas como la citoquinina y ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) o ACC desaminasa (Vejan *et al.* 2016; Gouda *et al.* 2018). La capacidad de PGPR para producir fitohormonas, metabolitos asociados y compuestos de señal también explica su papel en la mitigación de las condiciones de estrés abiótico como la sequía (Jochum *et al.* 2019) y salinidad (Ilangumaran y Smith 2017; Abbas *et al.* 2019). Otra razón para esto es que PGPR pueden modificar la morfología de la raíz, lo que a menudo conduce a un aumento superficie de la raíz y así mejorar la absorción de agua y nutrientes (Kumar *et al.* 2019; Goswami y Deka 2020; Nawaz *et al.* 2020).

Diferentes especies de PGPR poseen la habilidad de producir IAA, reconociéndose diferentes vías biosintéticas comunes entre las bacterias, lo cual probablemente hace posible que las bacterias usen la producción de las hormonas para interactuar con las plantas como parte de su estrategia de colonización. Así también, Spaepen *et al.* (2007) indican que el IAA también puede servir como una molécula de señalización en las bacterias y por lo tanto tienen un efecto directo en la fisiología de estos microorganismos. Se ha comprobado el efecto dependiente de las auxinas con su concentración en el crecimiento de diferentes especies de plantas, así, por ejemplo, bajas concentraciones pueden estimular el crecimiento, mientras que, altas concentraciones pueden inhibirlo. Por ejemplo, cepas bacterianas capaces de producir altas cantidades del IAA incrementan la producción y cosecha en cultivos de maíz. Aún incluso, cepas de bacterias, las cuales producen bajas cantidades del IAA, pero liberados constantemente, aumentan la producción de la cosecha (Khalid *et al.* 2004). El otro efecto benéfico de las PGPR es su acción como biofertilizantes mejorando la fertilidad del suelo, en el cual está incluida la habilidad de las bacterias en reducir y derivar cantidades apreciables de nitrógeno desde el reservorio atmosférico y enriquecer el suelo.

Así también, las PGPR actúan como biofertilizantes, al incrementar la disponibilidad del nitrógeno y minerales, como el fósforo, para ser utilizados de forma inmediata por las plantas. Las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno incluyen a los géneros *Rhizobium*, simbiontes obligados en plantas de leguminosas, y *Frankia*, en árboles no leguminosos; mientras que, los géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre incluyen a: *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter diazotrophicus*, *Azoarcus*, etc. Además de la fijación biológica del nitrógeno al suelo, la solubilización del fosfato es también importante dado que el fosforo es el principal macronutriente para el desarrollo y crecimiento de las plantas. Las PGPR presentan un sistema biológico capaz de solubilizar el fosfato inorgánico insoluble del suelo y hacerlo disponible para las plantas bajo la forma de ortofosfatos. Las bacterias más eficientes en la solubilización de fosfato incluyen los géneros *Bacillus*, *Rhizobium* y *Pseudomonas* (Rivas *et al.* 2006). Muchas PGPR son capaces de solubilizar el fosforo insoluble a través de la secreción de ácidos grasos, los cuales directamente disuelven la roca fosfato para liberar el fósforo a la solución. Algunos géneros como *Acidithiobacillus*, *Aminobacter*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Cladosporium*, *Enterobacter*, *Paenibacillus* y *Sphingomonas* han sido reportadas como rizobacterias solubilizadoras de potasio (Etesami *et al.* 2017). La eficiente solubilización del fosfato mediado por bacterias gram negativas como *Bacillus subtilis*, resulta de la oxidación

extracelular de la glucosa a ácido glucónico vía la glucosa quinoproteína deshidrogenasa (Saeid *et al.* 2018).

En general, las PGPR, ya sea bajo la forma de bacterias de vida libre asociadas a la rizósfera, rizobacterias, o bacterias endofíticas que establecen relaciones simbióticas con su planta hospedante, usan los mismos mecanismos para promover el crecimiento de las plantas, así también, para el control de fitopatógenos habitantes del suelo. Los mecanismos mediados por las PGPR reconocidos en el biocontrol son la competencia por espacio y alimento, producción de metabolitos inhibitorios y la resistencia sistémica inducida (SIR siglas en inglés) en la planta hospedante.

2.2.1. Colonización competitiva de la raíz

Se conoce la existencia de sustancias presentes sobre la superficie de las raíces de las plantas, así como, en la rizósfera que la rodea, la existencia de importantes fuentes de carbono tales como ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares específicos, de tal manera que hasta el 40 por ciento de la producción de los fotosintatos, sintetizados en las hojas, se ubican en esta parte de la planta (Ahkami *et al.* 2017). Es así, que el desarrollo de las comunidades microbianas en la rizósfera depende de la naturaleza y concentración que constituyen los fotosintatos presentes en los exudados radiculares de las plantas, y la correspondiente habilidad que presentan los microorganismos en utilizar estos recursos como fuente de energía. Aunque, las comunidades microbianas tienen los mismos sistemas eficientes para la adquisición y metabolismo de los compuestos orgánicos, muchas especies tienen la capacidad de darle un máximo beneficio debido a su habilidad de adherirse a las superficies radiculares. De tal manera, que las superficies radiculares se convierten en nichos ricos en nutrientes que atrae una gran diversidad de microorganismos benéficos y también fitopatógenos.

La competencia en la rizósfera por los agentes de biocontrol comprende la colonización efectiva de las PGPR del sistema radicular combinado con su habilidad de sobrevivir y proliferar por un periodo de tiempo considerable en compañía de otros microorganismos competitivos de la microflora nativa incluida la presencia de los patógenos de planta, convirtiéndose en un pre requisito para el éxito del control biológico. De tal manera que la competencia por nutrientes y espacio donde desarrollarse es un mecanismo fundamental para el control mediado por las PGPR sobre los fitopatógenos, favorecida además por la presencia

de flagelos que permiten realizar movimientos guiados por respuestas quimiotácticas, es decir, movimientos dirigidos hacia las zonas con altas concentraciones de nutrientes ubicados sobre la superficie radicular de las plantas. Por lo tanto, es importante considerar el tipo de suelo donde se encuentran creciendo las plantas que queremos controlar, ya que este afectará directamente el movimiento de las PGPR para alcanzar las superficies radiculares, a través de sus estructuras de locomoción, así, suelos compactos dificultan su movimiento, mientras que, suelos livianos y sueltos permiten su movimiento a través de sus poros caracterizados por ser numerosos. Así también, suelos con buen sistema de riego aseguran también el movimiento de estas bacterias benéficas a través de los cuerpos de agua presentes en los suelos.

Uno de los mecanismos empleados por los agentes de control biológico poco reconocido es la formación de biopelículas. Las biopelículas pueden ser consideradas como capas compactas relativamente uniformes, formadas por el crecimiento concertado y organizado de microorganismos. La formación de estas biopelículas les permite a los agentes de control biológico ser buenos colonizadores (Posada *et al.* 2018), ya que les proporciona una ventaja adaptativa al proteger a la población de condiciones ambientales adversas y otros factores mecánicos, lo que puede conducir además a la exclusión de nicho de los patógenos (Lalloo *et al.* 2010; Rafique *et al.* 2015).

Sasse *et al.* (2018) demostraron que la PGPR perteneciente a la especie *Bacillus subtilis* es un excelente colonizador de la rizósfera, en el cuál la colonización del sistema radicular constituye una barrera física o zona de interferencia para el establecimiento del patógeno y posterior germinación de sus estructuras infectivas, así también, reduce el desarrollo del patógeno al competir por los nutrientes en la superficie radicular. Este aspecto también es demostrado en el trabajo realizado por Guillén-Cruz *et al.* (2006) al comprobar la acción controladora de *B. subtilis* en un suelo infestado por *F. oxysporum* en el cultivo de chile (*Colletotrichum annuum*), demostrando la acción bioprotectante de esta PGPR bajo condiciones de campo, donde la incidencia de la enfermedad solo represento el 29 por ciento, mientras que, en el tratamiento tradicional a través del uso de agroquímicos realizado por los agricultores, alcanzó el 57 por ciento de incidencia de la enfermedad, valor considerable al igual que en el testigo sin tratamiento que alcanzo el 96 por ciento de incidencia.

2.2.2. Actividad de biocontrol mediada por la síntesis de metabolitos

Los microorganismos asociados a las plantas están en constante competencia por la colonización y nutrientes de la rizósfera, por lo que han desarrollado la síntesis de diversos compuestos antimicrobianos, sustancias tóxicas capaces de inhibir el crecimiento de otros organismos al causar efectos nocivos en su fisiología, como estrategia para competir con otros microorganismos para el establecimiento en un nicho específico, donde se incluyen sideróforos quelantes del hierro, antibióticos, biocidas volátiles y enzimas líticas (Santoyo *et al.* 2012).

a. Competencia del hierro y el rol de los sideróforos

Los sideróforos son metabolitos secundarios de bajo peso molecular producidos por PGPR (y otros microbios) en estados de deficiencia de hierro para unirse al hierro y suministrarlo a las células bacterianas (Dimkpa 2016). La participación del hierro como cofactor de complejos enzimáticos como los citocromos, vitales para el normal funcionamiento de los procesos de oxidación – reducción que ocurre en la cadena transportadora de electrones durante la respiración celular, hace de este elemento esencial para el crecimiento de todos los seres vivos. Estas moléculas tienen la capacidad de capturar iones metálicos con una afinidad mucho mayor por el Fe (III) que el Fe (II). Los sideróforos en función de su principal grupo quelante se clasifican en: hidroxamatos (utilizando ácidos hidroxámicos), catecolatos (conteniendo anillos catecol), carboxilatos, fenolatos, y en combinación de dos o más de estos grupos (Wilson *et al.* 2016).

Estos compuestos quelantes de hierro, que son ampliamente producidos por especies de PGPR, confieren una ventaja sobre aquellos microorganismos incapaces de producirlos. La deficiencia de hierro puede conducir a una inhibición biológica severa para los organismos al privarlos de este elemento porque es esencial en procesos celulares como la síntesis de ADN, la respiración y la desintoxicación de radicales libres (Aguado-Santacruz *et al.* 2012).

Bajo condiciones limitantes, las PGPR pueden producir sideróforos que compiten eficazmente por la adquisición del ion férrico. A pesar de que los diferentes sideróforos bacterianos difieren en su habilidad para secuestrar el hierro, en general, ellos privan la disponibilidad de este elemento esencial para el crecimiento y desarrollo de los hongos fitopatógenos, dado que los sideróforos producidos por estos microorganismos presentan

una baja afinidad por este elemento, en comparación con los sideróforos producidos por las PGPR (Crowley 2006). Los PGPR que producen sideróforos en rizosferas con poco hierro pueden unirse al hierro presente y hacerlo menos disponible para los patógenos, promoviendo indirectamente el crecimiento de las plantas. Tal es el caso de los sideróforos producidos por la bacteria *Burkholderia cenocepacia* cepa XXVI, la cual produce sideróforos quelantes de hierro con actividad biocontroladora frente al hongo patógeno *Colletotrichum lindemutianum* ATCC MYA 456 (De los Santos-Villalobos *et al.* 2012). Los sideróforos presentan una gran diversidad de grupos bioquímicamente diferentes, ellos incluyen Pyoveridinas producidos por *Pseudomonas*, Catecoles producidos por *Klebsiella*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Streptomyces*, *Serratia*, y *Rhizobium* (Shen *et al.* 2013; Mustafa *et al.* 2019).

La baja disponibilidad del hierro que limita el desarrollo de los microorganismos caracteriza a los suelos supresivos, así el desarrollo de la enfermedad marchites causada por especies de *Fusarium*, está relacionada por la competencia del hierro mediada por sideróforos. Bajo estas condiciones se establece una fuerte competencia en estos suelos, donde la habilidad de producir sideróforos por especies de *Pseudomonas* colonizadoras de la superficie radicular es probablemente la propiedad antagónica más útil en el biocontrol del fitopatógeno. Así, diferentes especies de *Pseudomonas aeruginosa* producen sideróforos pyoverdinas, los cuales redujeron significativamente la germinación de las clamidosporas, estructuras vegetativas que permiten resistir condiciones ambientales adversas, en especies patogénicas de *F. oxysporum* (Abo-Zaid *et al.* 2020), sugiriendo un posible rol en la fungistasis y supresividad de los suelos mediados por estos microorganismos. Así también se reporta algunos sideróforos como pyocynaminas y pyoveridinas esenciales para la inducción de la resistencia sistémica (Audenaert *et al.* 2002).

b. Antibiosis

Diferentes estudios acerca de la participación de moléculas con propiedades de antibiosis han esclarecido el mecanismo de acción de biocontrol mediado por las PGPR sobre los microorganismos patogénicos. La producción de antibióticos por PGPR les otorga una ventaja competitiva en la rizosfera, al eliminar o detener el crecimiento de muchos patógenos bacterianos y fúngicos, por lo que la producción de estos compuestos se ha asociado fuertemente con la capacidad de colonizar la rizosfera (Stokes *et al.* 2019).

Una gran variedad de antibióticos ha sido identificada e incluyen compuestos tales como amfisina, 2,4-di-acetilfloroglucinol (DAPG), cianida hidrogeno, oomicina A, fenazina, pyoluteorina, pyrrolnitrina, tensina, tropolone y lipopéptidos cíclicos producidos por especies de *Pseudomonas* (Geudens y Martins 2018) y oligomycina A, kanosamina, zwittermicina A, y xanthobaccina producida por *Bacillus*, *Streptomyces* y *Stenotrophomonas* spp (Giri *et al.* 2019). La importancia de la producción de antibióticos en la supresión de enfermedades de plantas por *Bacillus* spp. ha sido demostrado con diferentes aislamientos de esta PGPR que producen los antibióticos lipopéptidos Iturina A y Surfactina en la supresión de la enfermedad marchitez en tomate causado por *F. oxysporum* y; en *B. cereus*, la producción y resistencia a Zwittermicina A fue correlacionado con la supresión de la marchitez en alfalfa. Así también, el trabajo realizado por Ragab *et al.* (2012) utilizando la técnica *in vitro* de cultivo dual en el medio sintético Papa Dextrosa Agar (PDA), demostró la actividad antagónica de las PGPR pertenecientes a las especies *Pseudomonas fluorescens* y *B. subtilis*, los cuales mostraron un efecto inhibitor en el crecimiento micelial de *F. oxysporum* mediado por la acción de sustancias antibióticas.

c. Producción de enzimas líticas

Además de producir sustancias antibióticas, las PGPR son capaces de exhibir actividad hiperparasítica, al atacar a los hongos patógenos por medio de la secreción de enzimas capaces de hidrolizar los componentes de su pared celular. Las paredes celulares de hongos y oomicetos están compuestas por quitina, celulosa y glucano, entre otras moléculas. Por lo tanto, son el objetivo de algunas enzimas líticas producidas por PGPR, incluidas -1,3-glucanasas, lipasas, celulosas y quitinasas (Bhagwat *et al.* 2019). Esta capacidad de las PGPR ha sido comprobada en *Bacillus thuringiensis* UM96, una bacteria rizosférica que produce quitinasas contra el patógeno que causa podredumbre gris, *B. cinerea* (Martínez-Absalón *et al.* 2014). Así también, *Streptomyces* sp. y las cepas de *Paenibacillus* producen celulosa y b-1,3-glucanasa que causan la degradación de las paredes celulares de hongos patógenos *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium oxysporum* (Mun *et al.* 2020). Además, *Bacillus cereus* y *Bacillus cepacia* producen amilasa, b-1,3-glucanasa, celulosa, proteasa, xilanasas y lipasa, que rompen las paredes celulares de varios microbios p atógenos del suelo (Karthika *et al.* 2020).

d. Producción de compuestos orgánicos volátiles (VOC)

Los compuestos orgánicos volátiles producidos por bacterias han sido reconocidos como agentes importantes en el control de diferentes enfermedades causadas por hongos fitopatógenos (Gouda *et al.* 2018). Los VOCs se caracterizan por tener bajo peso molecular y polaridad que pueden difundir fácilmente a través de los poros del suelo y recorrer grandes distancias atmosféricas. Estas propiedades contribuyen significativamente en la aplicación potencial de los VOCs bacterianos en diferentes ambientes que incluyen los campos, invernaderos y almacenes (Arrarte *et al.* 2017).

La diversidad de VOCs producidos por microorganismos promotores del crecimiento vegetal es alta y algunas de estas moléculas son exclusivas de especies bacterianas o fúngicas (Jishma *et al.* 2017); así entre los VOCs producidos por bacterias se encuentran los alcoholes (etanol, butanol, 2-furanmetanol, 2,4-dimetil pentanol 3-metilbutanol, 2-etil-1-hexanol), ácidos orgánicos (ácido 3-metilbutanoico), cetonas (acetoina, diacetil, 2-nonanona, 2-undecanona, 2-heptanona, 5-metil-2 heptanona-6-metil-5-heptano-2 ona, metil isobutilcetona), derivados del benceno (fenilacetónitrilo, 1,2-benzisotiazol-2(H)-ona, benzaldehído, ácido benzoico etil ester, ácido benzeneacético, alcohol feniletíl), hidrocarbonos (nonano, 1,3-butadieno, tetradecano, 1-deceno), tioeteres (dimetil disulfuro, dimetil trisulfuro), aminas (2-metilbutilamina) y pirazinas (pirazina) (Arrarte *et al.* 2017).

e. Resistencia sistémica inducida

Ciertas especies de las PGPR son capaces de desencadenar un fenómeno conocido como Resistencia Sistémica Inducida (SIR siglas en inglés), efectivo contra un gran número de patógenos de plantas, sin causar síntomas visibles en la planta hospedante. La resistencia sistémica inducida por PGPR fue observada por primera vez en plantas de clavel cuando se vio reducida su susceptibilidad al agente causante de marchitez *F. oxysporum* (Van Peer *et al.* 1991). La manifestación del SIR depende de la combinación de la planta hospedante y la cepa bacteriana. Existen muchos reportes que revelan que el SIR puede ser mediado tanto por PGPR de vida libre como por las endofíticas. Por ejemplo, en las plantas de tomate, las comunidades heterogéneas de microorganismos que residen en la endosfera y la episfera están involucradas en la modulación del metabolismo de los fenilpropanoides que da como resultado el fortalecimiento de la pared celular y brinda protección contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* (Cha *et al.* 2016).

La habilidad de las PGPR para actuar como bioprotectantes a través de la vía del SIR ha sido demostrada tanto en rizobacterias de vida libre como las endófitas, realizándose progresos considerables para elucidar los mecanismos de interacción entre las PGPR y las plantas, donde la flagelación y producción de sideróforos han sido propuestas para desencadenar el SIR. Reportes recientes han demostrado la participación de compuestos orgánicos volátiles que juegan un rol clave en el proceso. De tal manera, parece ser que la mayoría de las PGPR activan el SIR mediado por la acción de sustancias como jasmonato y etileno. Así, el SIR está asociado con un incremento en la sensibilidad de estas hormonas más que en su producción, las cuales dirigen la activación parcial del set de genes que median el mecanismo de resistencia en las plantas contrarrestando la actividad patogénica de los microorganismos, de tal manera, las PGPR desencadenantes del SIR contribuyen a la formación de barreras estructurales, tales como, el engrosamiento de la pared celular con formación de papilas mediado por el depósito de calosa y compuestos fenólicos en el sitio de ataque del patógeno. Así también, involucra cambios bioquímicos y fisiológicos en las células vegetales, que incluyen la formación y acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis tales como PR-1, PR-2, quitinasas y algunas peroxidasas, fenil amonioliasas, fioxalexinas (Jeun *et al.* 2005; Chen *et al.* 2000), permitiendo, de esta manera, aumentar la síntesis de sustancias químicas de defensa en contra de la infección mediada por organismos patogénicos.

2.3. *Bacillus* AGENTE DE BIOCONTROL

El género *Bacillus*, un grupo heterogéneo de bacterias formadoras de esporas, es uno de los géneros más utilizados para el control de fitopatógenos (Fritze 2004). Este género se caracteriza por una alta diversidad genética y son conocidas como fábricas para la producción de compuestos biológicamente activos. Producen una variedad de enzimas, insecticidas, polímeros, antibióticos y biosurfactantes (Su *et al.* 2020).

Estas especies permanecen distribuidas en una amplia diversidad de hábitats, ecosistemas integrados de agua dulce, rizósfera, marinos y terrestres, y sus especies se asocian comúnmente con las plantas (Kim *et al.* 2014). Entre las características del género *Bacillus* destaca su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, Gram positivas, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable (0.5 a 10 μm), su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son mesófilas (temperatura entre 30 y 45 $^{\circ}\text{C}$), su diversidad metabólica asociada a la promoción del crecimiento vegetal y control de

patógenos; además destaca su capacidad de producir endosporas (ovales o cilíndricas) como mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés (Calvo y Zúñiga 2010; Tejera-Hernández *et al.* 2011; Layton *et al.* 2011).

Se reconocen las cepas de *Bacillus subtilis* probióticas seguras y confiables que no son patógenas para humanos y animales (Lu *et al.* 2018). Los metabolitos antimicrobianos se generan durante su crecimiento y reproducción (Luo *et al.* 2008). Entre las principales vías por las cuales estas cepas evitan el establecimiento y desarrollo de organismos fitopatógenos es a través de diferentes mecanismos, que incluyen a) la excreción de antibióticos, b) sideróforos, c) enzimas líticas, d) toxinas y e) induciendo la resistencia sistémica de la planta (IRS) (Tejera-Hernández *et al.* 2011). La mayoría de estas sustancias tienen actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas, sin embargo, algunas de ellas también tienen un amplio rango de acción contra bacterias Gram-negativas y hongos filamentosos. Entre los compuestos antifúngicos, se ha identificado que los lipopéptidos desempeñan un papel importante en la supresión del desarrollo de la enfermedad.

Esta bacteria puede producir sustancias antimicrobianas de distinta naturaleza, que pueden ser divididas en los siguientes tipos: un grupo de péptidos de síntesis ribosomal, policétidos (PK) y pequeñas moléculas peptídicas de síntesis no ribosomal (NRPs por sus siglas en inglés) (Fickers *et al.* 2012).

2.3.1. Enzimas líticas

Los microorganismos biocontroladores sintetizan enzimas líticas como quitinasas, β -1,3-glucanasas, peroxidases, proteasas y lipasas (Jha *et al.* 2014; Mota *et al.* 2017). Las quitinasas y β -1,3-glucanasas e hidrolasas degradan la pared celular de hongos y pueden causar lisis celular en estos organismos, a la vez esta acción permite la liberación de oligómeros de quitina y glucano, los cuales funcionan como elicitores de las defensas de la planta (Jha *et al.* 2014; Veliz *et al.* 2017, Anees *et al.* 2019).

El filtrado del cultivo de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 afectó el crecimiento micelial de *Pseudocercospora fijiensis*, con efecto antifúngico en la permeabilidad de la membrana y en la integridad celular. En invernadero, se encontró una reducción del número de lesiones necróticas y progresión de la enfermedad después de la aplicación del filtrado en plantas de banano. Además, el cultivo de *Bacillus pumilus* CCIBP-C5 indujo una respuesta de defensa en las plantas de *Musa* spp. Como resultado, se demostró la capacidad de esta cepa para

producir quitinasas y lipopéptidos (Cruz-Martín *et al.* 2017, Cruz-Martín *et al.* 2018). Así también, la cepa de *Bacillus* sp. BT42 productora de β -1,3-glucanasas redujo la incidencia de *Colletotrichum gloeosporoides* y *Fusarium oxysporum* en plántulas de café (*Coffea arabica* L.) a 2,8 por ciento y 0 por ciento en comparación con los tratamientos control que presentaron una incidencia de 91,7 por ciento y 88,9 por ciento, respectivamente (Kejela *et al.* 2016).

2.3.2. Producción de compuestos orgánicos volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) producidos por *Bacillus* han sido evaluados como un nuevo enfoque para el control de enfermedades fúngicas en las plantas debido a su capacidad de difundirse entre las partículas del suelo y esparcirse en la atmósfera a grandes distancias desde su punto de aplicación original, los VOCs pueden ejercer su actividad inhibitoria sin contacto directo o físico entre los microorganismos productores de VOCs y los patógenos objetivo (Minerdi *et al.* 2009; Heydari y Pessaraki 2010).

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal emiten VOCs que pueden elicitar inducción de resistencia y tolerancia sistémicas (ITS, del inglés Induced Tolerance Systemic) en la planta lo cual reduce el estrés biótico y abiótico en los sistemas agronómicos y mejora la salud vegetal (Bitas *et al.* 2013). Adicionalmente, los VOCs pueden actuar de manera directa sobre microorganismos patógenos produciendo daño en el ADN (Mitchell *et al.* 2010). En este contexto, numerosos compuestos volátiles producidos por *Bacillus* capaces de inhibir el crecimiento fúngico incluyen benzotiazol, benzaldehído, fenilacetaldehido, ciclohexanol, 2-etil-1-hexanol, 2,3-butanodiol, n-decanal y nonanal, trisulfuro de dimetilo, ciclohexanol, decanal, 2-etil-1-hexanol disulfuro de dimetilo, 1-undeceno, entre otros (Effmert *et al.* 2012).

Los VOCs producidos por *B. amyloliquefaciens* NJN-6 son capaces de reducir el crecimiento y germinación de esporas del hongo patógeno *Fusarium oxysporum* fsp *cubense*, agente causal de la marchitez en banano (Yuan *et al.* 2012). Así también, la producción de 2-nonona y 2-heptanona por *B. amyloliquefaciens* inhibieron por completo el crecimiento micelial de *F. oxysporum* fsp *niveum* (Wu *et al.* 2019).

2.3.3. Producción de sideróforos

Una amplia diversidad de cepas del género *Bacillus* utilizadas en el control biológico han mostrado la capacidad de sintetizar sideróforos regulando la concentración del hierro (Fe^{3+} -sideróforo) en el medio a través de su quelación, ocasionando que este metal no se encuentre disponible para microorganismos patógenos cuyo crecimiento es altamente dependiente de este elemento (Scharf *et al.* 2014). Por otra parte, la formación de dicho complejo no afecta el desarrollo de las plantas, la mayoría de ellas pueden crecer en concentraciones de hierro inferiores de aquellas requeridas por estos agentes de control biológico, así mismo algunas plantas presentan la capacidad de aprovechar estos complejos microbianos incrementando la biodisponibilidad de este elemento (Aguado-Santacruz *et al.* 2012).

Estudios realizados por Ghazy y El-Nahrawy (2021) mostraron la capacidad de *Bacillus subtilis*, *B. circulance*, *B. coagulans* y *B. licheniformis* de producir sideróforos mostrando actividad antagónica contra *Cephalosporium maydis* a nivel in vitro mediante el método dual de placa y a nivel de invernadero.

2.3.4. Lipopéptidos biosurfactantes producidos por *Bacillus* sp

Los biosurfactantes lipopéptidos se producen a través de la fermentación microbiana de diferentes tipos de microorganismos, que incluye levaduras, hongos y bacterias (*Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Acinetobacter*, *Halomonas*, *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* y *Arthrobacter*). Entre todos los microorganismos, el género *Bacillus* y sus especies *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. globigii*, *B. amyloliquefaciens*, *B. megaterium*, *B. pumilus* y *B. licheniformis* han sido bien estudiadas por su capacidad de producción de biosurfactantes, ya que se conoce que producen varios tipos de lipopéptidos cíclicos como liquenisinas, bacilomicina, fengicinas y surfactinas. Los biosurfactantes se producen durante la fase estacionaria y exponencial, mientras que la producción de biosurfactantes predomina en la fase de muerte (Nihorimbere *et al.* 2012; Ceresa *et al.* 2021).

Los lipopéptidos biosurfactantes se componen de dos regiones diferentes: una cola (s) de acilo y una secuencia oligopeptídica, que contiene un enlace amida. La cola hidrófoba contiene una cadena hidrocarbonada de ácidos grasos (saturados, insaturados, lineales o ramificados de cadena larga), mientras que la cabeza hidrófila contiene la secuencia peptídica del lipopéptido (Mondal *et al.* 2017). Este marco anfipático brinda la capacidad de ser solubles en disolventes polares y no polares y reducir la tensión superficial en las

interfaces de las fases con polaridades divergentes, que incluye la emulsión (líquido-líquido) y la suspensión (líquido-sólido), que se denomina colectivamente dispersión (Usman *et al.* 2020). Las notables propiedades de los biosurfactantes incluyen biodegradabilidad, biocompatibilidad, baja toxicidad, alta actividad superficial y estabilidad y alta actividad específica en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Banat *et al.* 2010).

Así también, debido a su estructura anfipática, los lipopéptidos presentan múltiples bioactividades que incluyen actividades antibacterianas, antifúngicas, antivirales y antitumorales y, por lo tanto, son de gran interés para el desarrollo de herramientas para la industria química, agrícola, farmacéutica e industrias alimentarias (Jiang *et al.* 2014).

Los lipopéptidos son sintetizados por complejos enzimáticos definidos como enzimas modulares multidominio, denominadas sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPSs), donde cada módulo incorpora un aminoácido al esqueleto peptídico (Ongena y Jaques 2008; Aleti *et al.* 2015; Mora *et al.* 2015; Sumi *et al.* 2015; Wu *et al.* 2015; Bloudoff *et al.* 2016). Cada módulo consta de tres dominios: i) dominio de adenilación (A) formado por 550 residuos de aminoácidos, ii) dominio portador de péptido (PCP) o tiolación (T) de 80 aminoácidos y iii) dominio de formación del enlace peptídico o de condensación (C), el cual consta de 450 aminoácidos (Bloudoff *et al.* 2016). Los lipopéptidos surfactantes se clasifican según su estructura, con isoformas que comprenden una variedad de aminoácidos D y L (Mnif y Ghribi 2015; Cochrane y Vederas 2016).

Estos sistemas biosintéticos proporcionan una notable heterogeneidad en los productos lipopeptídicos generados por *Bacillus* con respecto al tipo y secuencia de residuos de aminoácidos, la naturaleza de la ciclación del péptido y la naturaleza, longitud y ramificación de la cadena de ácidos grasos. Sin embargo, la capacidad de producción de lipopéptidos de las cepas naturales normalmente es baja. Además, los lipopéptidos informados tienen una estructura diversa y, a menudo, una producción baja durante la fermentación líquida. Esto presenta un desafío para la separación y purificación de lipopéptidos (Zhao *et al.* 2017). Así también, diversos trabajos describen la síntesis de estas sustancias a nivel *in vitro*, mostrando el gran potencial que presentan diferentes cepas del género *Bacillus* para el control de agentes fitopatógenos. Sin embargo, la expresión de estas sustancias bajo modelos de experimentación *in vitro* no permite asegurar que efectivamente se sinteticen en presencia de la planta y del patógeno bajo condiciones naturales, en consecuencia, su real rol como

mecanismo de acción en estrategias de control debe ser considerado cuidadosamente (Pedraza *et al.* 2020).

Los lipopéptidos producidos por *Bacillus* se dividen en tres familias según su cadena peptídica específica y su estructura de ácidos grasos: surfactina, iturina y fengicina.

2.3.4.1. Surfactina. Pertenece a la familia de lipopéptidos que fue aislada por primera vez por Arima *et al.* en 1968 y producida por muchas cepas del género *Bacillus* (Theatre *et al.* 2021). Es un biosurfactante con peso molecular de 1036 Da que corresponde a un lipopéptido cíclico anfipático. Se compone por un heptapéptido con la secuencia de aminoácidos: (L-)Glu-(L-)Leu-(D-)Leu-(L-)Val-(L-)Asp-(D)Leu-(L-)Leu). El péptido se une mediante un enlace de lactona a un ácido graso beta-hidroxi de 12 a 16 átomos de C formando una estructura de anillo de lactona cíclica cerrada. Los diferentes homólogos de la surfactina varían en la identidad de los aminoácidos en las ubicaciones segunda, cuarta y séptima, en el número de átomos de C en la cadena de ácidos grasos o incluso en la conformación estructural (Peypoux *et al.* 1999).

La estructura de la surfactina consta de partes hidrofóbicas (ubicadas en 2–4, 6 y 7) e hidrofílicas (ubicadas en 1 y 5) (Gudiña *et al.* 2013). La surfactina muestra un plegamiento estable y conservado en soluciones acuosas, y los aminoácidos cargados negativamente, Glu y Asp, exhiben un dominio polar. Además, también es soluble en disolventes orgánicos, por ejemplo, diclorometano, etanol, cloroformo, butanol y metanol (Abdel-Mawgoud *et al.* 2008).

2.3.4.2. Iturina. Iturina es una clase importante de lipopéptido con una pequeña masa molecular de ~1,1 kDa. Iturin A consta de dos partes: (a) C14–C17 (ácidos grasos) y (b) siete residuos de aminoácidos (heptapéptidos; Asn-Tyr-Asn-Gln-Pro-Asn-Ser). La iturina (D y E) varía de la iturina A debido a la presencia de un grupo carboxilo libre en la iturina D y un grupo carboximetilo en la iturina E. La estructura de la iturina muestra que tiene un carácter anfifílico. Esta estructura indica claramente un carácter anfifílico de este compuesto, indicando a las membranas celulares como el sitio más probable de su acción (Aranda *et al.* 2005).

Casi todas las cepas de *Bacillus subtilis* producen el lipopéptido Iturina, y su operón varía de 38 a 40 kb de tamaño y contiene cuatro marcos de lectura abiertos como ItuA, ItuB, ItuC e ItuD (Tsuge *et al.* 2001). El lipopéptido Iturina también contiene mojavensina,

micosubtilina, bacilomicina D, bacilomicina F y bacilomicina L, que difieren en las secuencias de aminoácidos de los heptapéptidos (Zhao *et al.* 2017). Se ha reportado que Iturina ejerce una potente actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, *Alternaria alterna* y *Penicillium expansum*. Además, también tiene una fuerte actividad superficial y un efecto desestabilizador (Cozzolino *et al.* 2020). Se ha reportado que Iturina inhibe notablemente el crecimiento de hongos nematófagos y hongos que tiñen la madera como *Aspergillus flavus*, *Penicillium roqueforti* y *Colletotrichum dematiatum*.

2.3.4.3. Fengicina. Fengicina es un lipopéptido producido principalmente por los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus*. Fengicina tiene una fuerte actividad antifúngica y afectan notablemente a los hongos filamentosos (Deleu *et al.* 2008). Fengicina inhibe el crecimiento de *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea* y *Podosphaera fusca* (Romero *et al.* 2007; Wang *et al.* 2007).

Las fengicinas son deca péptidos ((L -)Glu-(D-)Orn- (L-)Tyr -(D-)Thr-(L-)Glu-(D-)Ala(Val)-(L-)Pro-(L-)Gln-(D-)Tyr-(L-)-Ile) y cadenas de ácidos grasos de C14-C19 y un β-hidroxi, que muestra una potente actividad antifúngica. La Tyr en la posición 3 está unida a la Ile en la posición 10 para formar un péptido cíclico a través de un enlace de lactona. (Wu *et al.* 2007; Li *et al.* 2013). Hay dos subclases de Fengicina, Fengicina A y Fengicina B, que solo difieren entre sí por el aminoácido adjunto en la posición 6. Fengicina B contiene Val en la posición 6, mientras que Fengicina A contiene Ala (Tang *et al.* 2014).

2.3.5. Actividad antifúngica de los lipopéptidos biosurfactantes

En el contexto del control biológico de enfermedades de las plantas, las tres familias de lipopéptidos producidos por *Bacillus* incluyen surfactina, iturina y fengicina, los cuales han sido ampliamente estudiadas por sus potenciales actividades antagónicas contra varios fitopatógenos (Ongena y Jacques 2008). Por lo tanto, estos compuestos son considerados como posibles alternativas al creciente problema de la resistencia a los antibióticos convencionales, infecciones fúngicas y enfermedades potencialmente mortales (Meena y Kanwar 2015).

Según diferentes estudios, los lipopéptidos pueden mostrar actividad antifúngica a altas concentraciones para provocar la formación de poros en la membrana celular ya bajas concentraciones pueden inducir la apoptosis. De esta forma, los lipopéptidos también pueden inhibir la generación de pared celular. Además, pueden afectar la adhesión de

microorganismos al dividir la interfaz de fases fluidas con distintas polaridades y enlaces de hidrógeno. En general, la actividad antimicrobiana del lipopéptido aumenta con la adición de un resto lipídico de longitud adecuada (típicamente C10-C12) y los lipopéptidos que contienen átomos de carbono más altos, como 14 o 16, en la cola lipídica muestran una actividad antifúngica mejorada además de la actividad antibacteriana (Mandal *et al.* 2013).

Diferentes investigaciones han reportado los mecanismos por los cuales los lipopéptidos causan la muerte de los hongos que incluyen formación de agujeros en la pared celular y de las membranas celulares, desintegración de órganos intracelulares fúngicos como las mitocondrias y de estructuras intracelulares como los ácidos nucleicos, así también, se ha reportado, que los lipopéptidos ejercen cambios morfológicos en la estructura vegetativa de los hongos tales como hinchazón de las hifas, cambios en la organización de las mitocondrias, disminución del pH intracelular, esterasas y actividad de las mitocondrias y disminución de la hidrofobicidad de las hifas (Hansen *et al.* 2000; Zhao *et al.* 2017; Toral *et al.* 2018).

Ajesh *et al.* (2013) demostraron que un producto antifúngico similar a la surfactina aislado de *Bacillus cereus* exhibía resistencia al calor y a soluciones ácido-alcalinas, y seguía activo incluso cuando se calentaba a temperaturas de hasta 70 °C durante 15 minutos. La máxima actividad se mantuvo a pH neutro.

El lipopéptido Iturina es utilizado para controlar *Verticillium dahliae*, agente causal del marchitamiento del algodón. Después del tratamiento con iturina, se detectó en el hongo la acumulación de ROS, la activación de la proteína quinasa activada por el mitógeno Hog1 (MAPK) y defectos en la integridad de la pared celular. Obviamente, la respuesta al estrés oxidativo y las vías del glicerol de alta osmolaridad contribuyen a la resistencia a la iturina en *V. dahliae*; la vía MAPK puede estar involucrada en la sensibilidad a la iturina en este hongo (Han *et al.* 2015).

Desmyttere *et al.* (2019) realizaron un estudio para explorar las actividades antifúngicas de los lipopéptidos aislados de *B. subtilis* contra la sarna del manzano causado por las cepas de *Venturia inaequalis*. Los resultados de su estudio revelaron que las mezclas de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* que contienen (fengycina, surfactina y micosubtilina) inhibió marcadamente el crecimiento de *V. inaequalis* S755 y *V. inaequalis* rs552.

Han *et al.* (2021) reportaron que los péptidos producidos por *B. amyloliquefaciens* L-H15 (iturina A con C15 β -aminoácido graso y péptido cíclico con un peso molecular de 852,4 Da) exhibieron un fuerte antagonismo contra *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici*.

Dimkić *et al.* (2017) estudiaron cinco cepas diferentes de *Bacillus* productoras de lipopéptidos (SS-10.7, SS-12.6, SS-13.1, SS-27.2 y SS-38.4), y sus extractos se probaron contra *Pseudomonas syringae* pv. *aptata* (P16) y *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*. Los resultados revelaron que las cepas de *Bacillus* produjeron principalmente los lipopéptidos kurstaquinas, iturinas, surfactinas y fengicinas.

Toral *et al.* (2018) realizaron un estudio para determinar la actividad antifúngica de los lipopéptidos aislados de *Bacillus* XT1 CECT 8661 contra *B. cinérea*, observando que el extracto rico en los lipopéptidos surfactina, bacilomicina y fengicina inhibió el crecimiento de *B. cinérea*. Además, los análisis de SEM y TEM revelaron que los lipopéptidos alteraron la morfología del fitopatógeno.

La acción antifúngica de la fengicina actúa perturbando la membrana celular (Gonzalez-Jaramillo *et al.* 2017) e induciendo apoptosis a bajas concentraciones y necrosis a altas concentraciones. Hay un aumento dependiente de la dosis en los marcadores asociados a la apoptosis cuando las células fúngicas se tratan con fengicinas. Estos marcadores incluyen la condensación de cromatina, la acumulación de ROS, la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial, la externalización de la fosfatidilserina y la aparición de roturas en la cadena de ADN. Las células fúngicas se ven afectadas en una serie de funciones importantes y entran en apoptosis tras el tratamiento con bajas concentraciones de fengicina. En cambio, altas concentraciones de fengicina (>50 $\mu\text{g/mL}$) inducen necrosis (Tang *et al.* 2014).

2.4. *Pseudomonas* AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

Pseudomonas es uno de los géneros más ubicuos del mundo y se encuentran distribuidos en el mar, agua dulce y ambientes relacionados con el suelo. El género *Pseudomonas* es diverso y complejo y actualmente se divide en varios grupos filogenéticos con más de 220 especies descritas. Muchas especies viven asociadas con plantas y animales, en su mayoría como saprofitos, pero algunos son patógenos de plantas y animales. Las cepas de *Pseudomonas*

tienen amplias aplicaciones en biotecnología, promoción del crecimiento vegetal, biorremediación y biocontrol (Peix *et al.* 2009).

La mayoría de los agentes de control biológico de *Pseudomonas* han sido aislados del suelo, la rizosfera de las plantas o del agua. Se caracterizan por ser buenos colonizadores de raíces y son bien conocidos por su capacidad de controlar enfermedades ocasionados por patógenos del suelo. Algunas cepas también pueden inhibir el crecimiento de patógenos de la filósfera al inducir resistencia sistémica en las plantas. Por lo general, *Pseudomonas* no sobrevive bien en las partes aéreas de las plantas, a excepción de algunas cepas de biocontrol de *Pseudomonas* del grupo *P. syringae* (Höfte 2022).

Muchas cepas de *Pseudomonas* pueden promover directamente el crecimiento de las plantas al aumentar la disponibilidad y la absorción de nutrientes a través de la solubilización de fosfatos, mejorando el crecimiento de las raíces a través de la producción de fitohormonas o mejorando la tolerancia al estrés abiótico (Ma *et al.* 2016; Ngumbi y Kloepper 2016; Rajkumar *et al.* 2017).

Los mecanismos más importantes de supresión de enfermedades por parte de los agentes de biocontrol de *Pseudomonas* incluyen (Raaijmakers y Mazzola 2012, Pieterse *et al.* 2014):

- Competencia por nutrientes o espacio
- Antibiosis, y
- Resistencia sistémica inducida.

2.4.1. Antibiosis

Los grupos *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. syringae* y *P. aeruginosa* contienen cepas con capacidad de biocontrol. Dentro del grupo de *P. fluorescens*, los subgrupos de *P. chlororaphis*, *P. protegens* y *P. corrugata*, son especialmente numerosos en agentes de biocontrol y propiedades de control biológico (Vacheron *et al.* 2016).

Los compuestos bioactivos que juegan un papel claro en el control biológico de enfermedades de las plantas incluyen: cianuro de hidrógeno (HCN), 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG), fenazinas, pirrolnitrina, pioluteorina, 2-hexil-5-propilalquilresorcinol, sideróforos y lipopéptidos (cíclicos).

a. Fenazinas

Las fenazinas son pigmentos tricíclicos que contienen nitrógeno redox activo que son producidos por *Pseudomonas* y algunas otras Proteobacterias Gram-negativas (Mavrodi *et al.* 2006). Se han descrito más de 100 estructuras diferentes de fenazina, pero las cepas de biocontrol producen ácido fenazina-1-carboxílico (PCA, amarillo limón), fenazina-1-carboxamida (PCN, verde), 2-hidroxifenazina (2-OH-PHZ, rojo ladrillo) o ácido 2-hidroxifenazina-1-carboxílico (2-OH-PCA, naranja).

Las fenazinas muestran actividad antimicrobiana de amplio espectro contra hongos, oomicetos y patógenos bacterianos (Biessy y Filion 2018), pero también pueden desencadenar resistencia sistémica inducida (ISR) en varias plantas (Ma *et al.* 2016b; De Vleeschauwer y Höfte 2009). Las fenazinas tienen un papel fisiológico en la formación de biopelículas y reducción del hierro (Mavrodi *et al.* 2013). Las fenazinas son típicamente producidas por cepas de *Pseudomonas* que pertenecen a *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis* y subgrupos *fluorescens* dentro del grupo *P. fluorescens*.

b. 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG)

2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) es un antibiótico policétido producido por cepas de *Pseudomonas* que pertenecen predominantemente a los subgrupos *P. protegens* y *P. corrugata* y algunas cepas aisladas en otros grupos taxonómicos (Almario *et al.* 2017). Juega un papel clave en el biocontrol de enfermedades de raíces y plántulas y es activo contra hongos, oomicetos, nematodos y bacterias. El compuesto es fitotóxico a altas concentraciones. Las cepas de *Pseudomonas* productoras de DAPG se han aislado típicamente de suelos que suprimen una importante enfermedad de la raíz del trigo causada por *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Weller *et al.* 2007).

c. Pioluteorina

La pioluteorina es un producto híbrido de péptido sintetasa/policétido sintasa no ribosómico que consta de un anillo de resorcinol unido a un resto de pirrol diclorado. La pioluteorina es producida por cepas de *Pseudomonas* pertenecientes al subgrupo *P. protegens* (Ramette *et al.* 2011) y algunos aislamientos de *P. aeruginosa* (Hu *et al.* 2005).

d. Pirrolnitrina

La pirrolnitrina es un fenilpirrol clorado derivado del triptófano con actividad de amplio espectro contra los hongos Ascomycete y Basidiomycete (Ligon *et al.* 2000). La pirrolnitrina es producida por varios géneros bacterianos, incluidos *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Serratia* y *Myxococcus*. El compuesto ha sido utilizado como estructura principal en el desarrollo de fungicidas agrícolas, los fenilpirroles. Los fungicidas fenilpirrol, Fenpiclonil y Fludioxonil, están registrados contra múltiples enfermedades fúngicas para el tratamiento de semillas o el área foliar (Kilani y Fillinger 2016).

El 2-hexil-5-propil-alquilresorcinol (HPR) está estructuralmente relacionado con DAPG pero la vía de biosíntesis es completamente diferente. El compuesto se deriva del ácido octanoico. Varias cepas pertenecientes al subgrupo *P. chlororaphis* con actividad de biocontrol poseen la capacidad de síntesis de este compuesto con comprobada acción contra hongos y bacterias (Calderón *et al.* 2013; Biessy *et al.* 2019).

e. Cianuro de hidrógeno

El cianuro de hidrógeno (HCN) es un veneno respiratorio que inhibe al citocromo c oxidasa, el componente terminal de la cadena respiratoria, en muchos organismos. En procariontes, la producción de HCN parece estar restringida a las proteobacterias ya ciertas cianobacterias (Blumer y Haas 2000). Dentro del género *Pseudomonas* se pueden encontrar microorganismos productores conocidos de HCN en el grupo *P. aeruginosa* y en varios subgrupos del grupo *P. fluorescens*.

f. Lipopéptidos

Las cepas de *Pseudomonas* producen dos tipos de biosurfactantes:

- ramnolípidos; y
- lipopéptidos no ribosómicos.

Los lipopéptidos se componen de un oligopéptido compuesto de 8 a 25 aminoácidos que están acilados en el extremo N con un ácido graso. Son producidos por péptido sintetasas no ribosomales. La gran mayoría de los lipopéptidos de *Pseudomonas* no son lineales, sino que muestran un anillo de macrolactona que contiene de 4 a 9 aminoácidos.

Los lipopéptidos desempeñan un papel en la formación de biopelículas, la adaptación ambiental, la disponibilidad de nutrientes, la colonización de raíces y el control biológico

(Raaijmakers *et al.* 2010; Olorunleke *et al.* 2015). Entre los ciclolipopéptidos cíclicos involucrados en el biocontrol producidos por cepas de *P. fluorescens* y *P. chlororaphis* se incluye a viscosina y viscosinamida (Omoboye *et al.* 2019; Oni *et al.* 2020a).

g. Sideróforos

Los sideróforos están implicados en la actividad de control biológico mediante la competencia por el hierro, el antagonismo directo o la resistencia sistémica inducida. La mayoría de las cepas de *Pseudomonas* producen el compuesto fluorescente yoverdina (Meyer 2000) y se han identificado alrededor de 100 pioverdinas distintas que se dividen estructuralmente en cuatro grupos. Además, muchas cepas de *Pseudomonas* producen otros sideróforos además de la pioverdina con una menor afinidad por el hierro férrico que la pioverdina. Sus estructuras químicas son diversas e incluyen pioquelina y enantio-pioquelina, acromobactina, pseudomonina, corrugatina y (tio)quinolobactina (Cornelis 2010; Schalk *et al.* 2020).

2.4.2. Cepas de biocontrol de *Pseudomonas*: subgrupo de *Pseudomonas chlororaphis*

Se han obtenido aislamientos de *P. chlororaphis* del suelo y de la rizosfera de cultivos de tomate, papa, maíz, rábano, remolacha, alfalfa, soja y trébol (Biessy *et al.* 2019); del tallo de la caña de azúcar (Mehnaz *et al.* 2009); y de las raíces de aguacate (Cazorla *et al.* 2006). La especie se divide en cuatro subespecies: *aureofaciens*, *aurantiaca*, *chlororaphis* y *piscium* (Peix *et al.* 2007). La producción de metabolitos secundarios en el subgrupo *P. chlororaphis* ha sido estudiada por Biessy *et al.* (2019).

Todos los aislamientos de *P. chlororaphis* producen PCA y HCN, pero las subespecies difieren en el tipo de fenazinas producidas y en la producción de otros metabolitos secundarios. Las subespecies *aureofaciens* y *aurantiaca* producen 2-OH-PCA, la subespecie *piscium* produce PCN, mientras que los aislamientos pertenecientes a la subespecie *chlororaphis* producen PCN o 2-OH-PCA. Todas las subespecies, excepto la subsp. *piscium* también producen pirrolnitrina y HPR. Las subespecies *piscium*, *aurantiaca* y *chlororaphis* producen comúnmente el lipopéptidos Viscosina.

Muchas cepas de *P. chlororaphis* producen dos sideróforos, pioverdina y acromobactina (Biessy *et al.* 2019). Los aislamientos *P. chlororaphis* controlan directamente hongos, nematodos, oomicetos y áfidos y pueden inducir resistencia sistémica contra patógenos

foliares fúngicos y bacterianos. Los metabolitos involucrados en la actividad de control biológico incluyen fenazinas, HCN, pirrolnitrina, HPR y 2,3-butanodiol.

Chi *et al.* (2017) reportaron que la cepa *P. chlororaphis* G05 productora de PCA inhibió el crecimiento fúngico de *F. oxysporum* en pepino, mientras que la pirrolnitrina en lugar de PCA fue esencial para controlar el tizón de la espiga causado por *Fusarium graminearum* en el trigo (Huang *et al.* 2018). Así también, *P. chlororaphis* O6 indujo resistencia sistémica contra patógenos bacterianos y fúngicos y estimuló el crecimiento mediante la producción del 2, 3-butanodiol volátil, un metabolito también conocido en *Bacillus* spp. El compuesto es responsable de la estimulación del crecimiento aéreo y la ISR contra *Pectobacterium carotovorum* (Han *et al.* 2006).

2.5. *Alcaligenes* AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

Alcaligenes faecalis es una bacteria gramnegativa ampliamente distribuida en los suelos. Como PGPR, *A. faecalis* tiene un papel activo en la promoción del crecimiento y desarrollo de las plantas (Li 2011). Diferentes estudios han demostrado que *A. faecalis* tiene actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Paecilomyces variotii*, *Candida albicans*, *Alternaria alternata*, *Cercospora arachicola*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Santoa *et al.* 2011; Sayyed y Patel 2011).

Sayyed y Chincholkar (2010) mostraron que el caldo de cultivo rico en sideróforos de *A. faecalis* presento una potente actividad antifúngica contra *A. niger* NCIM 1025, *A. flavus* NCIM 650, *Fusarium oxysporum* NCIM 1008 y *Alternaria alternata* IARI 715. La concentración fungicida mínima requerida para inhibir el crecimiento de *A. niger* fue de 75 µL y 50 µL para inhibir a *F. oxysporum*, *A. flavus* y *A. alternata*.

2.6. *Serratia* AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO

El género *Serratia* pertenece a la familia Enterobacteriaceae de la subclase γ -proteobacteria de Proteobacteria. Incluye 16 especies que se encuentran comúnmente en diferentes hábitats como agua, suelo, plantas y animales.

Varios estudios han reportado el papel potencial de las cepas de *Serratia* altamente pigmentadas en la promoción del crecimiento de las plantas mediante la solubilización de fosfato (P), la producción de ácido indol-3-acético (IAA), 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, compuestos antimicrobianos, sideróforos, moléculas de

detección de quórum, N-acil homoserina lactonas (AHL) y resistencia sistémica inducida contra patógenos de plantas. Se ha reportado el papel positivo de *Serratia* en la promoción del crecimiento de varias especies de plantas como tabaco, lentejas, trigo, tomate, sorgo, arroz, soja y calabaza (Koo y Cho 2009). Esos estudios sugirieron que los miembros del género *Serratia* generalmente se consideran microorganismos ambientalmente seguros que tienen una variedad de aplicaciones agrícolas y ambientales.

Chakraborty *et al.* (2010) mostraron el efecto de *Serratia marcescens* (TRS-1), ya sea como suspensiones acuosas o en bioformulaciones de aserrín, cáscara de arroz y residuos de té, en promover el crecimiento de plántulas de té, como lo demuestra el aumento de la altura, la aparición de nuevas hojas y ramas, así como el aumento de la biomasa foliar. A nivel *in vitro* e *in vivo* *S. marcescens* fue capaz de solubilizar el fosfato. Después de la aplicación de la bacteria, el contenido de P en el suelo disminuyó, el fosfato de las raíces y las hojas aumentó y las actividades de la fosfatasa del suelo mejoraron. Así también, la bacteria mostro actividad antagonista contra varios patógenos fúngicos *in vitro*. La bacteria redujo la pudrición marrón de la raíz de la planta del té causada por *Fomes lamaoensis*. Se observó un aumento significativo en la concentración de fenoles, así como de las enzimas peroxidasa, quitinasa, b-1,3-glucanasa y fenilalanina amoníaco liasa.

2.7. *Achromobacter* AGENTE DE BIOCONTROL

Bertrand *et al.* (2000) realizaron estudios donde se reporta *Achromobacter* sp. como rizobacteria promotora del crecimiento vegetal. Así también, Sala *et al.* (2008) reportaron la capacidad de *Achromobacter* sp. en incrementar la absorción de los minerales como nitrato y potasio dando como resultado el crecimiento del vello radicular de *Brassica napus*. Además, estudiaron la capacidad de *A. insolitus* de fijar nitrógeno y aumentar el crecimiento de las plantas de trigo.

Por otro lado, Yuliar y Salmah (2021) estudiaron el efecto de la combinación de *A. insolitus* MB20 y del estiércol en proteger el cultivo del pepino del marchitamiento causado por el hongo fitopatógeno *Pythium aphanidermatum* a nivel *in vitro* e invernadero. El resultado mostró que a nivel de invernadero la sola aplicación de *A. insolitus* redujo el marchitamiento del pepino hasta en un 60 por ciento, mientras que la combinación de *A. insolitus* y del estiércol de pollo fue del 80 por ciento, con estiércol de cabra del 70 por ciento, con estiércol de vaca y con la orina de conejo del 65 por ciento. Así también, la prueba *in vitro* mostro que *A. insolitus* inhibió el crecimiento de *Pythium aphanidermatum* en un 28 por ciento. Esta

bacteria antagonista fue capaz de inhibir el crecimiento del hongo fitopatógeno a través de la producción de las enzimas proteasa y celulasa.

Dhaouadi *et al.* (2019) estudiaron el efecto positivo a nivel in vitro de la inoculación con *A. xylooxidans* al reducir significativamente el 80 por ciento del crecimiento micelial de los patógenos *Fusarium oxysporum* y *Fusarium solani*, responsables del marchitamiento en melón (*Cucumis melo*) en comparación con el control. Además, en condiciones de invernadero, *A. xylooxidans* redujo significativamente en un 60 por ciento la incidencia de la enfermedad en plantas de melón inoculadas con los aislamientos de *Fusarium*.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. RECOLECCIÓN DE SUELO RIZOSFÉRICO Y RAÍCES CON NÓDULOS DE RHIZOBIOS EN LOS CAMPOS DE FRIJOL

En diferentes campos de frijol se identificaron plantas sanas y con las mejores características agronómicas (altura, follaje, etc.). A partir de la rizósfera de dos plantas seleccionadas al azar se recolectó a 20 cm de profundidad una cantidad aproximada de 1 kg de la porción de suelo circundante a las raíces, así como, raíces con nódulos de rizobios. Se colectaron dos muestras por cada campo y se colocaron en bolsas plásticas de primer uso y transportadas en un cooler al laboratorio. Se registró la procedencia, el ecosistema, variedad, temperatura del suelo, altitud y coordenadas. La temperatura del suelo fue registrada utilizando un termómetro de suelo digital. Los datos de altitud y coordenadas fueron registrados mediante el uso de un GPS Garmin ETrex 30X.

3.2. CARACTERIZACIÓN DEL SUELO RIZOSFÉRICO

El laboratorio de análisis de suelos, plantas, aguas y fertilizantes de la Universidad Nacional Agraria La Molina realizó el análisis fisicoquímico de las muestras de suelo rizosférico, las cuales fueron secadas al aire y luego tamizadas utilizando una malla de 2 mm. Las características de fertilidad del suelo se evaluaron siguiendo el siguiente procedimiento. El porcentaje de arena, limo y arcilla se determinó mediante el método del Hidrómetro. La salinidad del suelo se identificó midiendo la conductividad eléctrica del extracto líquido en una relación suelo/agua de 1:1. El pH se confirmó en una relación 1:1 (suelo: agua) mediante un potenciómetro. Se utilizó el método gaso-volumétrico para determinar el calcareo total presente (CaCO_3). La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se determinó por extracción y suma de cationes con $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 1N pH 7.0. La materia orgánica (MO) se midió por el método de Walkley y Black (oxidación de dicromato de potasio). El fósforo disponible se extrajo del suelo con una solución de NaHCO_3 0,5 M ajustada a pH 8,5 mediante el procedimiento de Olsen modificado.

3.3. AISLAMIENTO DE BACTERIAS DE LA RIZÓSFERA DE PLANTAS DE FRIJOL

El aislamiento de bacterias de la rizósfera de plantas de frijol fue realizado utilizando la técnica propuesta según APHA Standard Methods (2012). A partir de las muestras recolectadas, se pesó 10 g y se colocó en 90 mL de solución salina estéril al 0.85 por ciento, obteniéndose así la primera dilución (10^{-1}). Se agitó cuidadosamente la muestra por un periodo de 5 minutos aproximadamente. Se tomó 1 mL de la dilución 10^{-1} y se adicionó a un tubo que contenía 9 mL del diluyente, obteniéndose la dilución de 10^{-2} . Se repitió el paso anterior hasta obtener la dilución conveniente de acuerdo al método propuesto para el aislamiento del género bacteriano deseado.

3.3.1. Aislamiento de bacterias Gram positivas esporuladas

Se utilizó la técnica propuesta según APHA Standard Methods (2015) y Merck (1998). La primera dilución (10^{-1}) fue sometida a un pre-tratamiento térmico en baño maría a 80°C durante 30 minutos para eliminar la microbiota no deseada, quedándonos únicamente con bacterias esporuladas. Después del tiempo indicado, se procedió a realizar diluciones seriadas hasta obtener la dilución 10^{-5} . A partir de las diluciones 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} se tomó 1 mL y se incorporó en placas Petri estériles vacías, a las cuáles posteriormente se vertió Agar Glucosa Triptona Extracto de carne (TGE) fundido y temperado a 45°C . Se homogenizó bien el contenido de las placas permitiendo la dispersión del inóculo bacteriano en el medio de cultivo. La incubación se realizó a 28°C por 24 a 48 horas. Se realizó la selección de diferentes colonias en base a su morfología. Posteriormente se realizó pases sucesivos en el mismo medio hasta obtener colonias puras. Para confirmar la morfología celular y la pureza del cultivo se realizó tinción Gram.

3.3.2. Aislamiento de bacterias Gram negativas

Se utilizó la técnica propuesta según APHA Standard Methods (2015). A partir de la primera dilución (10^{-1}) se realizó diluciones seriadas hasta obtener la dilución 10^{-6} . Posteriormente, se tomó 1 mL de cada dilución y se incorporó en tubos con Caldo Asparagina de concentración simple, utilizando tres tubos para cada dilución. La incubación se realizó a 28°C por 2-3 días. Pasadas las 48 horas, los tubos se examinaron bajo luz ultravioleta en un cuarto oscuro para observar la producción de una pigmentación verde fluorescente que constituye una prueba presuntiva positiva. Se realizó la selección de los tubos positivos

(presencia de fluorescencia en luz ultravioleta y/o turbidez) para ser sembrados por estriado en Agar Cetrimide e incubados a 28° C de 24 a 48 horas. Posteriormente, se repicaron las colonias con características morfológicas diferentes hasta obtener cepas puras utilizando el mismo medio de cultivo. Para confirmar la morfología celular y pureza del cultivo se realizó tinción Gram.

3.3.3. Aislamiento y autenticación *in vitro* del género *Rhizobium*

a. Aislamiento de *Rhizobium*

Se seleccionaron 3 a 4 nódulos y se colocaron en sobres de papel filtro para su aislamiento. Los nódulos restantes fueron mantenidos secos en frascos con sílica gel para su conservación hasta su procesamiento. Los nódulos colocados en papel filtro se desinfectaron en alcohol al 70 por ciento durante 1 minuto, seguido de hipoclorito de sodio al 3 por ciento por 3 min. Posteriormente, fueron enjuagados con agua destilada estéril durante 6 veces y con una pinza se depositó cada nódulo sobre una gota de agua destilada estéril previamente depositada en una placa Petri. Con el uso de una bagueta se procedió a la maceración del nódulo, a partir del macerado se sembró por estrías y agotamiento en medio LMA – RC (Agar Manitol Extracto de Levadura con Rojo Congo) siendo incubados a 28° C de 2 -15 días (*Rhizobium* o *Bradyrhizobium*) (CIAT 1987). Durante ese periodo se realizó revisiones diarias hasta observar el crecimiento y se procedió a la selección de posibles rizobios teniendo en cuenta las características típicas de sus colonias hasta obtener cultivos puros en placas Petri con LMA-RC.

b. Autenticación de las cepas de *Rhizobium*

Se utilizaron semillas de frijol var. Canario Centenario de tamaño mediano. Las semillas fueron desinfectadas con alcohol al 70 por ciento y con hipoclorito de sodio al 2 por ciento durante 3 minutos cada uno. Luego, las semillas fueron enjuagadas tres veces con agua destilada estéril. Las semillas lavadas fueron hidratadas colocándolas en un vaso precipitado con agua destilada estéril durante 2 horas. Con la ayuda de una pinza estéril, las semillas hidratadas fueron colocadas en placas Petri con la base recubierta de papel filtro estéril humedecido. Las placas fueron recubiertas para proteger las semillas de frijol e incubadas en cámara de crecimiento de 18-22° C por 3 días. Después del tiempo de incubación, se escogieron las semillas germinadas con radículas en punta fina. Las semillas seleccionadas fueron colocadas en tubos de ensayo rellenas con perlas de polipropileno, papel filtro y

aproximadamente 10mL de solución nutritiva. Se colocó 1 semilla por cada tubo. Los tubos fueron cubiertos con papel en la parte externa inferior para proporcionarle la oscuridad necesaria a la raíz. Las cepas de rizobios a evaluar fueron incubadas previamente en Caldo Levadura Manitol por 3 días a 28° C para obtener una población bacteriana de 10⁸ UFC/mL. La inoculación de la bacteria se realizó colocando 1 mL del caldo cerca de la radícula de cada semilla. Se realizó riegos sucesivos con solución nutritiva cada 2 días. Se evaluó la capacidad de nodular de las cepas sospechosas observando la aparición de nódulos cada 7 días por cinco semanas aproximadamente.

3.4. CONSERVACIÓN DE LAS BACTERIAS AISLADAS

Las cepas bacterianas aisladas fueron sembradas y conservadas por criopreservación en glicerol según lo propuesto por Frank y Simione (1998). Las bacterias Gram positivas esporuladas, Gram negativas y rizobios fueron cultivadas en caldo Casoy, Caldo Nutritivo y LMC respectivamente, e incubadas a 28° C por 24 a 48 horas en agitación constante a 150 rpm. Posteriormente, el caldo inoculado fue colocado junto con el glicerol en una proporción 1:3 en tubos eppendorf estériles de 1.5 mL. El contenido fue homogenizado en un vortex. Las cepas fueron conservadas por duplicado en cajas criogénicas a -80° C.

3.5. RECOLECCIÓN DE MATERIAL VEGETAL INFECTADO POR HONGOS FITOPATÓGENOS

Se recolectó diferentes órganos de la parte aérea y/o subterránea de las plantas de frijol que presentaron síntomas y/o signos como necrosis, pudrición, defoliación, canchales y marchitez. La parte aérea fue separada de la subterránea para evitar la contaminación de la muestra, envolviendo las raíces con papel y sujetándola con cinta. Las muestras vegetales fueron colocadas en bolsas plásticas de primer uso y posteriormente transportadas en un cooler al laboratorio.

3.6. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE PLANTAS DE FRIJOL INFECTADAS

Se realizó la observación directa de las diferentes partes de la muestra vegetal afectadas identificando los síntomas que corresponden a la infección por parte del hongo patógeno presente. Con la ayuda del estereoscopio y microscopio se identificó la presencia de estructuras fungosas sobre el tejido vegetal afectado como micelio, esclerotes y esporas. Se

seleccionó trozos de tejido vegetal de 0.5 cm de lado aproximadamente que presentó parte sana e infectada, los cuales fueron colocados dentro de un vaso precipitado para ser lavados en agua corriente y desinfectado con hipoclorito de sodio al 2 por ciento durante 3 minutos. Para eliminar residuos del hipoclorito se enjuagó con agua destilada estéril tres veces. Las muestras fueron secadas completamente sobre papel filtro estéril. Este proceso se realizó dentro de la cámara de flujo laminar para evitar la contaminación. Los tejidos vegetales secos fueron colocados sobre la superficie del Agar Papa Dextrosa (APD) a pH 7.0 en una proporción de 5 trozos por cada placa Petri utilizando una pinza estéril. Las siembras fueron incubadas a 25° C durante 5 a 7 días (French y Hebert 1982).

La identificación de la especie fúngica se realizó utilizando la clave taxonómica de Barnett y Hunter (1982) a través de la observación de las características morfológicas del micelio y esporas de los aislamientos.

3.7. SELECCIÓN *IN VITRO* DE RIZOBACTERIAS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Se realizó la prueba de antibiosis contra hongos patógenos mediante la técnica de cultivo dual (Calvo *et al.* 2010). Una placa de APD con pH 7 fue dividido en 3 cuadrantes, en una posición equidistante en cada cuadrante se colocó 5 µL de cada cultivo bacteriano (10^8 ufc/mL). En el centro de la placa fue colocado un disco de agar de 1 cm de diámetro con un cultivo fresco del hongo patógeno. Se utilizó una placa control donde solo se sembró el hongo patógeno sin bacteria y cepas bacterianas como control positivo. Todo el ensayo se realizó por duplicado. Las placas fueron colocadas en posición invertida e incubadas a 25° C por 5 a 7 días hasta que la placa control (con el hongo patógeno) completo su crecimiento.

La inhibición del crecimiento fúngico fue cuantificada usando la fórmula del Porcentaje de Inhibición $((R - r) \times R^{-1} \times 100)$, donde r es el radio de la colonia del hongo que creció hacia la colonia bacteriana y R es el máximo radio de la colonia del hongo que creció en la placa control (el máximo crecimiento que el hongo puede tener en la placa Petri).

3.8. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS CEPAS BACTERIANAS CON ACTIVIDAD ANTAGONISTA

Se siguió el protocolo del kit de extracción de la marca comercial Thermo Scientific GeneJET Genomic ADN Purification:

3.8.1. Extracción de ADN genómico

- Las cepas de las bacterias Gram positivas y Gram negativas fueron cultivadas en caldo nutritivo. Los cultivos se incubaron overnight a 28°C.
- Se colocó aproximadamente 1.5 mL del caldo en tubos de microcentrífuga de 2 mL y se centrifugó a 12000 g durante 2 minutos. Se descartó totalmente el sobrenadante tratando de no perturbar el pellet, y este se resuspendió con 150 µL de buffer S conteniendo la ARNsa A. Posteriormente se procedió a homogenizar, sin dejar flóculos.
- Se añadió 20 µL de lisozima y se homogenizó el contenido. Sólo las bacterias identificadas como Gram + se incubaron a 37° C por 30 minutos.
- Se incorporó a la mezcla 30 µL de EDTA 0.25 M (pH=8). Se mezcló el contenido y se incubó inmediatamente en hielo por 5 minutos.
- Se añadió 450 µL de buffer G–A, agitando luego en vórtex por 15 segundos. Posteriormente se llevó a 65° C por 10 minutos.
- Se agregó 400 µL de buffer G–B, seguido de 1 mL de buffer DV (pre-enfriado a 4°C). Se homogenizó vigorosamente y se centrifugó a 12000 g por 2 minutos.
- Después de la formación de dos fases se procedió a extraer y descartar la fase superior (azul). Se transfirió la fase inferior al interior de una columna de filtración colocada en un tubo de microcentrífuga de 2 mL, centrifugando a 12000 g por 1 minuto.
- Se descartó la columna de filtración y luego se adicionó 400 µL de buffer BV al filtrado.
- Se colocó una columna AxyPrep en otro tubo de microcentrífuga de 2 mL al cual se transfirió el filtrado anterior. Se centrifugó a 12000 g por 1 minuto.
- Se descartó el filtrado del tubo. A la columna anterior se le añadió 500 µL de buffer W1 y se centrifugó a 12000 g por 1 minuto. Se descartó el filtrado y se agregó 700 µL del buffer W2 y se centrifugó a 12000 g por 1 minuto. Adicionalmente se agregó 700 µL del buffer W2 a la columna AxyPrep y se centrifugó a 12000 g por 1 minuto para remover las sales, eliminando problemas potenciales en reacciones enzimáticas subsecuentes.
- Se descartó el filtrado y se colocó nuevamente la columna AxyPrep en el tubo de microcentrífuga de 2 mL. Se procedió a centrifugarlo a 12000 g por 1 minuto.
- Se transfirió la columna AxyPrep a un tubo nuevo de microcentrífuga de 1.5 mL. Para eluir el ADN se agregaron 200 µL de eluente (previamente temperado a 60°C para

aumentar la eficiencia de la elución), teniendo cuidado de verterlo al centro de la membrana. Se dejó reposar por 1 minuto a temperatura ambiente, para luego centrifugarlo a 12000 g por 1 minuto.

- Las muestras de ADN se almacenaron a -20°C.

3.8.2. Verificación de la calidad del ADN extraído

a. Preparación del gel de agarosa 1 por ciento

- Se realizó el pesado de 0.75 g de agarosa y se mezcló con agua destilada (c.s.p. 75 mL) y se licuó en el horno microondas hasta la completa disolución de los cristales de agarosa.
- La preparación anterior, temperada a 50 °C, fue vertida en una bandeja electroforética de 15 x 10 cm, previamente nivelada, a la cual se colocó el peine respectivo. Se dejó solidificar, evitando la formación de burbujas.
- Luego de solidificar se retiró las paredes de goma y el peine, teniendo cuidado de no dañar los pocillos de vertido de la muestra.
- Se transfirió la bandeja con el gel a la cámara de electroforesis.
- La cámara de electroforesis fue cargada con buffer TBE 1X, hasta cubrir los pocillos de muestra.

b. Corrida electroforética de las muestras

- Se mezcló 1.0 µL de buffer de carga con 5 µL de la muestra.
- Se utilizó como marcador molecular Lambda ADN (1 µL), el cual se mezcló con 1 µL de buffer de carga.
- Se procedió a cargar las mezclas realizadas con una micropipeta de 1 – 10 µL, dispensando cada muestra en un pocillo del gel.
- Se cerró la cámara de electroforesis y se conectaron los cables en sus electrodos correspondientes.
- Se programó la fuente de poder a 80 V por 60 min, iniciando la corrida.

c. Tinción y revelado del gel

- Concluido el tiempo de corrida, se trasladó cuidadosamente el gel a una bandeja de solución acuosa de bromuro de etidio (0.5 µg/mL), dejando reposar durante 15 min.

Trascurrido el tiempo anterior, se trasladó el gel a la bandeja con agua destilada y se dejó reposar durante 10 min para su lavado.

- Se colocó el gel sobre el transluminador, encendiendo la luz UV.
- El gel revelado fue fotografiado.

3.8.3. Amplificación del gen ARNr 16S

a. Bacterias Gram + y Gram -

Se eligió representantes de cada agrupamiento para el secuenciamiento del gen ribosomal 16S, el cual fue amplificado por medio de una reacción de PCR con los primers fD1 (5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'), posteriormente se procedió a limpiar las secuencias obtenidas con el kit PCR Cleanup de Axygen. La mezcla de reacción para la amplificación (25 µL), consistió de: buffer Taq +KCl - MgCl₂ (X), MgCl₂ 1.5 mM, dNTPs 0.5 mM, primers 0.5 pmol/µL cada uno, Taq polimerasa 0.5 U/µL y 5 µL de lisado.

La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	93 °C x 2 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C x 45 s	30 ciclos
Annealing	62 °C x 45 s	
Extensión	72 °C x 2 min	
Extensión Final	72 °C x 5 min	1 ciclo

Las muestras fueron corridas en gel de agarosa 1 por ciento en buffer TBE 1X (dimensiones 15 x 10 cm) a 60 V por 150 minutos aproximadamente hasta que la banda más oscura del buffer alcance la mitad del largo del gel.

b. *Rhizobium* sp

En la amplificación del gen ARNr 16S, se utilizaron iniciadores universales fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCGAGCC-3') que amplifican 1500 pb. en los microtubos para PCR se pusieron 5 µL del ADN aislado a una concentración de 10 ng/µL. La preparación del master mix se realizó en un tubo eppendorf, en función al número de muestras, los reactivos utilizados fueron de la marca Thermo Scientific. El volumen para cada una de las reacciones fue de 50 µL que contenían: agua químicamente pura de grado biología molecular, 0.2 mM de DNTPs, 400 nM de oligos 1.5

mM de MgCl₂, 1X de Buffer KCl, 1 U de taq-polimerasa. Para completar la reacción, en los microtubos de PCR que contenían 5 µL de ADN bacteriano se añadió 45 µL de la mezcla haciendo un volumen total de 50 µL por cada reacción (Cuadro 1).

Cuadro 1: Condiciones de amplificación de PCR

Desnaturalización inicial	94 °C x 4 min 30 ciclo
Desnaturalización	94 °C x 45 s 30 ciclos
Annealing	57 °C x 45 s
Extensión	72 °C x 1:30 min
Extensión Final	72 °C x 5 min 30 ciclo

3.8.4. Purificación del producto de PCR

Se añadió al producto de la reacción de amplificación del gen ribosomal 16S, un volumen triple de buffer PCR – A.

Se colocó la columna PCR AxyPrep en el interior de un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se pipeteó la reacción anterior hacia dentro de la columna. Se procedió luego, a centrifugar a 12000 g/min. Descartándose así el filtrado del tubo de microcentrífuga y colocando nuevamente la columna de PCR dentro del mismo tubo. Luego de adicionar 700 µL del buffer W2 dentro de la columna, se centrifugó y se descartó el filtrado nuevamente para incorporar 400 µL adicionales. Se transfirió la columna de PCR al interior de un microtubo de 1.5 mL. Para eluir el ADN, se añadió 25 – 30 µL del eluyente (pre-calentado a 65 °C) hacia el centro de la membrana. Se dejó reposar por 1 minuto a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 12000 g/min.

3.8.5. Secuenciamiento del gen ribosomal 16S y establecimiento de las relaciones filogenéticas

Para el establecimiento de las relaciones filogenéticas de las cepas caracterizadas, se realizó el secuenciamiento del gen ribosomal 16S. Los productos de PCR purificados se enviaron a Macrogen Inc. (Seúl, Korea).

Tras la obtención de los cromatogramas, y empleando los programas BioEdit versión 7.0.5.3 y Chromas Lite versión 2.01, las secuencias obtenidas fueron revisadas detectando errores

por solapamiento o repetición de bases. Las secuencias dadas por cada primer (fD1 y rD1) fueron alineadas y empalmadas y la identificación de secuencias de cepas tipo y cepas de referencia se realizaron a través del BLASTN del NCBI y Ez Taxón. El *software* ClustalX 2.0.5, permitió la alineación de las secuencias de las cepas problema y de las cepas tipo. Una vez alineadas se cortaron los extremos para que todas las secuencias tengan la misma longitud.

Para la construcción de la filogenia se utilizó el método estadístico Neighbor Joining, el cual es ampliamente empleado en estudios de evolución basados en técnicas moleculares utilizando una matriz de distancias, la cual va agrupando en parejas según la divergencia promedio hasta llegar a una base. Por otro lado, haciendo uso del *software* Mega4, se empleó el distanciamiento filogenético computado por el modelo de 2-parámetros de Kimura, en tanto que el test de filogenias inferidas “bootstrap” evaluó la fidelidad del árbol filogenético construido. El test bootstrap crea un número arbitrario de posibles dendrogramas por medio de cambios puntales en diferentes bases de las secuencias y elige uno de consenso, así, en cada divergencia se muestra un porcentaje el cual representa el número de ramas que se han repetido del total de árboles creados.

3.9. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE LAS CEPAS BACTERIANAS ANTAGONISTAS

Las colonias aisladas se caracterizaron bioquímica y fisiológicamente utilizando el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (Holt y Kreig 2012). Se realizaron diferentes pruebas como actividad de la catalasa, oxidasa, prueba de indol, prueba de Voges-Proskauer, prueba de citocromo oxidasa y la capacidad de tolerancia a diferentes porcentajes de cloruro de sodio (5, 7, 10 y 15 por ciento) y pH (3, 5, 7, 9 y 11). Así también, se analizó la capacidad de crecimiento utilizando diferentes fuentes de carbono como L-arabinosa, D-galactosa, manitol, Lactosa, D-dextrosa, glicerol, fructosa en el medio basal caldo Base Rojo de Fenol.

3.10. CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE BACTERIAS DE LA RIZÓSFERA CON CAPACIDAD ANTIFÚNGICA

Se caracterizó la capacidad de promover el crecimiento vegetal de las cepas bacterianas con actividad antifúngica mediante las siguientes pruebas: producción de ácido indolacético, solubilización de fosfatos.

3.10.1. Producción de precursores de ácido indolacético (AIA)

Mediante este ensayo se determinó de manera cualitativa la capacidad que poseen las bacterias de producir ácido indolacético o alguno de sus precursores. El ácido indolacético es precursor de las auxinas. Las auxinas son fitohormonas reguladoras del desarrollo de las plantas que tienen como característica principal incrementar el crecimiento de las plantas, la división celular y la formación de raíces.

Para esta prueba se empleó la técnica colorimétrica descrita por Gordon and Weber (1951). Las cepas fueron sembradas en tubos con caldo LMC (3-5mL) suplementado con L-triptófano 5 mM. Los tubos fueron incubados a 28° C por 48 a 72 horas en agitación constante a 150 rpm. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de 500 µL en un eppendorf y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos. Se realizó 2 repeticiones por cepa. Posteriormente, se tomó 250 µL del sobrenadante y se colocó en un tubo de ensayo. Se agregó 1 mL de reactivo de Salkowski a cada uno (1:4) de estos tubos y se incubó durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se evaluó el viraje de color de la solución a tonalidades rojizas (Naik and Sakthivel 2006) y se midió en el espectrofotómetro a 530 nm. El nivel producido fue estimado por una curva estándar (Glick 1995).

3.10.2. Determinación de la solubilización de fosfatos

Este ensayo se llevó a cabo para determinar la capacidad de las cepas aisladas para solubilizar fosfato bicálcico y tricálcico. Aproximadamente entre el 30 por ciento al 80 por ciento del fósforo presente en el suelo está inmovilizado en varias formas orgánicas. No todas las formas orgánicas del fósforo en el suelo son biodisponibles, es decir, no son fácilmente disponibles para su absorción por las plantas. Por lo cual el establecimiento de asociaciones simbióticas con los microbios del suelo representa una estrategia para la adquisición del fósforo (Kafle *et al.* 2019).

Las cepas fueron sembradas en tubos con caldo LMC (*Rhizobium*), TSB (Gram positivas) y Caldo Nutritivo (Gram negativas) hasta que las bacterias alcanzaron un crecimiento óptimo. Se sembró 4 µL de las cepas en el medio basal NBRIP (National Botanical Research Institute Phosphate) modificado con fosfato bicálcico y tricálcico (Nautiyal 1999; Kadiri *et al.* 2013). Las placas Petri fueron incubadas a 28° C durante 14 días. Este medio estuvo compuesto en

(g/L): glucosa 10; Ca₃(PO₄)₂ 5; (NH₄)₂SO₄ 0,1; KCl 0,2; MgSO₄7H₂O 0,25; MgCl₂ 6H₂O 5; agar 14; pH 7.

Al final del tiempo de incubación, se evaluó las bacterias que mostraron actividad de solubilización de fosfatos la cual estuvo representada por la formación de halos translúcidos alrededor de las colonias (Chakraborty *et al.* 2010).

3.11. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE RIZOBACTERIAS MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES Y NO VOLÁTILES

3.11.1. Evaluación de la actividad antifúngica de rizobacterias mediante la producción de compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

Los aislamientos bacterianos fueron cultivados por separado en caldo TSB a 28° C a 150 rpm en agitación constante overnight. 100 µL del cultivo bacteriano con una concentración (DO₆₀₀) de 0.9-1.2 fue inoculado sobre la superficie del Agar Tripticasa de Soya mediante el método de agotamiento. Un trozo de 5 mm de diámetro se extrajo mediante el uso de un sacabocados estéril a partir del medio de cultivo APD previamente colonizado con el micelio del hongo a evaluar. El fragmento fue colocado en el centro de una placa Petri conteniendo APD fresco. La placa Petri conteniendo el micelio del hongo a evaluar fue colocada en posición invertida sobre la placa Petri que contenía la bacteria e inmediatamente las placas fueron selladas juntas con Parafilm[®]. Las placas fueron incubadas a 25° C durante 4 a 5 días. Las placas conteniendo solo el hongo fueron usadas como control. Se evaluó la actividad antagonista a través de la producción de compuestos orgánicos volátiles contra los hongos patógenos *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* and *R. solani*. Se realizó la medición del diámetro de la colonia fúngica (mm) a evaluar hasta que el micelio fúngico de la placa control creció completamente sobre el medio de cultivo. Las pruebas se realizaron por duplicado por cada cepa bacteriana. La inhibición del crecimiento fúngico fue cuantificado a través de la fórmula del porcentaje de inhibición anteriormente mencionada.

3.11.2. Evaluación de la actividad antifúngica de rizobacterias mediante la producción de compuestos orgánicos no volátiles

3.11.2.1. Producción de enzimas hidrolíticas relacionadas a la actividad antagonista

a. Producción de lipasas

La capacidad de producir la enzima lipasa se determinó mediante la hidrólisis de tributirina en agar GYP (Sagar *et al.* 2013). Los aislamientos bacterianos fueron cultivados por separado en caldo TSB a 28° C a 150 rpm en agitación constante overnight. Se colocó 5 µL de cada cultivo bacteriano (10^8 ufc/mL). Después de una semana de incubación a 28° C, se confirmó la actividad de la lipasa debido a la formación de un halo transparente alrededor de las colonias.

La actividad de la lipasa se determinó midiendo los diámetros en mm del halo de hidrólisis.

b. Producción de celulosas

La bacteria fue inoculada en un medio suplementado con carboximetilcelulosa (CMC) 1 por ciento (p/v): El medio estuvo compuesto por CMC, 1.0 por ciento, extracto de levadura, 0.25 por ciento; peptona, 0.25 por ciento; sulfato de amonio, 0.05 por ciento; cloruro de calcio, 0.05 por ciento; fosfato de potasio monobásico, 0.01 por ciento; fosfato de potasio difásico, 0.01 por ciento y agar, 1.5 por ciento. El pH fue ajustado a 7.0. La incubación se realizó a 37° C por 72 horas. Después del proceso de incubación, el medio de cultivo fue teñido con una solución de Rojo de Congo al 1 por ciento (p/v) durante 15 minutos, lavado dos veces con cloruro de sodio 2 mol L⁻¹ y dejado reposar por 15 minutos.

La actividad celulolítica se determinó midiendo el diámetro (mm) del halo de hidrólisis (Sudarshan *et al.* 2014).

c. Producción de proteasas

La producción de proteasas fue analizada utilizando caseína de leche descremada como fuente de carbono (Venant *et al.* 2013). El medio de cultivo utilizado para la producción de proteasas estuvo compuesto por (g/L): peptona de caseína, 9; extracto de levadura, 9; leche descremada, 9 y agar, 15. Un cultivo bacteriano crecido durante toda la noche fue depositado en el centro de la placa con el medio de cultivo y luego incubado a 28° C durante una semana.

La producción de proteasas fue detectada por la presencia de halos transparentes alrededor de las colonias.

Se determinó la actividad proteolítica midiendo el diámetro (mm) del halo de hidrólisis.

d. Producción de quitinasas

El medio de cultivo utilizado para evaluar la actividad quitinolítica en los aislamientos bacterianos fue (g/L): quitina coloidal, 5; extracto de levadura, 0.5; K_2HPO_4 , 0.5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2; NaCl, 0.1; agar, 20.0. El pH del medio fue ajustado a 7.0 (Venant *et al.* 2013). La preparación de quitina coloidal se realizó de la siguiente manera: 40 g de quitina en polvo fue disuelta en 400 mL de ácido clorhídrico concentrado en agitación constante por 50 minutos. Posteriormente, se añadió 2 litros de agua destilada fría. La mezcla fue incubada a temperatura ambiente en agitación constante por 12 horas. Posteriormente, la quitina hidrolizada fue filtrada utilizando el sistema de filtración al vacío y lavada varias veces con agua destilada hasta obtener quitina coloidal con un pH cercano al neutro. La quitina coloidal filtrada fue almacenada en forma de pasta a 4° C (Castro *et al.* 2011). Un cultivo bacteriano crecido durante toda la noche fue depositado en el centro de la placa con el medio de cultivo y luego incubado a $28 \pm 2^\circ C$ por 7 días.

La actividad quitinolítica fue determinado midiendo el diámetro (mm) del halo de hidrólisis alrededor de la colonia bacteriana.

3.11.2.2. Producción de sideróforos

El agar Crome Azurol Sulfonato (Agar CAS) fue utilizado para evaluar la habilidad de los aislamientos bacterianos de producir sideróforos descrito por Louden *et al.* (2011). Resultados positivos consistieron en la formación de un halo claro alrededor de las colonias, así como un cambio notable en el color, el cual cambio de un color azul oscuro a un color amarillo después de 7 días de incubación a 28° C. La prueba se realizó dos veces para cada aislamiento.

3.11.2.3. Producción de lipopéptidos con actividad antifúngica

Se evaluó la capacidad de las cepas bacterianas con mayor actividad antagonista de producir lipopéptidos mediante el método de Difusión en Agar (Fonseca de Faria *et al.* 2011; Aparna *et al.* 2012; Suganya 2013; Tan *et al.* 2013; De La Cruz *et al.* 2011).

Los aislamientos bacterianos se cultivaron en un matraz con 125 mL de capacidad que contenía 50 mL del medio de cultivo caldo mínimo mineral compuesto por: (g/L): K_2HPO_4 , 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; KCl, 0.2 y $FeSO_4 \cdot 5 H_2O$, 0.001 suplementados con fuentes de carbono (glucosa, 10 g) y nitrógeno (extracto de levadura, 5 g). El medio se inoculó con el diez por ciento del cultivo bacteriano puro de crecimiento exponencial y se incubó a 28°C durante 72 horas a 150 rpm en un agitador horizontal. Después de la incubación, el cultivo fue centrifugado a 9000 rpm durante 15 minutos a 4° C. El supernadante fue cuidadosamente removido y filtrado a través de una membrana estéril por radiación gamma de PVDF de 0.22 μm (Millex-GV Milipore®) (Jacques *et al.* 1999; De La Cruz *et al.* 2011). El filtrado fue acidificado a un pH de 2,0 utilizando ácido clorhídrico concentrado y posteriormente se mantuvo a 6 °C durante la noche para facilitar la precipitación de proteínas y péptidos (Zhu *et al.* 2012). El crudo de lipopéptidos se resuspendió en una solución tampón PBS 0,02 mol (pH 7.3 – 7.4) y se determinó la actividad antagonista mediante el método de Difusión en Agar en pocillo. Se colocó alícuotas de 150 μL en pocillos de 9 mm Φ en placas Petri conteniendo APD.

En el centro de cada placa se colocó un disco de agar de 1 cm de diámetro con un cultivo reciente de *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* y *R. solani*. Adicionalmente, se preparó una placa control con el hongo patógeno. Las placas se incubaron a 25°C durante 3 a 5 días y se cuantificó la inhibición del crecimiento fúngico usando la fórmula del porcentaje de inhibición anteriormente mencionada. Las pruebas se realizaron por duplicado de forma independiente para cada aislamiento bacteriano.

3.12. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE CULTIVO PARA LA MAYOR PRODUCCIÓN DE METABOLITOS NO VOLÁTILES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

A partir de la cepa bacteriana productora de metabolitos no volátiles se determinó el tiempo del cultivo en el que se produce la mayor actividad antifúngica contra *R. solani*. La bacteria fue cultivada en medio mínimo mineral conteniendo los siguientes componentes (g/L): K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, KCL 0.05 y $FeSO_4 \cdot 5 H_2O$ 0.001, suplementado con una fuente carbonada (glucosa 10 g) y nitrogenada (extracto de levadura, 5 g). El cultivo microbiano se mantuvo a 28° C en agitación constante a 150 rpm. Cada 24 horas durante 10 días, se transfirió 1.5 mL del cultivo a tubos eppendorf estériles para ser centrifugado a 9000 rpm durante 15 minutos a 4° C. El supernadante fue cuidadosamente removido y filtrado a

través de una membrana estéril por radiación gamma de PVDF de 0.22 μm (Millex-GV Milipore®) (Jacques *et al.* 1999; De La Cruz *et al.* 2011). Posteriormente, 100 μL del supernadante libre de células fue colocado en una de las 3 cavidades de 5mm de diámetro hechas sobre la superficie de agar a una distancia de 3 cm del inóculo del patógeno. El diámetro de inhibición del crecimiento micelial fue evaluado después de 3 a 5 días de incubación a 25° C.

3.13. OPTIMIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL CULTIVO PARA INCREMENTAR LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS NO VOLÁTILES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA A NIVEL DE MATRAZ

A partir de la cepa bacteriana con mayor actividad antagonista productora de metabolitos no volátiles, se realizó en dos etapas la optimización de los componentes del medio de cultivo para determinar las condiciones nutricionales que favorecen la máxima producción de metabolitos con actividad antifúngica.

En la primera etapa, se determinó la fuente carbonada y nitrogenada que favorecen la mayor producción de metabolitos antifúngicos a nivel de matraz en un sistema de cultivo en Feed Batch (Jacques *et al.* 1999; Aparna *et al.* 2012; Al-Wahaibi *et al.* 2014). Para lo cual, la bacteria fue cultivada en el medio mínimo mineral (g/L): K_2HPO_4 1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, NaCl 0.01, KCL 0.2 y $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01. Individualmente, se agregaron diferentes fuentes carbonadas (20 por ciento): glucosa, lactosa, maltosa, sucrosa, glicerol, manitol y almidón. Así también, diferentes fuentes nitrogenadas (5 por ciento): extracto de levadura, peptona, extracto de carne, caseína de peptona, nitrato de sodio y nitrato de potasio. El cultivo se realizó a 28° C en agitación constante a 150 rpm durante el tiempo que permitió la mayor actividad antifúngica determinada anteriormente. Se determinó la fuente carbonada y nitrogenada que permiten la mayor producción de metabolitos antifúngicos mediante la medición del peso seco del crudo de lipopéptidos, crecimiento celular y halo de inhibición del crecimiento micelial contra *R. solani* a través de la prueba de difusión en Agar.

La concentración de biomasa se determinó después de secar la muestra a 60° C hasta obtener un peso constante y se expresó como g/L. Para determinar el peso seco del crudo de lipopéptidos, el caldo de fermentación se centrifugó a 9000 rpm durante 20 minutos a 4° C.

El sobrenadante se acidificó a pH 2 usando ácido clorhídrico concentrado y se dejó durante la noche a 4° C. El pellet acidificado se colectó mediante centrifugación a 9000 rpm durante

20 minutos a 4° C. El crudo de lipopéptidos se extrajo usando cloroformo y metanol en la proporción (2: 1 v/v) y luego se re-centrifugaron a 9000 rpm durante 15 min a 4° C. Finalmente, el extracto crudo se secó en horno a 60 °C durante 24 – 48 h hasta alcanzar peso constante. Se determinó el peso del extracto y se calculó la concentración en g/L.

Los tratamientos fueron organizados bajo el diseño estadístico completamente al azar con 3 repeticiones por cada uno. Los datos fueron procesados mediante el Análisis de ANOVA Univariado y el Test de Comparaciones de Medias de Duncan con un nivel de confianza del 0.95 por ciento.

En la segunda etapa, se identificaron los principales elementos traza: ZnSO₄·7H₂O, MnSO₄·4H₂O, H₃BO₃, H₃PO₄, CuSO₄·5H₂O, Na₂MoO₄·2H₂O, CaSO₄ que influyen en la mayor producción de lipopéptidos antifúngicos mediante el diseño Plackett – Burman a nivel de matraz (Cuadro 2 y 3).

Para determinar el peso seco del crudo de lipopéptidos, el caldo de fermentación se centrifugó a 9000 rpm durante 20 minutos a 4° C. El sobrenadante se acidificó a pH 2 usando ácido clorhídrico concentrado y se dejó durante la noche a 6° C. El pellet acidificado se colectó mediante centrifugación a 9000 rpm durante 20 minutos a 4° C y posteriormente se sometió a 110° C por 30 minutos hasta obtener un peso constante.

Cuadro 2: Componentes del medio por cada factor propuesto en el diseño Plackett – Burman

Factores	Componentes del Medio	Valores + (mg/L)	Valores 0 (mg/L)	Valores – (mg/L)
X ₁	MnSO ₄ ·4H ₂ O	3.0	1.65	0.3
X ₂	H ₃ BO ₃	2	1.1	0.2
X ₃	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.5	0.275	0.05
X ₄	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1	0.55	0.1
X ₅	H ₃ PO ₄	1	0.55	0.1
X ₆	CaSO ₄	1	0.55	0.1
X ₇	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10	5.5	1

Cuadro 3: Matriz del diseño Plackett – Burman mostrando las diferentes combinaciones de los 7 factores y sus niveles

Corridas	Variables										
	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	D1	D2	D3	D4
1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1
5	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
6	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1
7	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
8	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
9	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1
10	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1	-1
11	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	1	1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	-1	1	1	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1

Para determinar las variables significativas se realizó el análisis estadístico mediante el ANOVA multivariado. El error estándar de cada variable respuesta (porcentaje de inhibición) fue la raíz cuadrada de la varianza.

En la optimización de las variables seleccionadas, se realizó el diseño Box Behnken con las variables que mostraron efecto positivo significativo en la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos.

El modelamiento del sistema fue explicado mediante el modelo matemático cuadrático:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \sum \beta_{ii} X_i^2$$

Donde Y es la variable respuesta; X_i y X_j son las variables independientes; β_0 es una constante; β_i es el coeficiente lineal; β_{ii} es el coeficiente cuadrático y β_{ij} es el coeficiente de interacción.

Se utilizó el *software* estadístico Design Expert versión 7.0.2 para diseñar y analizar los experimentos.

3.14. INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ANTIFÚNGICOS POR *Bacillus* IcBac2.1 USANDO BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO MODIFICADO

El sobrenadante libre de células de la cepa *Bacillus* sp IcBac2.1 mostró la mayor actividad antagonista contra los hongos fitopatógenos *R. solani*, *F. oxysporum* y *S. sclerotiorum*.

El cultivo de *Bacillus* sp IcBac2.1 a nivel de biorreactor de tanque agitado se utilizó para incrementar la producción de lipopéptidos antifúngicos para lo cual se realizó lo siguiente: en la preparación del pre inóculo, la cepa *Bacillus* sp IcBac2.1 se cultivó en 25 mL del caldo TSB a 28° C en un agitador rotatorio a 150 rpm durante la noche. Estas células se utilizaron para inocular matraces de 500 mL que contenían 250 mL del caldo TSB. Los matraces se incubaron a 28° C en un agitador rotatorio a 150 rpm durante la noche para obtener células viables en fase exponencial de crecimiento. El volumen final de inóculo representó el diez por ciento (v/v) del volumen del medio de producción. El inóculo se incorporó en un biorreactor de tanque agitado de 3,0 L (Applikon Biotechnology) que contenía 2,5 L de medio de fermentación. El medio de fermentación consistió en medio mínimo mineral modificado con la siguiente composición (en g/L): almidón 20, extracto de levadura 8, KH₂PO₄ 1, MgSO₄.7H₂O 0.5, KCl 0.2, NaCl 0.01, FeSO₄.7H₂O 0.01 y oligoelementos (mg l-1): H₃BO₃ 2, CuSO₄.5H₂O 0.5, Na₂MoO₄.2H₂O 1. El biorreactor estuvo provisto de un sistema de agitación adecuado. La aireación se realizó utilizando aire esterilizado filtrado proporcionado por un compresor. Las concentraciones de oxígeno disuelto se analizaron utilizando un electrodo polarográfico (Applisense). No se controló el pH del medio ni tampoco se añadió ningún antiespumante. El biorreactor se modificó con dos colectores de espuma. El tamaño del primer y segundo colector de espuma fue de 2,0 y 1,0 L, respectivamente. La espuma generada se recogió y se sacó del recipiente de cultivo a través del dispositivo de gas de escape utilizando un tubo de silicona estéril de 10 mm de diámetro, fijado sobre la superficie del medio de fermentación. La espuma y el cultivo líquido se recircularon al biorreactor con bomba peristáltica (Figura 1). Los cultivos en lote se incubaron a 28° C durante 72 horas con diferentes velocidades de agitación 300, 400 y 500 rpm, así como diferentes velocidades de aireación de 0,5, 1,0 y 1,5 vvm. El proceso de fermentación se evaluó mediante la extracción aséptica periódica de muestras de 25 mL a través de una jeringa de muestreo. Estas muestras se analizaron para determinar el crecimiento celular, el peso seco del crudo de lipopéptidos y la producción de esporas. La

producción de biosurfactantes se evaluó tanto en el biorreactor como en el primer colector de espuma.

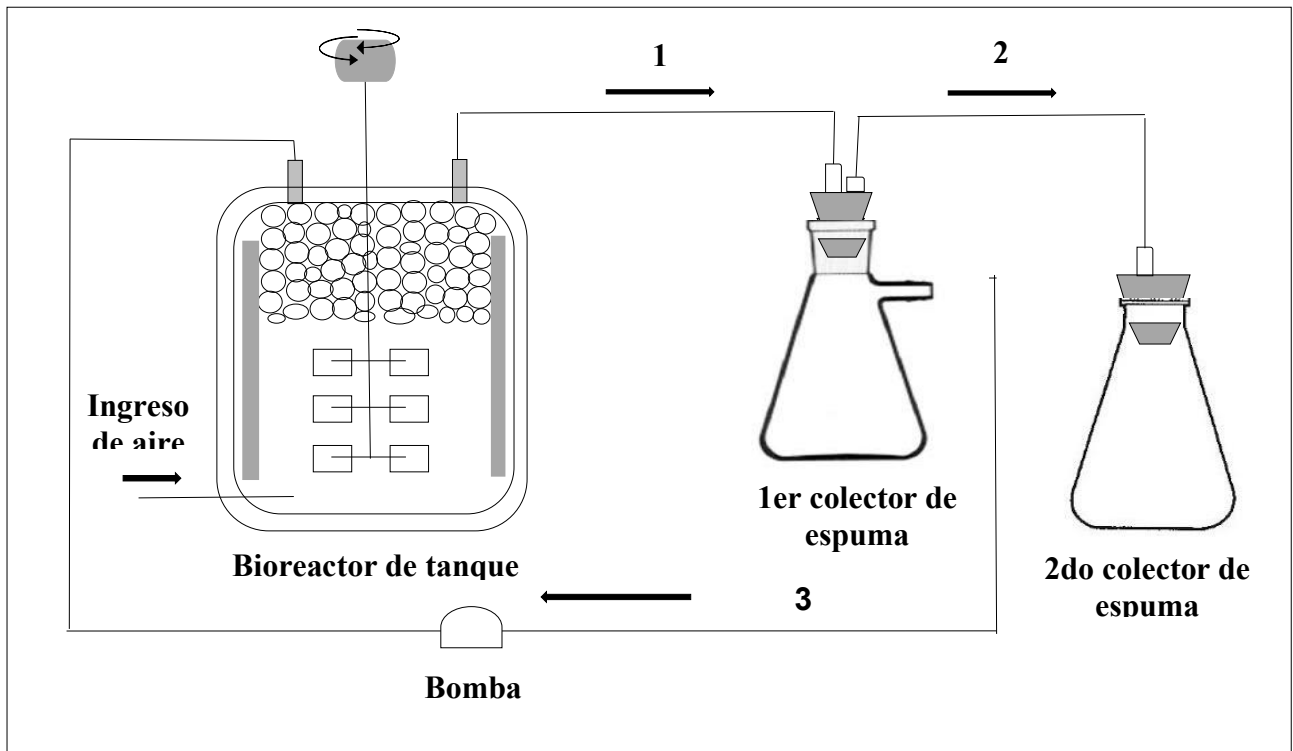


Figura 1: Diagrama del proceso de producción a nivel de biorreactor de tanque agitado

El crecimiento celular y el peso seco del crudo de lipopéptidos se determinó siguiendo la metodología explicada en la optimización de fuentes de carbono y nitrógeno.

Para el recuento de células esporogénicas (APFA 1992), 3 matraces conteniendo 100 mL de Agar TGE fueron fundidas y temperadas en baño maría entre 44 a 46° C. A partir de la muestra colectada se preparó una suspensión en solución salina con una transmitancia entre 90 a 93 por ciento. De la suspensión preparada se pipeteó 10 mL en el primer matraz conteniendo TGE, 1 mL en el segundo y 0.1 mL en el tercer matraz. El contenido se agitó vigorosamente. Los matraces se colocaron en baño maría a una temperatura de 80° C por 30 minutos. Al finalizar el tiempo de incubación, los matraces se colocaron en baño maría entre 44 a 46° C por 10 minutos como máximo. El contenido de cada matraz se vertió en 5 placas Petri y se incubaron a 35° C por 48 horas. El cálculo las UFC/mL, para lo cual se realizó el recuento de las colonias superficiales y sub superficiales de cada una de las cinco placas Petri; la suma de ellas representó el número de colonias esporogénicas mesófilas aerobias por dilución.

3.15. MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS EXTRACELULARES

La tasa de producción de metabolitos extracelulares por *Bacillus* IcBac2.1 fue descrito por el modelo matemático de Luedeking y Piuret. La expresión matemática del modelo se muestra a continuación:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (\text{Eq. 1})$$

Donde:

dP/dt : Tasa de formación del producto ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$)

dX/dt : Tasa de crecimiento celular ($\text{g L}^{-1}\text{h}^{-1}$)

X : Concentración celular (g L^{-1})

α : Coeficiente de formación del producto asociado al crecimiento ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)

β : Coeficiente de formación del producto no-asociado al crecimiento ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)

Transformamos la fórmula al sustituir:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (\text{Eq. 2})$$

En la fórmula (1):

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \mu X + \beta X \quad (\text{Eq. 3})$$

Dividimos entre la biomasa ($1/X$):

$$\frac{1}{X} \frac{dP}{dt} = \frac{1}{X} \alpha \mu X + \frac{1}{X} \beta X \quad (\text{Eq. 4})$$

Quedando que $dP/(dt X) = q_p$ es la tasa específica de formación del producto ($\text{g L}^{-1} \text{t}^{-1}$) y al simplificar puede ser expresado como:

$$q_p = \alpha \mu + \beta \quad (5)$$

Donde:

q_p : tasa específica de formación del producto ($\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$)

μ : Tasa específica de crecimiento (h^{-1})

α : Coeficiente de formación del producto asociado al crecimiento ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)

β : Coeficiente de formación del producto no-asociado al crecimiento ($\text{g g}^{-1} \text{h}^{-1}$)

Se utilizó el programa Microsoft Excel para determinar el valor de los parámetros cinéticos α y β mediante la linealización de la ecuación del modelo en Eq. 1. Así también, los valores de los parámetros cinéticos mencionados fueron predecidos. Finalmente, se determinó el coeficiente de correlación (R^2) para conocer la exactitud del modelo cinético de fermentación.

3.16. PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS NO VOLÁTILES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

3.16.1. Extracción de metabolitos con actividad antifúngica a partir del cultivo bacteriano

La preparación del supernadante libre de células microbianas fue obtenida a partir de un cultivo microbiano de 72 horas de incubación a 28° C en agitación constante a 150 rpm. La cepa microbiana con la mejor actividad antagonista fue cultivada en frascos de 250 mL conteniendo 100 mL del medio mineral (g/L): K_2HPO_4 0.1, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, NaCl 0.01, KCL 0.05 y $FeSO_4 \cdot 5 H_2O$ 0.001, suplementado con una fuente carbonada (almidón 20 g/L) y fuente nitrogenada (extracto de levadura 8 g/L). El medio mineral fue inoculado con el 10 por ciento de un cultivo puro de 8 horas de edad previamente crecida en caldo Casoy. El cultivo fue incubado a 28° C en agitación constante a 150 rpm. La concentración celular correspondió a O.D._{600nm} 0.5 (10^6 cel./mL).

Después del tiempo de incubación, el contenido fue colocado en tubos cónicos y centrifugado a 9000 rpm durante 15 minutos a 4° C. El supernadante fue cuidadosamente removido y filtrado a través de una membrana estéril por radiación gamma de PVDF de 0.22 μ m (Millex-GV Milipore®) (Sihem *et al.* 2011; De La Cruz *et al.* 2011). El precipitado fue mantenido a -20° C. Los lipopéptidos antifúngicos presentes en el supernadante libre de células fue precipitado añadiendo HCl 2N hasta un pH final de 2 e incubado a 4° C durante toda la noche para favorecer la precipitación de los lipopéptidos. El pellet acidificado fue colectado centrifugando la muestra a 9000 rpm por 20 minutos a 4° C y lavado tres veces con agua destilada.

Se realizó la extracción líquido - líquido utilizando solventes orgánicos polares y apolares. Se evaluó diferentes solventes que incluyeron: éter de petróleo, n-hexano, diclorometano, acetato de etilo, butanol, cloroformo, acetona, metanol y cloroformo: metanol (2:1 v/v). El pellet se extrajo tres veces con un volumen igual al del solvente orgánico. La extracción con

el solvente orgánico se realizó en un embudo de decantación a temperatura ambiente. La mezcla se agitó vigorosamente durante varios minutos y se dejó reposar durante 15 minutos hasta la separación de fases, este proceso se repitió 10 veces por alícuota. La fase orgánica se concentró en un evaporador rotatorio a 60° C y se resuspendió en una solución tampón de PBS 0,02 mol⁻¹ (pH 7.3 – 7.4). La capacidad del solvente orgánico para extraer el metabolito antifúngico contra los hongos patógenos *S. sclerotiorum*, *F. oxysporum* y *R. solani* se determinó mediante el método de difusión en Agar.

3.16.2. Purificación por cromatografía líquida al vacío y cromatografía Flash

Se realizaron dos cromatografías; en la primera, el extracto crudo fue purificado por cromatografía líquida al vacío en una columna de vidrio (20 mm de diámetro x 350 mm de alto) conectado a una bomba de presión al vacío (51 kPa). La columna fue empaquetada con 30 g de sílica gel previamente disuelta en acetonitrilo. 500 mg de la muestra fue colocado en combinación con 5 g de sílica gel. Se utilizó diferentes sistemas de solventes: diclorometano al 100 por ciento, posteriormente se fue agregando cloroformo comenzando con cinco por ciento e incrementándose diez por ciento en cada corrida hasta llegar a reemplazar el diclorometano por completo por el cloroformo, posteriormente, se fue agregando acetona en forma sucesiva empezando desde el cinco por ciento e incrementándose diez por ciento en cada corrida hasta llegar a reemplazar la acetona por completo por metanol, se terminó con metanol 100 por ciento. 40 mL de cada solvente orgánico pasaron a través de la columna y se colectaron 5 mL en diferentes tubos para realizar cromatografía en capa fina. De los tubos colectados, según el patrón de bandas presentes en la cromatografía en capa fina se juntó los que presentaron patrones parecidos. Las fracciones colectadas fueron concentradas en un evaporador rotatorio a 60° C con baja presión de vacío. Así también, se realizó la identificación de la fracción que contenía los metabolitos con actividad antifúngica contra *Rhizoctonia solani*. Para lo cual, 10 µL de cada fracción fue colocado por separado en un disco de papel filtro (6 mm de diámetro) y se dejó secar en el interior de una cámara de flujo laminar. Posteriormente, el disco de papel filtro fue colocado en un extremo de la placa Petri conteniendo APD. En el otro extremo, se colocó un disco de APD colonizado previamente con el hongo. La preparación se incubó a 25° C por 5 días. Se realizó la medición del diámetro de la colonia fúngica (mm) a evaluar hasta que el micelio fúngico de la placa control creció completamente sobre el medio de cultivo.

En la segunda cromatografía, se realizó cromatografía Flash en una columna C18 (SEP-PAK VAC C18 6CC .5G Waters) y el sistema de solvente acetonitrilo: agua en gradiente: 95/5, 70/30, 45/55, 30/70 y 0/100. La columna fue equilibrada con 5 mL de metanol.

3.16.3. Cromatografía en capa fina

1mg/mL del extracto butanólico se disolvió en una cantidad mínima de metanol y se sometió a cromatografía de capa fina (TLC) en lámina (ALUGRAM Xtra SIL G aluminium sheets SIL G UV 254 Thickness of layer 0.20) y se revelaron con n-hexano, cloroformo y metanol 20:60:20 v/v/v como fase móvil. Las manchas se detectaron bajo luz ultravioleta (Spectroline® CM UV-viewing cabinet 365nm/254nm). Posteriormente, la lámina de cromatografía en capa fina fue colocada en un extremo de la placa Petri conteniendo APD. En el otro extremo, se colocó un disco de APD colonizado previamente con el hongo. La preparación se incubó a 25° C por 5 días.

Se realizó la medición del diámetro de la colonia fúngica (mm) a evaluar hasta que el micelio fúngico de la placa control creció completamente sobre el medio de cultivo.

3.16.4. Purificación por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) en fase reversa

La fracción que mostro mayor actividad antifúngica contra *R. solani* fue analizada en HPLC (Agilent 1260) en una columna C18 (SB-C8 Analytical HPLC Col 4.6 x 150 Agilent) y el sistema de solventes acetonitrilo: agua Mili Q en gradiente: 95/5 (0 minutos), 70/30 (10 minutos), 45/55 (13 minutos), 30/70 (18 minutos), 30/70 (25 minutos) y 0/100 (27 minutos). El volumen de inyección de la muestra fue de 1 µL con una velocidad de flujo de 1 mL/minuto a 25° C de temperatura. Se evaluó diferentes longitudes de onda (250, 264, 290, 271, 316 and 366 nm).

3.17. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA POR LC-MS

El análisis LC-MS se realizó en un espectrómetro de masas Impact II de alta resolución (Bruker Daltonics Corporation, Alemania) con geometría Q-TOF, equipado con una fuente de ionización tipo electrospray, operado en modos positivo y negativo con una tasa de adquisición de 5 Hz (MS y MS /MS) en el rango de masa de m/z 50 – 1000. Los análisis se

realizaron con un voltaje capilar de 4,0 kV; temperatura de la fuente 180°C; y flujo de gas de desolvatación 4 L min⁻¹. Los experimentos de MS/MS se realizaron utilizando disociación inducida por colisión (CID) con una rampa de energía de colisión en el rango de 15 a 40 eV. Los 5 iones más intensos fueron seleccionados para fragmentación automática (Auto MS/MS).

3.18. CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS NO VOLÁTILES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Se realizó la caracterización de los metabolitos antifúngicos seleccionados considerándose estabilidad térmica, estabilidad de pH (Abdel 2013) e índice de emulsión (Zhu *et al.* 2012).

3.18.1. Estabilidad a diferentes temperaturas y pH

En la prueba de termoestabilidad, el extracto crudo se almacenó durante 30 min a 40, 60, 80°C y se esterizaron en autoclave durante 15 min a 121 °C. Después de que la temperatura de las muestras descendiera a 20° C, se evaluó la actividad antifúngica a través del método de difusión en pozo de agar. Después de incubar durante 5-7 días a 28° C, se cuantificó la inhibición del crecimiento fúngico utilizando la fórmula de porcentaje de inhibición anterior. El experimento se repitió dos veces.

La prueba de estabilidad del pH, el extracto crudo se ajustó a pH 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 14 usando 1 N de HCl o NaOH. Después de mantener la muestra durante la noche a temperatura ambiente, en cada muestra se restableció el pH a 7. La actividad antifúngica se evaluó a través del método de difusión en pozo de agar explicado anteriormente. Después de incubar durante 5-7 días a 28°C, se cuantificó la inhibición del crecimiento fúngico utilizando la fórmula de porcentaje de inhibición anterior. El experimento se repitió dos veces.

3.18.2. Solubilidad en disolvente orgánico

Los compuestos bioactivos se caracterizaron en base a su polaridad. Se realizó la extracción líquido-líquido de los metabolitos antifúngicos utilizando diferentes disolventes polares y no polares, como hexano, éter de petróleo, acetato de etilo, cloroformo, butanol, acetona y metanol (2:1 v/v). Los metabolitos antifúngicos se extrajeron tres veces con un volumen igual de disolvente. La extracción con solvente se realizó en un embudo de decantación (a temperatura ambiente). La mezcla se agitó vigorosamente durante varios minutos y se dejó

reposar durante 10 minutos hasta la separación de fases. La fase orgánica se secó en un evaporador rotatorio a 60 °C y se resuspendió en solución tampón de PBS 0,02 mol⁻¹. La capacidad del disolvente para extraer los compuestos antifúngicos se determinó mediante el método de difusión en pozos de agar.

3.18.3. Índice de emulsificación (E24)

El método de índice de emulsificación (E24) fue analizado añadiendo 2 mL del supernadante libre de células en tubos que contenían la misma cantidad de aceite mineral de soya, maní y cacahuete, se mezcló en vórtex por un periodo de dos minutos y luego se dejó reposar a temperatura ambiente por 24 horas. EL índice E24 fue calculado como la altura de la capa emulsificada (cm) dividida por el total de la columna líquida (cm) por 100. Se utilizó como control positivo el surfactante sintético (1g/L) SDS (Dodecil sulfato de sodio).

3.19. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Se determinará la CMI a partir de diferentes extractos orgánicos con una concentración conocida del crudo del lipopéptidos. Se colocó por separado 10 µL de las diferentes concentraciones en discos de papel filtro (6 mm de diámetro) estériles, los cuáles posteriormente fueron transferidos sobre la superficie del agar APD. 5 mm de un disco de micelio del hongo patógeno *R. solani* fue inoculado en el centro de la placa. Las placas fueron incubadas a 25° C por 4 días. Se consideró la CMI aquella menor concentración que inhibió el crecimiento micelial del hongo patógeno (Balouiri *et al.* 2016).

3.20. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS VOLÁTILES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA – CROMATOGRAFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS (SPME-GS-MS)

Se utilizó SPME/GC-MS para identificar los compuestos orgánicos volátiles producidos por las 2 mejores cepas antagonistas *Alcaligenes* TvPs2.4 y *Pseudomonas* TvPs1-06 para inhibir el crecimiento de *R. solani*, *S. sclerotiorum* y *F. oxysporum*. Para extraer los compuestos volátiles, 2 mL de una suspensión bacteriana de 16 horas de edad fue inoculado en 25 mL de caldo TSB contenido en un vial de 100 mL de capacidad e incubado a 28° C por 24 horas.

Una fibra de microextracción de fase sólida (SPME) Divinilbenceno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco, Fluka) de 2 cm fue utilizado para coleccionar los compuestos orgánicos volátiles. La fibra de SPME fue insertada en el headspace del vial de vidrio justo por debajo del medio inoculado y se permitió equilibrar por 30 minutos. El análisis GC-MS fue realizado utilizando Cromatógrafo de Gases (Agilent Technologies 7890-GC) en combinación con Espectrometría de Masas (Agilent Technologies 5975C MS). Una columna capilar J&W 122-1545.67659 DB-5ms, (60 m x 250 µm x 0.25 µm) fue utilizada para separar los compuestos volátiles. El helio fue utilizado como gas transportador a un flujo constante de 1 mL min⁻¹. La fibra SPME fue insertada en el puerto del inyector y desorbida a 70° C por 1 minuto. La temperatura del inyector fue finalmente mantenida a 300° C. La temperatura de trabajo de la columna fue programada como sigue: 70° C al inicio y subió 5° C por minuto hasta 110° C y finalmente 30° C por minuto hasta 300° C.

El *software* AMDIS fue utilizado para visualizar la data del GC-MS y la librería MS NIST08 fue utilizado para identificar los compuestos orgánicos volátiles por medio de patrones cromatográficos.

3.21. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE RIZOBACTERIAS PROMOTORAS DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN EL CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS A NIVEL DE CAMPO

La evaluación de la eficacia de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en el control de fitopatógenos se realizó en un campo de la Estación Experimental del Programa de Leguminosas de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM) localizado en Pachacámac (12°16'37"S, 76°52'34"W) a 78 msnm. El experimento será realizado con semillas de frijol común variedad centenario del Programa de Oleaginosas y Leguminosas de la UNALM.

El experimento se organizó en parcelas (7,2 m²) compuestas por tres surcos y 44 plantas de frijol común cv. centenario por cada surco dispuestas en un diseño de bloques completos al azar con tres repeticiones. Se consideraron ocho tratamientos: *Bacillus* IcBac2.1, *Rhizobium* M2a, los inoculantes controles *Bacillus* B15MB (Calvo *et al.* 2010), *Rhizobium* E10, la doble interacción *Bacillus* IcBac2.1 + *Rhizobium* M2a, *Bacillus* IcBac2.1 + *Rhizobium* E10, el control sin inocular y un control químico.

Para la producción de los inoculantes microbianos, *Bacillus* IcBac2.1 y *Bacillus* B15 se cultivaron en matraces de 25 mL de capacidad conteniendo 10 mL de caldo nutritivo. Así también, *Rhizobium* E10 y *Rhizobium* M2a se cultivarán en caldo manitol levadura (YMB). Las cepas serán incubadas a 28° C en agitación constante a 150 rpm hasta que los cultivos alcancen 10⁸ UFC/mL medido a una densidad óptica a 600 nm.

Se peletizó 356 gramos de semillas (1056 semillas) con suspensión bacteriana (10⁸ UFC/mL) previamente mezclada con 1 g de suelo agrícola (Zuñiga 2012). Las bacterias fueron primero inoculadas en las semillas y luego mediante aplicaciones sucesivas en el cuello de las plantas durante diferentes etapas del crecimiento: floración temprana, formación de vainas y llenado de vainas. Para el tratamiento del cuello de la planta, las plantas se pulverizarán con 6 mL de 2E+05 UFC/mL de una suspensión bacteriana. Como control químico se utilizarán fungicidas a base de los principios activos Metil Tiofanato y Tiram, y serán aplicados sobre las semillas y hojas.

El porcentaje de incidencia de la enfermedad (por ciento IE) causada por el hongo fitopatógeno se evaluará en el momento mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Por ciento IE} = \frac{\text{Número de plantas infectadas}}{\text{Número total de plantas evaluadas}} \times 100$$

Para evaluar la eficacia de las cepas de *Bacillus* y *Rhizobium* para promover el crecimiento de las plantas, se recolectaron plantas en diferentes etapas de crecimiento. Al inicio del experimento, después de la siembra se evaluará el porcentaje de germinación. En la etapa de prefloración, se recolectarán diez plantas del surco central de cada parcela y se medirá la altura de planta (cm), el peso fresco y seco (g) y el número de botones florales. El peso seco de la planta se medirá después de secar las plantas a 80 °C durante tres días. En la cosecha se evaluará el número de vainas/planta y el rendimiento del grano (kg/ha).

El análisis estadístico se realizó empleando el *software* Statgraphics Centurion XVI. Se llevará a cabo un ANOVA, con un valor de p<0.05. Posteriormente se realizará una prueba de múltiples rangos (LSD) de Fischer.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS SUELOS RIZOSFÉRICOS MUESTREADOS

Las muestras de suelo rizosférico fueron colectadas a partir de plantas de frijol de diferentes estados de crecimiento fenológico y variedades como Canario Centenario, Bayo – Chimú y Laren. Las plantas de frijol crecieron en diferentes ecosistemas y altitudes de la costa peruana como el desierto costero (Ica y Huacho-Lima) y el bosque estacionalmente seco de colina y montaña (Trujillo-La Libertad, Viru-La Libertad y Olmos-Lambayeque) (Cuadro 4).

Cuadro 4: Características de los campos muestreados

Muestra	Localidad	Ecosistema	Variedades de Frijol	Temperatura (°C)	Altitud(msnm)	Coordenadas
1	Santa Cruz - Ica	Desierto costero	C. Centenario	20.3	114	13°49'21''S 76°08'05''W
2	Cabeza de Toro - Ica	Desierto costero	C. Centenario	20.9	314	13°36'01''S 76°01'34''W
3	Huacho - Lima	Desierto costero	C. Centenario	20.4	56	11°03'33''S 77°36'44''W
4	Viru - La Libertad	BESLL	Bayo Chimú	21.9	76	8°23'11.54''S 78°43'9.74''W
5	Trujillo - La Libertad	BESLL	Bayo Chimú	19.5	550	7°32'3.45''S 8°57'4.02''W
6	Olmos -	BESLL	C. Centenario	24.8	170	5°58'09''S 79°45'14''W
7	Lambayeque	BESLL	C. Centenario	21.1	170	5°58'09''S 79°45'14''W

BESLL: Bosque estacionalmente seco de llanura, C. Centenario: Canario Centenario

Las localidades muestreadas presentaron temperaturas medias con valores mínimos de 13.1°C – 18.7° C y valores máximos de 20.7° C – 25.0° C, humedad relativa promedio de 68.8 - 94.7 por ciento y nula precipitación (Cuadro 5).

Las características fisicoquímicas de las muestras de suelo rizosférico de las siete localidades muestreadas (Cuadro 6) indican que los suelos de Huacho y Olmos en Lambayeque se caracterizaron por poseer suelos Francos, mientras que los campos de las localidades de Cabeza de Toro - Ica y Trujillo en la Libertad fueron Franco Arenosos y los de Santa Cruz - Ica y Viru en la Libertad fueron Franco Limosos. Los valores de pH en promedio del suelo rizosférico en Olmos - Lambayeque fue menor (ligeramente alcalino: 7.1 – 7.8) que los encontrados en los demás campos (moderadamente alcalinos: 7.9 – 8.4). Todos los suelos de las localidades muestreadas fueron muy ligeramente salinos (<2). En cuanto al contenido de materia orgánica, la mayoría de los suelos presentaron bajo contenido (<dos por ciento), mientras que Huacho presentó un valor medio en materia orgánica (2 - 4 por ciento). El contenido de fósforo disponible fue bajo en la mayoría de los suelos (<7 ppm), mientras en Olmos - Lambayeque el suelo presentó un valor medio (7.0 ppm-14.0 ppm). El contenido de potasio disponible en los suelos de Santa Cruz – Ica, Cabeza de Toro – Ica y Trujillo - La Libertad presentaron un valor medio (100 ppm -240 ppm), mientras que las localidades de Huacho – Lima, Viru - La Libertad y Olmos – Lambayeque presentaron alto contenido de potasio disponible (>240 ppm).

Cuadro 5: Parámetros meteorológicos de las localidades muestreadas

Muestra	Localidad	Parámetros meteorológicos			
		Temperatura (° C)		Humedad relativa (por ciento)	Precipitación (mm)
		Mínima	Máxima		
1	Santa Cruz - Ica	13.1	21.5	92.5	0
2	Cabeza de Toro - Ica	14.4	23.1	94.7	0
3	Huacho - Lima	15.9	20.7	83.9	0
4	Viru - La Libertad	18.7	23.8	83.7	0
5	Trujillo - La Libertad	16.4	20.8	87.6	0
6	Olmos - Lambayeque	18.5	25.0	68.8	0
7		17.6	22.0	75.5	0

Fuente: SENAMHI

Cuadro 6: Características fisicoquímicas de las muestras de suelo rizosférico

Muestra	Características fisicoquímicas	pH	C. E. dS/m	CaCO ₃ %	M.O. %	P ppm	K ppm	Clase Textural
1	Santa Cruz - Ica	8.09	0.81	3.5	0.8	1.7	129	Franco Limoso
2	Cabeza de Toro - Ica	8.11	0.39	3.1	0.85	1.1	173	Franco Arenoso
3	Huacho - Lima	8.22	4.22	5.1	3.01	4.6	300	Franco
4	Viru - La Libertad	8.37	0.75	2	0.88	1.1	446	Franco Limoso
5	Trujillo - La Libertad	8.06	0.85	1	0.6	2.3	101	Franco Arenoso
6	Olmos - Lambayeque	7.77	0.39	0	1.86	7.9	722	Franco
7	Lambayeque	7.55	0.53	0	1.74	12.1	836	Franco

C.E.: Conductibilidad eléctrica, M.O.: Materia Orgánica, K: Potasio, P: Fósforo

El cultivo del frijol se desarrolla desde el trópico hasta la zona templada, por lo que tiene un amplio rango de adaptación a las temperaturas, siendo la temperatura óptima para el desarrollo del cultivo de frijol entre 18 a 21° C, aunque puede extenderse hasta los 26° C en climas cálidos, así también, prefiere suelos de textura franca, limosa o franco limoso (Camarena *et al.* 2012). En ese sentido, el Perú cuenta con una amplia gama de ecosistemas que permiten el crecimiento de diferentes especies de leguminosas, donde el cultivo del frijol común está muy extendido en la región costera. Esta región está dominada por un extenso desierto y primeras estribaciones andinas, se extiende desde el nivel del mar hasta los 1500-2000 m.s.n.m. aproximadamente. La zona sur y central, dominada por planicies y cerros, corresponde a un ecosistema desértico en el que, debido a las neblinas invernales, pueden desarrollarse comunidades vegetales. La región de bosque seco de la costa norte, también conocida como bosque seco ecuatorial, es una región con precipitaciones estacionales y escasas. El Perú ocupa el tercer lugar entre los países con mayor extensión de tierras secas en América del Sur, ocupando el 40,2 por ciento del territorio nacional peruano. Esta zona solo recibe el dos por ciento de la precipitación total del país (MINAGRI 2018).

4.2. AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE BACTERIAS DE LA RIZOSFERA DE PLANTAS DE FRIJOL

El análisis poblacional mostró la presencia de bacterias Gram negativas no fermentativas entre 10^4 a 10^5 NMP/g y de bacterias Gram positiva entre 10^4 y 10^6 UFC/g (Cuadro 7). El resultado indico que a pesar del bajo contenido de nutrientes (1.1-12.1 por ciento de disponibilidad de fósforo y 0.6-3.01 por ciento de materia orgánica), la población bacteriana se desarrolló debido a valores de pH levemente alcalino y a la temperatura del suelo (Cuadro 4 y 6).

Cuadro 7: Análisis poblacional de los microorganismos aislados a partir de las muestras suelo rizosférico

Muestra	Localidad	Conteo	
		<i>Bacillus</i> (UFC/g)	Gram - (NMP/g)
1	Ica	1.10E+05	2.00E+04
2	Ica	1.00E+05	1.10E+04
3	Lima - Huacho	3.30E+05	2.10E+05
4	La Libertad - Virú	8.30E+04	2.00E+04
5	La Libertad - Trujillo	2.00E+05	2.00E+04
6	Lambayeque - Olmos	2.70E+05	2.10E+04
7	Lambayeque - Olmos	4.60E+05	2.00E+04

En total, se aislaron 425 cepas y seleccionaron 26 colonias antagonistas morfológicamente diferentes capaces de reducir el 50 por ciento del crecimiento micelial de al menos dos de los tres hongos fitopatógenos evaluados mediante la técnica de cultivo dual (Cuadro 8). Los aislamientos fueron evaluados en su capacidad de inhibir el crecimiento fúngico de *R. solani*, *S. sclerotiorum* y *F. oxysporum* (Figura 3). Veinte aislados fueron Gram positivos y de morfología bacilar con colonias blancas opacas con bordes irregulares las cuales fueron identificadas como típicas del género *Bacillus*. El resto de aislamientos (16) fueron Gram negativas y de morfología bacilar con colonias pigmentadas de color verde fluorescentes, amarillos y anaranjadas. Estas bacterias fueron capaces de crecer utilizando como fuente de nitrógeno el aminoácido D/L Asparagina. El caldo Asparagina fue utilizado en el proceso de diferenciación de bacterias Gram negativas, especialmente *Pseudomonas*.

Cuadro 8: Total de cepas aisladas a partir de las diferentes muestras de suelo rizosférico y total de cepas antagonistas seleccionadas con sus respectivos códigos

Localidad	Total de cepas aisladas	Total de cepas antagonistas	Códigos
Ica	58	11	IcBac1.4, IcBac2.1, IcBac2.9, IcBac2.12, IcBac2.16, IcBac2.21, IcBac2.23, IcBac3.3, IcPs1.18, IcPs2.26, IcPs2.5
Huacho	84	1	HuaBac1.13
La Libertad	160	12	TrBac1.17, TrBac2.32, TrBac2.40, TvPs1.2, TvPs1.5, TvPs1.6, TvPs1.7, TvPs1.8, TvPs1.12, TvPs2.4, TvPs3.6, TvPs3.7.
Lambayeque	123	2	LPs2.15, LPs3.8
Total	425	26	

Veintiuna cepas redujeron el crecimiento de *S. sclerotiorum* con porcentajes de inhibición que oscilaron entre el 44 por ciento y el 86 por ciento. Veintitrés cepas redujeron el crecimiento de *R. solani* con porcentajes de inhibición que oscilaron entre el 52 por ciento y el 91 por ciento. Veinte cepas lograron controlar el crecimiento de *F. oxysporum* con porcentajes de inhibición que oscilaron entre el 53 por ciento y el 94 por ciento (Figura 2A). Del total, nueve cepas (35 por ciento) redujeron el crecimiento de dos de los hongos evaluados siendo en su mayoría contra *R. solani* y *S. sclerotiorum*, mientras que 17 cepas (65 por ciento) inhibieron el crecimiento de los tres hongos fitopatógenos (Figura 2B).

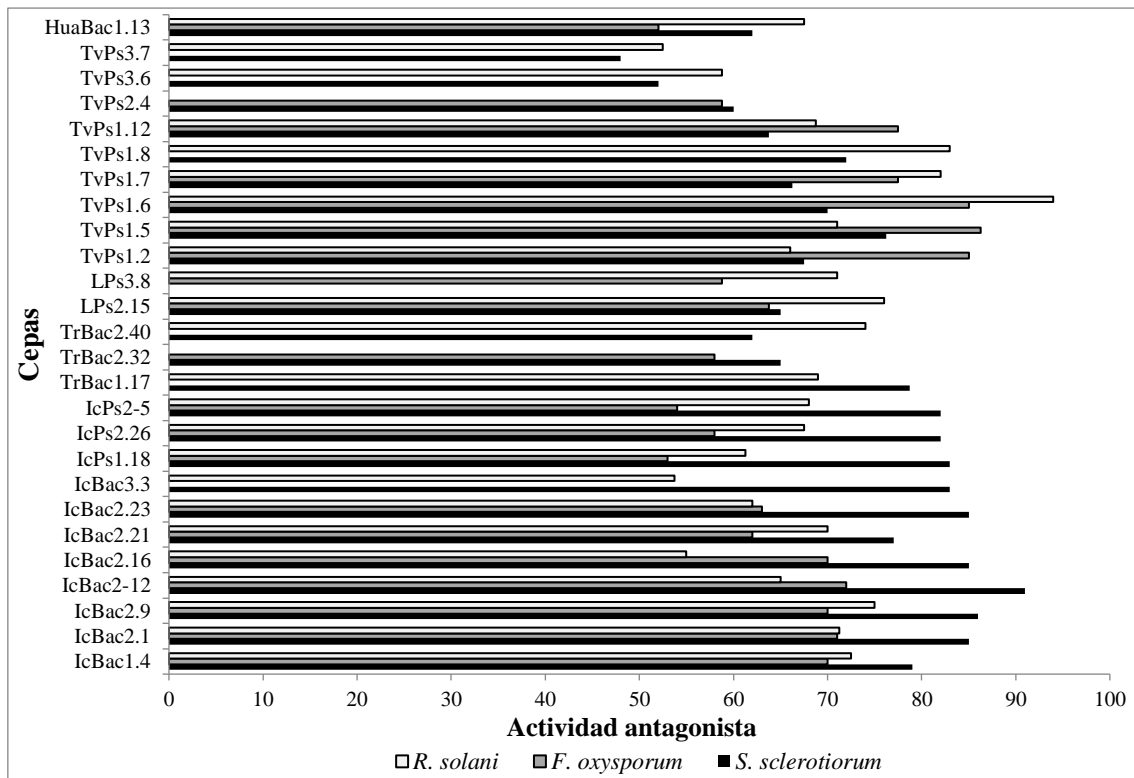


Figura 2A: Actividad antagonista de bacterias aisladas de la rizósfera de frijol procedente de campos localizados en Ica, Trujillo, Lambayeque, Virú y Huacho. Las barras representan los valores medios \pm SE

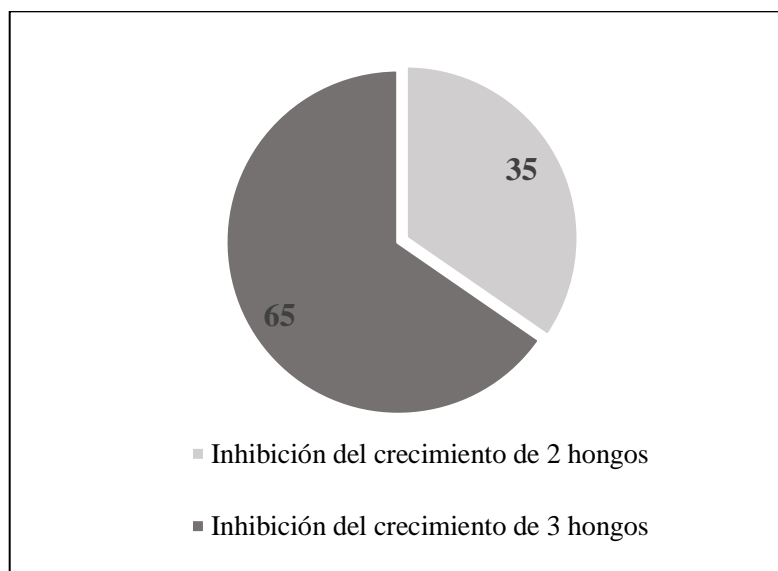


Figura 2B: Porcentaje de cepas antagonistas seleccionadas capaces de reducir el crecimiento micelial de 2 y 3 hongos fitopatógenos del suelo

El resultado del análisis del coeficiente de correlación de Pearson mostró que había una relación positiva y estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre el número total de bacterias

aisladas y la temperatura ambiental (0,8316), a diferencia de las propiedades fisicoquímicas del suelo (Cuadro 9). La temperatura del suelo de las localidades de Ica y Viru-La Libertad, cuyas temperaturas fueron de 20.9° C y 21.9° C respectivamente, presentaron mayor número total de bacterias aisladas, en comparación con otras localidades.

Cuadro 9: Coeficiente de correlación de Pearson entre los parámetros fisicoquímicos del suelo, temperatura del suelo y el número total de bacterias aisladas

	Número de Bacterias	CaCO ₃ %	CE	K	MO	P	pH	Temperatura
Número de Bacterias	1							
CaCO ₃ %	0.2251	1						
CE	-0.3231	0.7121	1					
K	-0.4104	-0.6433	-0.2011	1				
MO	-0.6723	0.2708	0.7642(*)	0.4174	1			
P	-0.7377	-0.5691	-0.0419	0.8695(*)	0.5239	1		
pH	0.6824	0.6979	0.3729	-0.6961	-0.1794	0.8885(*)	1	
Temperatura	0.8316(*)	0.1269	-0.5904	-0.4216	-0.7972(*)	-0.6194	0.3514	1

C. E.: Conductibilidad eléctrica, M.O.: Materia Orgánica, K: Potasio, P: Fósforo. Los valores marcados con (*) son estadísticamente significativo a $p < 0.05$

Un estudio realizado por el Ministerio del Ambiente (2021) sobre la población microbiana de la rizosfera del cultivo de frijol reportó la presencia de bacterias del género *Bacillus* asociados al cultivo en los departamentos de Ica, La Libertad y Lambayeque correspondiente a 4.94E+06, 1.11E+07 y 3.09E+06 UFC/g suelo seco y de bacterias fermentativas Gram-negativas del género *Pseudomonas* asociadas al cultivo, de 2.55E+03, 1.16E+04 y 4.50E+03 UFC/g suelo seco, confirmando que estos géneros están relacionados con la rizosfera de este cultivo, tal como se ha reportado en el presente estudio de investigación. Así también, la presencia de estas bacterias a pesar del bajo contenido de nutrientes en el suelo rizosférico podría deberse a la preferencia de estos géneros por un pH moderadamente alcalino y en el caso de *Bacillus* por su capacidad de formar esporas (Holt y Kreig 2012).

La comunidad microbiana presente en el suelo es fundamental para el desarrollo de las plantas al facilitar la absorción de nutrientes y brindar protección frente a hongos fitopatógenos las características edáficas del suelo y su interacción con la planta proporcionan una presión selectiva para la evolución de la microbiota bacteriana presente en el suelo (Felestrino *et al.* 2017).

La influencia de los exudados radiculares de las plantas en las poblaciones microbianas rizosféricas puede desempeñar un papel importante. Las sustancias o exudados producidos por las raíces pueden servir como fuente de energía e incluso inducir cambios en el pH, disponibilidad de sustratos, nutrientes y factores de crecimiento microbiano en la rizosfera (Reyes y Valery 2007).

Osorio (2007) afirma que el tipo de planta influye en la relación rizosfera/suelo, hecho que puede estar asociado a la cantidad y tipo de exudados, pero a pesar de esta relación, sólo el 4 a 10 por ciento de los microorganismos están en contacto con la superficie de la raíz.

4.3. AISLAMIENTO Y AUTENTICACIÓN *IN VITRO* DEL GÉNERO *Rhizobium*

A partir de los nódulos recolectados de la zona radicular de plantas de frijol variedad centenario cultivadas en campos del Programa de Oleaginosas y Leguminosas de la UNALM, se aislaron cuatro cepas de crecimiento rápido (48 horas) cuyas colonias se caracterizaron por ser transparentes o blanquecinas de apariencia mucosa con morfología de bacilos cortos, Gram negativos y no esporulados (Cuadro 10).

Cuadro 10: Total de cepas aisladas a partir de nódulos colectados de campos de frijol común

Cepa	Variedad de frijol	Procedencia
MFC-3a	Canario Centenario	Pachacámac - Lima
MFC-2a	Canario Centenario	Pachacámac - Lima
MFC-2b	Canario Centenario	La Molina - Lima
MFC-4a	Canario Centenario	La Molina - Lima

Las cepas fueron autenticadas a nivel *in vitro* observándose solo en la cepa MFC-2a la formación de nódulos con un diámetro de 1 – 3 mm de color rosados y amarillos con estrías blancas distribuidas de manera simétrica (Figura 3). En promedio se colectaron 38 nódulos entre las 4 plantas evaluadas con peso seco promedio de la parte aérea de 0.139 g (Cuadro 11).

Los nódulos colectados presentaron características típicas de nódulos de *Rhizobium*, además presentaron coloraciones rosadas tanto en la parte externa como interna, siendo más intenso en la parte interna, esto significa la efectividad del nódulo en la fijación de nitrógeno.

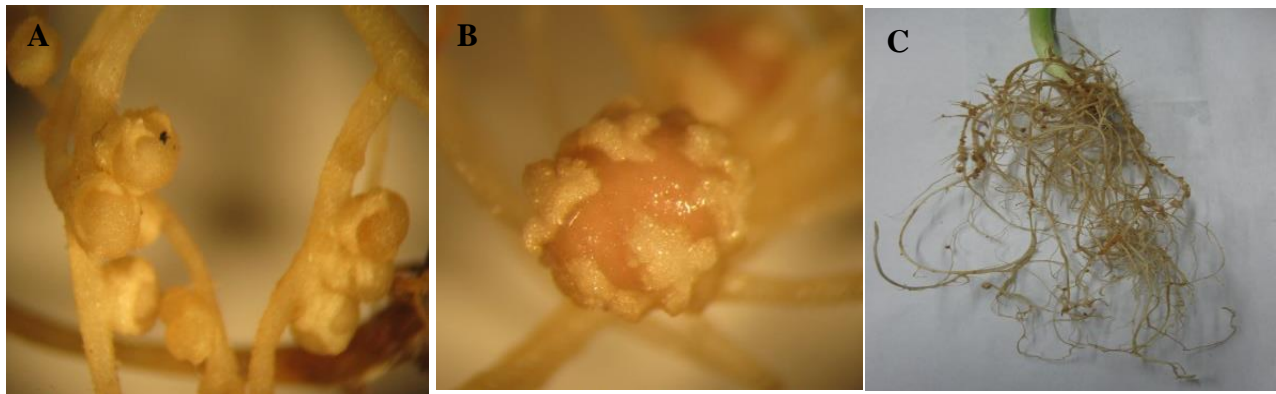


Figura 3: A y B. Nódulos de *Rhizobium* MFC-2a de color rosado y amarillo con estrías blancas distribuidas de manera simétrica. C. *P. vulgaris* mostrando nódulos en el sistema radicular de plantas crecidas in vitro

Cuadro 11: Número de nódulos y peso seco de la parte aérea en la prueba de autenticación in vitro de la cepa MFC-2A

Cepa	N° de nódulos/planta				PSPA (g)
	P1	P2	P3	P4	
MFC-2a	28	32	38	22	0.139

P: Planta, PSPA: Peso seco parte aérea

Una característica muy importante de las leguminosas es la simbiosis que establecen con bacterias fijadoras de nitrógeno, en órganos especiales denominados "nódulos radiculares" donde el nitrógeno (N₂) atmosférico es transformado en amonio el cual finalmente es asimilado por la planta para su crecimiento, por lo cual las leguminosas tienen la capacidad de crecer en suelos áridos o de escasa fertilidad (Ramírez *et al.* 2016). Las plantas de frijol establecen asociaciones simbióticas de manera promiscua con varias especies bacterianas fijadoras de nitrógeno comúnmente conocidas como rizobios.

4.4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS FITOPATÓGENOS DE PLANTAS DE FRIJOL INFECTADAS

A partir de campos de frijol común localizados en Pachacamac (12°06'58''S 76°47'37''W) y La Molina (12°04'55''S 76°57'09''W) en el distrito de Villa El Salvador y Lima, respectivamente, se observaron focos de infección por la proliferación de hongos

fitopatógenos del suelo. Se colectaron plantas con síntomas de marchitez, pudrición seca de raíz, cuello, tallo y ramas y canchros (Figura 4).

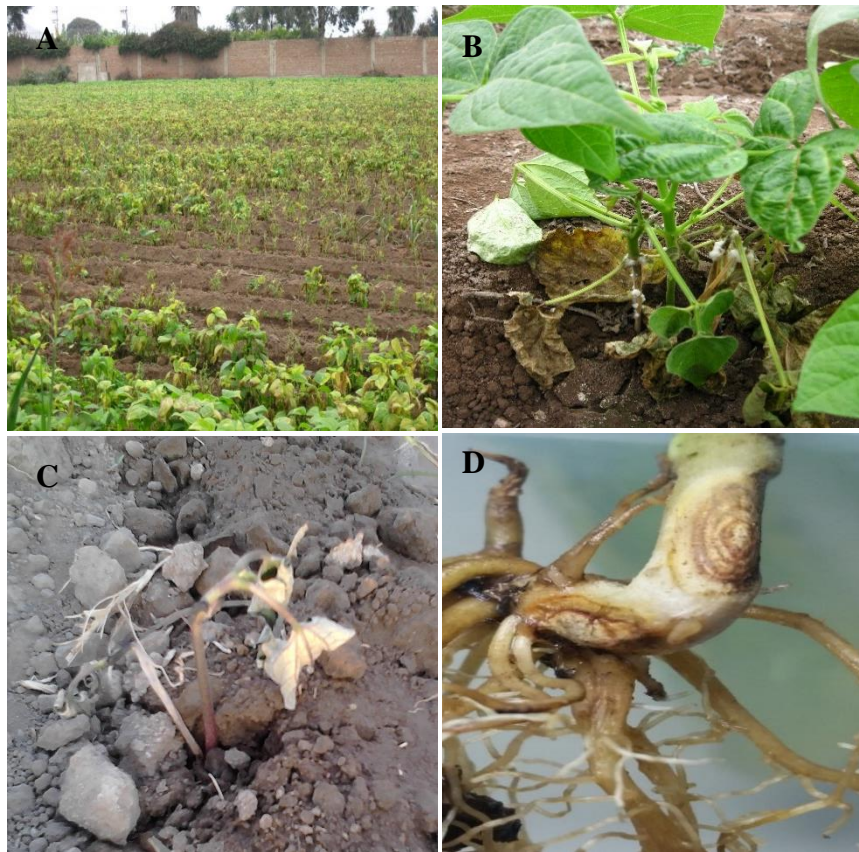


Figura 4: A. Plantas con síntomas de enfermedad colectadas en campos de frijol común con focos de infección causadas por la proliferación de hongos fitopatógenos del suelo. B. Plantas con pudrición seca y presencia de micelio blanquecino algodonoso en raíz, cuello, tallo y ramas. C. Plantas con marchitez. D. Cancros a nivel del cuello de la planta

Los hongos fueron identificados a través de observaciones macroscópicas de las colonias fúngicas, así como por observaciones microscópicas de sus estructuras reproductivas y vegetativas. La colonia fúngica de *S. sclerotiorum* presentó micelio blanquecino algodonoso con presencia de esclerotes oscuros de pequeño tamaño (Figura 5A). A nivel microscópico las hifas del hongo presentaron la formación característica de fibulas o clamps (Figura 5B). *R. solani* presentó micelio de color marrón a castaño algodonoso (Figura 5C), así también micelio formado por hifas con ramificaciones en ángulo recto (Figura 5D). En el caso de *F. oxysporum*, la colonia fúngica presentó micelio aéreo pigmentado de color rojo – rosado (Figura 5E) con presencia de macroconidias fusiformes septadas (Figura 5F), microconidias con septo (Figura 5G) y clamidosporas terminales (Figura 5H).

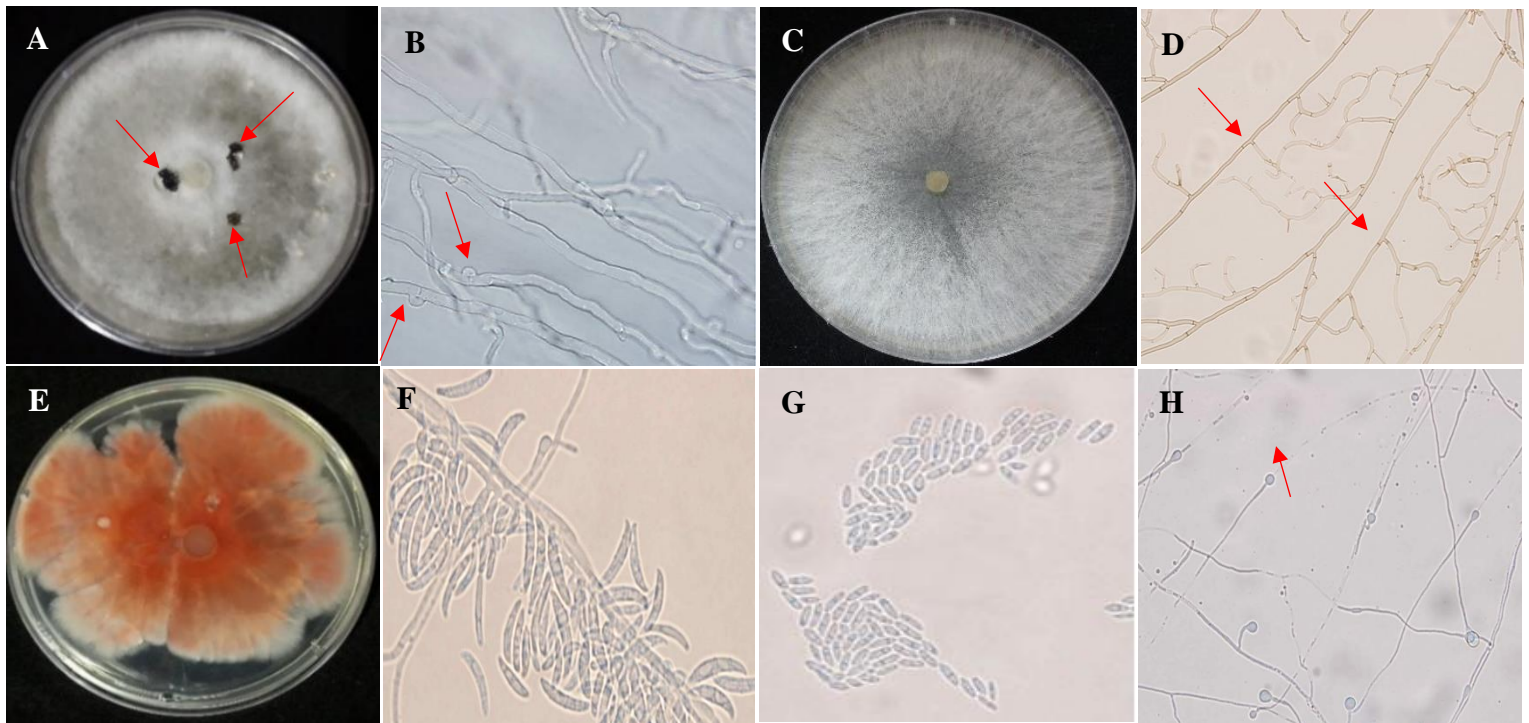


Figura 5: Características macroscópicas y microscópicas de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* y *R. solani*. A. Colonia blanquecina algodonosa de *S. sclerotiorum* con presencia de esclerotes (flecha roja) e B. hifas con formación característica de fibulas o clamps (flecha roja). C. Colonia de *R. solani* de color marrón a castaño algodonoso y D. micelio formado por hifas con ramificaciones en ángulo recto (Flecha roja). E. colonia fúngica de *F. oxysporum* con micelio aéreo pigmentado de color rojo – rosado con F. macroconidias fusiformes septadas, G. microconidias con septo y H. clamidosporas terminales

4.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE BACTERIAS ANTAGONISTAS DE LA RIZÓSFERA DE PLANTAS DE FRIJOL

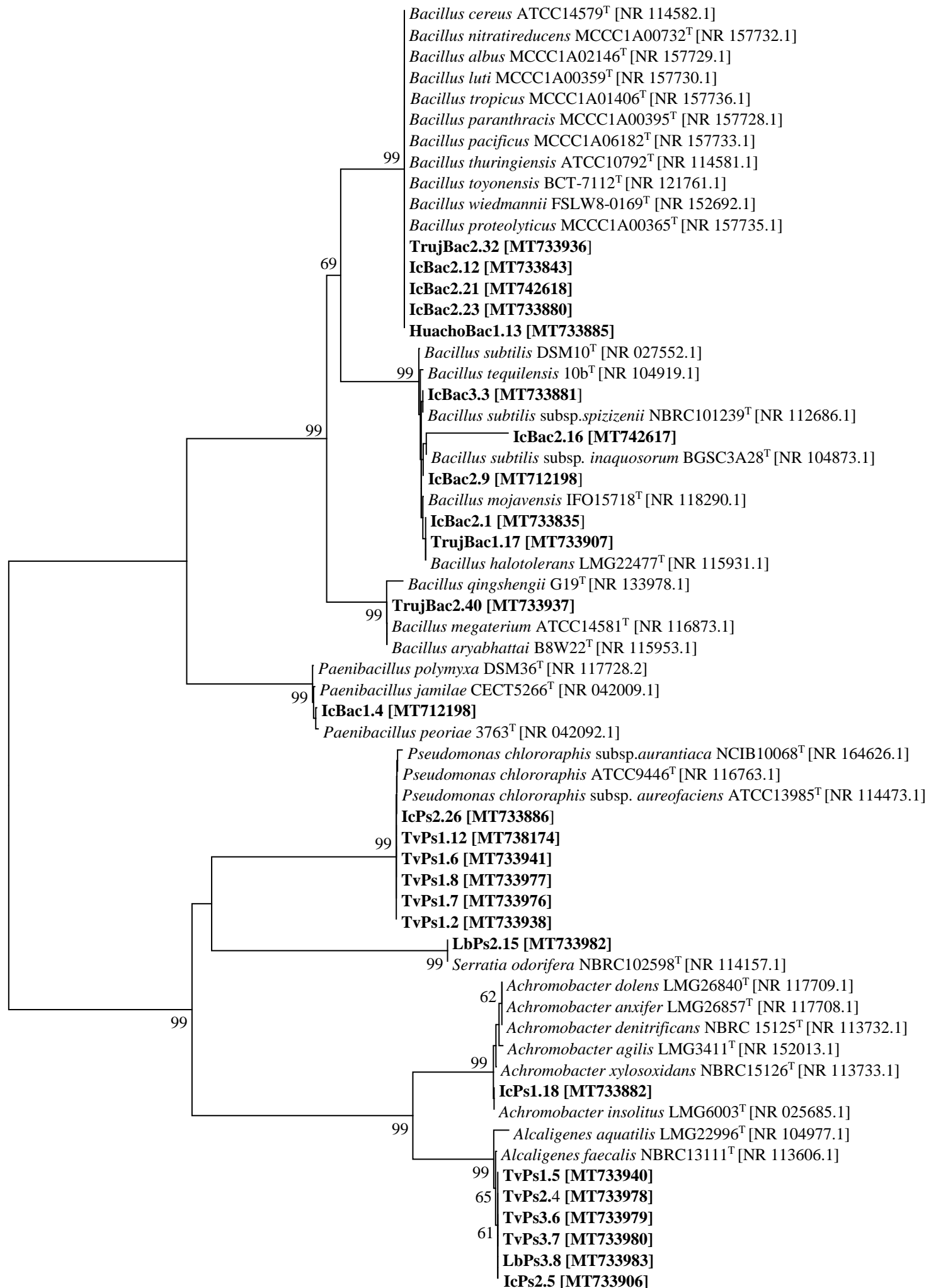
El árbol filogenético Neighbor-Joining (Figura 6) mostró que todos los aislamientos estudiados estuvieron relacionados en 6 grupos distribuidos entre los géneros *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Achromobacter* y *Alcaligenes*. Los resultados mostraron que la mayoría de los aislamientos estuvieron relacionados a los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Alcaligenes*. Entre los aislamientos de *Bacillus*, TrujBac2.32, IcBac2.12,

IcBac2.21, IcBac2.23 y HuachoBac1.13 estuvieron relacionados al grupo de *Bacillus cereus*. Mientras que IcBac3.3, IcBac2.16, IcBac2.9, IcBac2.1 y TrujBac1.17 estuvieron relacionados al grupo de *Bacillus subtilis*; dentro de este grupo IcBac2.1 y TrujBac1.17 fueron más cercanas a *Bacillus halotolerans*. Por otro lado, TrujBac2.40 estuvo relacionado a *Bacillus megaterium*.

El aislamiento IcBac1.4 estuvo dentro de un grupo que incluye a *Paenibacillus polymyxa*. Los aislamientos IcPs2.26, TvPs1.12, TvPs1.6, TvPs1.8, TvPs1.7 y TvPs1.2 estuvieron relacionados con la especie *Pseudomonas chlororaphis* y TvPs1.5, TvPs2.4, TvPs3.6, TvPs3.7, LbPs3.8 y IcPs2.5 estuvieron relacionados con *Alcaligenes faecalis*. Así también, el aislamiento LbPs2.15 mostró asociación con *Serratia odorifera* y solo IcPs1.18 estuvo relacionado con el género *Achromobacter*.

Bacillus and *Pseudomonas* son los géneros bacterianos más predominantes entre los microorganismos identificados como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal con capacidad de reducir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Podile and Kishore 2007). Diferentes estudios han reportado el aislamiento de cepas antagonistas capaces de controlar fitopatógenos del suelo, así Calvo *et al.* (2010) reportaron el aislamiento de cepas relacionados al grupo de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amiloquefaciens* a partir de la rizósfera de la papa de zonas andinas del Perú capaces de reducir el crecimiento de *R. solani* con porcentajes de inhibición mayores al 50 por ciento.

Dentro del grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, se han encontrado cepas pertenecientes a la especie *Pseudomonas chlororaphis* en asociación con una amplia gama de plantas, tanto mono como dicotiledóneas, tanto silvestres como cultivadas (Biessy *et al.* 2019). Varias cepas de *P. chlororaphis* han mostrado potencial para su aplicación como probióticos de plantas (Biessy *et al.* 2019; Arrebola *et al.* 2019) debido a su capacidad de colonización de la rizosfera, de solubilización de fosfatos (Ahemad 2015), producción de IAA (Kang *et al.* 2006) y biocontrol. Bertani *et al.* (2021) reportaron la capacidad in vitro de la especie *P. chlororaphis* ST9 de inhibir el crecimiento de varios hongos fitopatógenos que incluyen *Dickeya zeae*, *Pseudomonas fuscovaginae*, *Magnaporthe oryzae*, *Aspergillus nidulans* and *Fusarium graminearum*.



0.05

Figura 6: Árbol filogenético de Neighbor Joining basado en el gen ARNr 16S de las cepas antagonistas. Las cepas usadas en este estudio están indicadas en negrita. Los números de accesoión de cada cepa están en paréntesis. Solo se muestran los valores bootstrap mayores a 60 por ciento (1.000 réplicas)

Por otro lado, *A. faecalis* una bacteria gramnegativa, está presente comúnmente en el suelo y en el agua. Esta bacteria ha sido ampliamente utilizada para la promoción del crecimiento vegetal (Sayyed y Chincholkar 2010; Sayyed *et al.* 2010) y actividad de biocontrol (Shan *et al.* 2019). Yokoyama *et al.* (2013) reportaron que la cepa *A. faecalis* AD15 produjo una gran cantidad de hidroxilamina (33,3 mg/l) y fue capaz de inhibir en gran medida el crecimiento de *Pantoea agglomerans* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Así también, Kakar *et al.* (2018) reportaron que las cepas de *A. faecalis* Bk1 y P1 suprimieron en gran medida la incidencia de enfermedades del tizón de la vaina en más del 70 por ciento.

Las especies de *Serratia* son bacterias Gram-negativas con una distribución ubicua. Producen un numero interesante de compuestos no volátiles (por ejemplo, prodigiosina y pirrolnitrina), que inhiben el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Verticillium dahliae* (Kalbe *et al.* 1996). El potencial antagónico se debe a la liberación de quitinasas, mientras que la producción de la hormona ácido indol-3-acético (IAA) promueve el crecimiento de las plantas (Frankowski *et al.* 2001). *S. odorífera* emite una cantidad sustancial de compuestos volátiles, que inhiben el crecimiento de muchos hongos durante el cocultivo (Kai *et al.* 2007; Vespemann *et al.* 2007).

4.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DEL GÉNERO *Rhizobium*

En cuanto al árbol filogenético Neighbor-Joining de la cepa MFC-2a mostró que el aislamiento estuvo relacionado a *Rhizobium aethiopicum* con 99.15 por ciento de identidad (Figura 7).

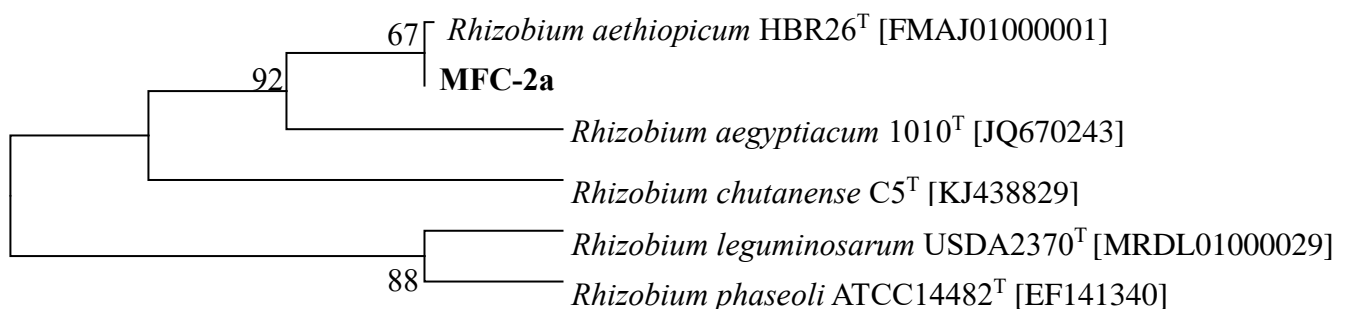


Figura 7: Árbol filogenético de Neighbor Joining basado en el gen ARNr 16S de la cepa MFC-2a aislada a partir de nódulos. La cepa usada en este estudio está indicada en negrita

Los rizobios son bacterias Gram negativas en su mayoría pertenecientes a las alfa-Proteobacterias y concretamente a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Ensifer* (antes *Sinorhizobium*) (Gyaneshwar *et al.* 2011; Rogel *et al.* 2011).

Las bacterias pertenecientes al género *Rhizobium* se caracterizan por su capacidad de interactuar con las raíces de plantas leguminosas en una asociación simbiótica, donde la bacteria fija nitrógeno atmosférico que dona a la planta en forma de nitrógeno orgánico, a cambio de poder establecerse en un nicho protegido y recibir fuentes de carbono (Romero y Brom 2004).

Youseif *et al.* (2021) reportaron el aislamiento de rizobios aislados de nódulos de trébol (*Trifolium alexandrinum*) los cuales estuvieron en su mayoría cercanamente relacionados a *Rhizobium aethiopicum*, de los cuales, las cepas NGB-CR 129 y 136 fueron capaces de formar nódulos efectivos en *P. vulgaris* en condiciones de invernadero.

4.7. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y FISIOLÓGICA DE LAS CEPAS BACTERIANAS ANTAGONISTAS

Las cepas antagonistas seleccionadas fueron capaces de crecer en las diferentes fuentes de carbono evaluadas. Todas ellas crecieron en dextrosa seguidos de manitol (65 por ciento), galactosa (69 por ciento), glicerol (60 por ciento), lactosa (48 por ciento) y fructosa (46 por ciento). Ninguna de las cepas creció en arabinosa.

Las pruebas bioquímicas mostraron que todas las cepas Gram positivas representadas con los códigos IcBac, TrBac y HuBac fueron indol negativas, así también, la mayoría de las cepas fueron oxidasa y catalasa positiva. Sin embargo, Voges Proskauer mostró resultados variables. Las cepas Gram negativas (códigos IcPs, TvPs, LPs) fueron indol negativas, catalasa y oxidasa positivas. Sin embargo, la mayoría fueron Voges Proskauer negativas.

Las cepas bacterianas mostraron diferentes propiedades fisiológicas con una máxima capacidad de tolerancia del diez por ciento de NaCl por dos cepas IcBac2.1 e IcBac2.9, mientras que la mayoría de las cepas solo crecieron hasta el cinco por ciento de NaCl. La sal

influye significativamente en el crecimiento bacteriano debido a su efecto sobre la presión osmótica del medio.

En el caso del crecimiento en diferentes valores de pH, el 100 por ciento de las cepas crecieron entre 5 y 9 de pH, el 88 por ciento de las cepas proliferaron a pH 11 (alcalófilos), mientras que solo el 19 por ciento de las cepas crecieron a pH 3 (acidófilos) (Cuadro 12).

Cuadro 12: Perfil metabólico de las cepas antagonistas seleccionadas

	Cepas																										
	IcBac1.4	IcBac2.1	IcBac2.9	IcBac2.12	IcBac2.16	IcBac2.21	IcBac2.23	IcBac3.3	IcPs1.18	IcPs2.26	IcPs2.5	TvPs1.2	TvPs1.5	TvPs1.6	TvPs1.7	TvPs1.8	TvPs1.12	TvPs2.4	TvP3.6	TvPs3.7	TvPs3.8	TrBac1.17	TrBac2.32	TrBac2.40	LPs2.15	HuBac1.13	
Crecimiento en:																											
Arabinosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Almidón	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Dextrosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Fructuosa	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Galactosa	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalasa	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
Oxidasa	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-
Tolerancia cloruro de sodio (%):																											
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
10	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
pH:																											
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-

La población microbiana en el suelo está determinada por varios factores, como la profundidad del suelo, la materia orgánica, la porosidad, la concentración de oxígeno y dióxido de carbono, el pH del suelo, el agua junto con la planta huésped (Bhattarai *et al.* 2015). El género *Bacillus* altamente presente en la rizósfera de diversos cultivos incluye

bacterias en forma de bastón grampositivas aeróbicas o anaeróbicas facultativas formadoras de endosporas el cual se caracteriza por ser un taxón fenotípica y filogenéticamente diverso (Holt and Kreig 2012).

La caracterización fisiológica de los 12 aislamientos de *Bacillus* spp. provenientes de la rizósfera de frijol de diferentes ecosistemas de la costa peruana como el desierto costero y el bosque estacionalmente seco de colina y montaña demostró que el 100 por ciento de las cepas crecieron en pH 5 y pH 9 lo que indica una buena adaptación a pH ácidos y alcalinos. *Bacillus* es un género muy asociado a pH neutros, su capacidad de adaptación aumenta conforme el pH se acerca al óptimo, sin embargo, esta capacidad de adaptación a pH bajo ya ha sido reportada por Calvo *et al.* (2010), los cuales reportaron que el 100 por ciento de las cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizósfera de papa de dos zonas altoandinas en el Perú crecieron bien a pH ácidos de 4 y 5.5.

El crecimiento de las cepas IcBac2.1 e IcBac2.9 en medio con diez por ciento de NaCl indica que estas cepas fueron capaces de tolerar altas concentraciones de sal. Satapute *et al.* (2012) reportaron que la cepa *Bacillus subtilis* AS-4 fue capaz de crecer en diez por ciento y 15 por ciento de NaCl.

La capacidad de crecer utilizando diferentes fuentes de carbono, niveles de pH y concentraciones de sal hace de este género metabólicamente muy diverso lo que le permite tener una colonización exitosa en el ambiente rizosférico.

En cuanto a la prueba de indol y Voges Proskauer se muestran una reacción variable a la prueba, la variabilidad en el resultado ya ha sido reportado por Calvo y Zúñiga (2010) por esta razón no se puede afirmar o descartar que las cepas en estudio pertenezcan al grupo de *B. subtilis*. Así también, muchas especies del género *Bacillus* se caracterizan por ser catalasa positiva, oxidasa positivo o negativo.

En el caso de bacterias Gram negativas no fermentativas representado por el género *Pseudomonas*, se han realizado estudios sobre poblaciones microbianas los cuales mencionan una alta presencia de este microorganismo en la rizósfera de diversos cultivos (Smit *et al.* 2001). El estudio de su taxonomía se ha basado en la capacidad de los aislados para utilizar una variedad de compuestos de carbono como únicas fuentes de carbono y energía (Palleroni 1984). Todas las cepas Gram negativas aisladas en el presente estudio se

caracterizaron por crecer bien utilizando azúcares monosacáridos como dextrosa, mientras que no crecieron en presencia de azúcares de alto peso molecular como almidón.

La caracterización fisiológica de los 14 aislamientos de bacterias Gram negativas provenientes de la rizósfera de frijol de diferentes ecosistemas demostró que el 100 por ciento de las cepas crecieron en pH 5 y pH 9 lo que indica su capacidad de crecer bien en suelos rizosféricos con diferentes pH. En cuanto a la prueba Voges Proskauer se muestran una reacción variable a la prueba, mientras que todas las cepas en estudio fueron indol negativo, además catalasa y oxidasa positiva, mientras que indol negativas.

4.8. CARACTERIZACIÓN DE LA CAPACIDAD PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL DE BACTERIAS DE LA RIZÓSFERA CON CAPACIDAD ANTIFÚNGICA

Todas las cepas antagonistas seleccionadas produjeron AIA en diferentes valores (Cuadro 8). Cuatro de las cepas positivas (15 por ciento) produjeron niveles tan altos (36.9 a 58.5 mm) como la cepa control (*Rhizobium* E10), mientras que las restantes (22 cepas) mostraron menor producción. Se observó el proceso de solubilización de fosfatos mientras crecían los halos de solubilización durante 15 días. Siete de las cepas antagonistas seleccionadas (27 por ciento) fueron capaces de solubilizar fosfato bicálcico con valores tan altos como la cepa control (*Pseudomonas* LMTK32) con tamaños del halo que variaron entre 10 y 14 mm. Seis cepas (23 por ciento) solubilizaron fosfato tricálcico con rangos de 1 a 4 mm. Trece cepas no fueron capaces de solubilizar ninguno de los fosfatos evaluados (Cuadro 13).

Las raíces de las plantas secretan el aminoácido triptófano en la rizósfera que es utilizado por las rizobacterias como precursor de la biosíntesis de AIA (Shameer y Prasad 2018). El AIA bacteriano tiene efecto fitoestimulador y mejora el crecimiento de las plantas al mejorar el desarrollo de las raíces y aumentar la relación entre el área de superficie y el volumen de las raíces y, en consecuencia, resulta en una mejor absorción de agua y nutrientes (Ahmed and Hasnain 2010).

Se ha reportado la capacidad de diferentes especies de *Bacillus* de producir auxinas. En este estudio, todas las cepas de *Bacillus* fueron capaces de producir AIA en presencia del precursor, siendo la máxima producción obtenida por las cepas IcBac2.9 (36.9 µg/mL), IcBac2.16 (25.5 µg/mL), IcBac3.3 (47.1 µg/mL), TrBac2.32 (32.6 µg/mL) y HuBac1.13

(25.5 µg/mL). Así también, Wagi y Ahmed (2019) reportaron la capacidad de la bacteria *Bacillus subtilis* Mt3b en producir AIA (36.6 µg/mL) en presencia del precursor.

Los microorganismos del suelo pueden desempeñar un papel directo en la adquisición de nutrientes para las plantas, especialmente para aquellos nutrientes como el fósforo que son inherentemente menos disponibles en los suelos (Jones and Oburger 2011). Las bacterias solubilizadoras de fosfato di y tricálcico mejoran la disponibilidad de fosfato para las plantas, ya que, en suelos ácidos y básicos, el fosfato disponible se reduce debido a la fuerte unión con el calcio y el magnesio, pero los aislados bacterianos secretan fosfatasas que rompen este enlace y ayudan a mejorar la disponibilidad de fosfato para las plantas (Parhamfar *et al.* 2016; Solanki *et al.* 2018). Así también, las bacterias rizosféricas pueden secretar ciertos ácidos que ayudan a mantener el pH del suelo y convierten el fosfato en formas que son disponibles para las raíces de las plantas (Ahmad *et al.* 2018).

Se han reportado diferentes géneros de bacterias capaces de solubilizar fósforo tales como *Pseudomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Rhizobium spp.*, *Burkholderia spp.*, *Achromobacter spp.*, *Agrobacterium spp.*, *Micrococcus spp.*, *Aerobacter spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Mesorhizobium spp.*, *Azotobacter spp.*, *Azospirillum spp.*, *Erwinia spp.* y *Serratia spp.* (Stella y Halimi 2015).

Según el estudio realizado por Ahmad *et al.* (2018) *B. subtilis* ha demostrado la máxima capacidad para la solubilización de fosfatos. Así también, en el presente estudio todas las cepas de *Bacillus* fueron capaces de solubilizar fosfatos en comparación a la mayoría de bacterias Gram negativas que no mostraron capacidad de solubilizar fosfato bicálcico ni tricálcico. Las cepas de *Bacillus* mostraron un mayor halo de solubilización del fosfato bicálcico en comparación con el fosfato tricálcico. Solo las cepas IcBac2.12, IcBac2.16, IcBac2.21, IcBac2.23 y TrBac2.40 fueron capaces de solubilizar fosfatos tricálcicos con halos que variaron de 1 mm a 4 mm. La cepa TrBac2.40 presentó los mayores halos de solubilización del fosfato bicálcico (13.5 mm) y del fosfato tricálcico (4 mm).

Blanco-Vargas *et al.* (2020) reportaron la capacidad de *Pseudomonas sp.* y *Serratia sp.* de solubilizar fosfatos obteniendo 2.1 mm y 2.0 mm de halos de solubilización respectivamente. Así también, en el presente estudio las cepas Gram negativas IcPs1.18, IcPs2.26, IcPs2.5, TvPs1.6 y TvPs1.12 mostraron capacidad de solubilizar fosfato bicálcico con halos de solubilización que variaron de 1.5 mm a 4 mm. La cepa LPs2.15 mostró además la capacidad de solubilizar fosfato tricálcico con 4 mm de halo de solubilización.

Cuadro 13: Caracterización de la capacidad promotora del crecimiento vegetal de las bacterias antagonistas seleccionadas

Cepas	Halo de solubilización (mm)		AIA ^a (µg/mL)
	Fosfato Bicalcico	Fosfato Tricalcico	
IcBac1.4	0	0	1.6±0.01
IcBac2.1	0	0	8.7±0.00
IcBac2.9	7 ±0.5	0	36.9±0.03
IcBac2.12	0	3.0±0.2	4.0±0.01
IcBac2.16	10 ±0.6	1.0±0.08	25.5±0.02
IcBac2.21	11 ±0.7	1.0±0.07	3.6±0.02
IcBac2.23	12 ±0.8	1.0±0.05	19.5±0.01
IcBac3.3	14±0.9	0	47.1±0.07
IcPs1.18	12±0.0	0	0.8±0.01
IcPs2.26	12±0.0	0	6.8±0.01
IcPs2.5	4±0.0	0	0.7±0.01
TvPs1.2	0	0	23.7±0.02
TvPs1.5	0	0	25.2±0.02
TvPs1.6	1.5±0.0	0	26.9±0.03
TvPs1.7	0	0	45.3±0.01
TvPs1.8	0	0	25.8±0.00
TvPs1.12	3.0±0.00	0	25.2±0.00
TvPs2.4	0	0	11.9±0.00
TvPs3.6	0	0	9.5±0.00
TvPs3.7	0	0	12.6±0.04
LbPs3.8	0	0	23.1±0.01
TrjBac1.17	0	0	14.0±0.03
TrBac2.32	0	0	32.6±0.02
TrBac2.40	13.5±0.9	4.0±0.05	12.9±0.02
LPs2.15	11	2.5±0.00	58.5±0.03
HuBac1.13	0	0	25.5±0.02
E10 ^b	0	5.4±0.04	64.7±0.02
LMTK32 ^c	15±0.5	7±0.5	

^aAIA: 3-Ácido acético indol, ^bCepa Control E10 (*Rhizobium* sp) utilizada para la producción de AIA, ^c Cepa Control LMTK32 (*Pseudomonas* sp) utilizada para la prueba de solubilización de fosfatos. Cada valor representa el promedio ± DS (n= 2)

4.9. CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE RIZOBACTERIAS MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES Y NO VOLÁTILES

Rizobacterias aisladas de plantas de frijol cultivadas en desiertos costeros y Bosque estacionalmente seco de llanura fueron capaces producir una diversidad de compuestos

orgánicos volátiles y no volátiles para controlar el crecimiento de *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum* y *R. solani*.

4.9.1. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE RIZOBACTERIAS MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS VOLÁTILES (VOCs)

La mayoría de las cepas inhibieron el crecimiento del micelio fúngico a través de la producción de compuestos orgánicos volátiles (Cuadro 4).

Los compuestos volátiles redujeron significativamente el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* (60 - 97 por ciento), *R. solani* (21 - 74 por ciento) y *F. oxysporum* (11 - 47 por ciento). Las cepas *Pseudomonas* TvPs1.6 y *Alcaligenes* TvPs2.4 mostraron la mayor actividad antifúngica contra *R. solani*, *S. sclerotiorum* y *F. oxysporum* por la producción de VOCs. *R. solani* y *S. sclerotiorum* presentaron únicamente inhibición del crecimiento del micelio. *S. sclerotiorum* tampoco pudo producir esclerocios. Además, los compuestos orgánicos volátiles producidos por *Pseudomonas* TvPs1.6 y *Alcaligenes* TvPs2.4 exhibieron actividad bactericida al inhibir el crecimiento de hongos después de varios días de retirar la tapa de la placa donde crecían las bacterias.

Alcaligenes sp TvPs2.4 y *Pseudomonas* sp TvPs1.6 mostraron la inhibición más alta que va del 29 al 97 por ciento contra la mayoría de los fitopatógenos probados en comparación con otras cepas. Además, los compuestos orgánicos volátiles producidos por ambas cepas exhibieron actividad fungistática al inhibir el crecimiento fúngico incluso después de varios días de retirar la tapa de la placa donde crecían las bacterias (datos no mostrados).

El micelio de *F. oxysporum* se volvió transparente y no presentó pigmentación. En el caso de *R. solani* y *S. sclerotiorum* presentaron inhibición del crecimiento micelial, además *S. sclerotiorum* no presentó formación de esclerocios (Figura 8).

Diferentes estudios han evidenciado que *Bacillus* y sus VOCs pueden controlar el desarrollo de enfermedades en las plantas (Algam *et al.* 2004). En esta investigación, informamos que los compuestos volátiles producidos por las cepas de *Bacillus* redujeron el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* (14 - 91 por ciento), *R. solani* (14 - 53 por ciento) y *F. oxysporum* (8 - 25 por ciento). Además, *F. oxysporum* presentó cambio morfológico del micelio a translúcido y sin pigmento.

Los VOCs son producidos por diferentes bacterias del suelo y pueden afectar el crecimiento de hongos fitopatógenos (Alström 2001, Wheatley 2002). Los VOCs son generalmente sustancias lipofílicas de menos de 20 carbonos caracterizados por su bajo peso molecular (100 – 500 Da), alta presión de vapor y bajo punto de ebullición que atraviesan libremente las membranas biológicas y se liberan a la atmósfera o al suelo desde donde se encuentran los microorganismos productores (Tilocca *et al.* 2020).

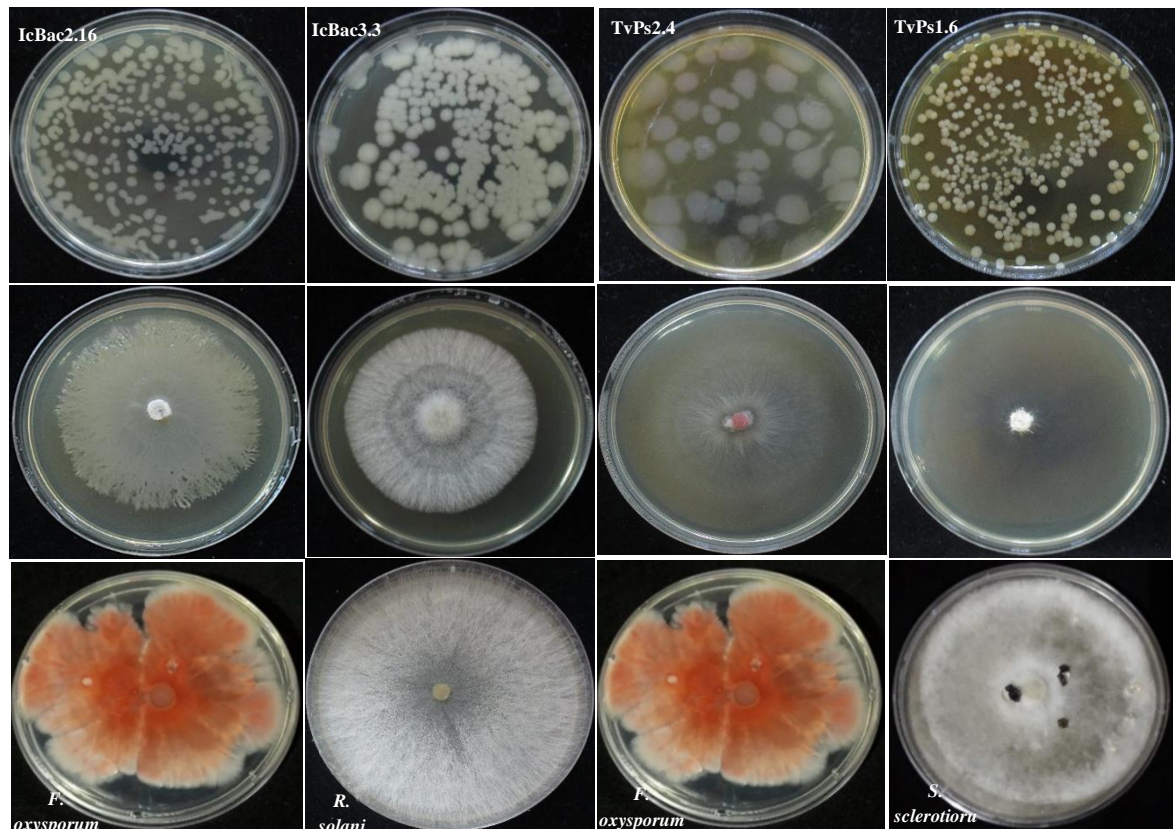


Figura 8: Actividad antifúngica de los VOCs producidos por *Bacillus* IcBac2.16, *Bacillus* IcBac3.3, *Alcaligenes* TvPs2.4 y *Pseudomonas* TvPs1.6 contra hongos fitopatógenos por el método de sellado en placa. La fila superior muestra las colonias bacterianas crecidas en Agar TSA. La fila del centro muestra pérdida de pigmentación en el micelio de *F. oxysporum*, inhibición del crecimiento micelial en *R. solani* e inhibición del crecimiento micelial y formación de esclerotes en *S. sclerotiorum* en presencia de la bacteria. La tercera fila corresponde a los controles de *S. sclerotiorum*, *R. solani* and *F. oxysporum* crecidos en Agar Papa Dextrosa

Su difusión y producción por microorganismos del suelo dependen en gran medida de varios factores como la disponibilidad de nutrientes y oxígeno, temperatura, pH, estado fisiológico

de los microorganismos y humedad, textura y arquitectura del suelo (Insam y Seewald 2010; Effmert *et al.* 2012).

La síntesis de la mayoría de los VOCs deriva de la oxidación de la glucosa que involucra la glucólisis y los ciclos subsecuentes, como el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) (Korpi *et al.* 2009, Schmidt *et al.* 2015). Sin embargo, su producción también puede resultar de otras vías, como el metabolismo heterotrófico aeróbico del carbono, las fermentaciones, degradación de aminoácidos, síntesis de terpenos o la reducción de azufre.

4.9.2. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE RIZOBACTERIAS MEDIANTE LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS NO VOLÁTILES

Algunas cepas de rizobacterias produjeron compuestos no volátiles con la capacidad de suprimir el crecimiento micelial que se demostró a través del ensayo de difusión en pozos PDA de lipopéptidos crudos, actividad enzimática y pruebas de sideróforos. Las cepas produjeron proteasas (69 por ciento), celulasas (17 por ciento) y quitinasas (6 por ciento), sin embargo, no se detectó producción de lipasa. La mayoría de las cepas (56 por ciento) produjeron sideróforos que oscilaron entre 0,9 y 7,5 mm de tamaño (Cuadro 14).

Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar la capacidad de las bacterias para inhibir el crecimiento micelial de patógenos fúngicos, entre ellos la producción de metabolitos antimicrobianos, competencia por nutrientes y/o espacio, parasitismo, antibiosis, inducción de resistencia en el hospedante, producción de compuestos orgánicos volátiles y formación de biofilms (Zhang *et al.* 2020). Los ejemplos de metabolitos antimicrobianos incluyen sideróforos quelantes de hierro, antibióticos, biocidas volátiles y enzimas líticas. La gran variedad de compuestos antimicrobianos producidos por las bacterias aisladas en este estudio podría explicar el amplio rango de inhibición del crecimiento micelial observado.

El género *Bacillus*, un grupo heterogéneo de bacterias formadoras de esporas, es uno de los géneros más utilizados para el control de fitopatógenos (Fritze 2004). Este género se caracteriza por una alta diversidad genética y es una de las principales fuentes de bioplaguicidas microbianos. Las cepas de *Bacillus* aisladas en este estudio mostraron un amplio perfil metabólico involucrado en la inhibición del crecimiento micelial debido a la producción de compuestos antifúngicos difusibles en agar.

Solo las cepas de *Bacillus* IcBac2.1, IcBac2.16 y TruBac1.17 y la cepa *Achromobacter* IcPs1.18 presentaron actividad antagonista frente al hongo ensayado por lipopéptido crudo aislado de sobrenadantes libres de células (Cuadro 15). La cepa *Bacillus* IcBac2.1 mostró un mayor control contra la mayoría de los fitopatógenos probados por la producción de lipopéptidos antifúngicos en comparación con otras cepas.

Los metabolitos involucrados en la actividad antagónica fueron identificados como enzimas hidrolíticas, sideróforos y lipopéptidos antibióticos. El sobrenadante libre de células contenía enzimas hidrolíticas como proteasas, celulasas y quitinasas, que se utilizan para descomponer los componentes de la pared celular de las células fúngicas. Las cepas IcBac2.1 y TruBac1.17 relacionadas con el grupo *B. halotolerans* y la cepa IcBac2.16 relacionada y el grupo *B. subtilis* controlaron el crecimiento del micelio a través de lipopéptidos antibióticos.

Los microorganismos producen sideróforos que ayudan a secuestrar el hierro del suelo y del metabolismo microbiano de manera eficiente. El hierro es el metal más abundante en la corteza terrestre, pero no está fácilmente disponible para los organismos vivos porque no está presente en formas solubles, por lo que los sideróforos ayudan en la adquisición de hierro (Rizzi *et al.* 2019).

Cuadro 14: Producción de compuestos antifúngicos por las cepas seleccionadas

Cepas	Actividad antifúngica por:						Enzymatic activity Prueba de sideróforos (mm)	Actividad enzimática			
	Metabolitos no volátiles			Metabolitos volátiles				Proteasas	Celulasas	Lipasas	Quitinasas
	<i>R. solani</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. oxysporum</i>					
IcBac1.4	79±0.01	70±0.01	68±0.03	0	0	0	0	+	-	-	-
IcBac2.1	85±0.01	71±0.01	69±0.02	0	0	0	2.0±0.01	+	+	-	-
IcBac2.9	86±0.01	70±0.01	0	14±5.65	39±5.66	13±3.53	1.8±0.03	+	-	-	-
IcBac2.12	91±0.02	72±0.01	74±0.01	0	0	0	0	+	+	-	+
IcBac2.16	85±0.01	70±0.02	76±0.02	48±5.25	0	25±6.58	2.0±0.01	+	-	-	-
IcBac2.21	77±0.01	62±0.01	71±0.02	0	91±3.53	17±2.12	0	+	-	-	-
IcBac2.23	85±0.03	63±0.01	66±0.01	16±3.53	59±1.41	8±7.07	0	+	-	-	-
IcBac3.3	83±0.01	0	71±0.01	36±3.54	67±2.12	16±3.54	4.5±0.02	+	-	-	-
IcPs1.18	83±0.01	53±0.02	94±0.02	0	0	0	2.2±0.02	-	-	-	-
IcPs2.26	82±0.02	48±0.01	82±0.01	0	0	0	4.5±0.01	+	-	-	-
IcPs2.5	82±0.03	44±0.01	83±0.01	0	84±1.41	17±4.95	0	-	-	-	-
TvPs1.2	68±0.02	85±0.02	70±0.02	36±3.54	83±3.54	11±3.54	0	+	-	-	-
TvPs1.5	76±0.02	86±0.02	73±0.02	40	75	35±7.07	1.7±0.01	+	-	-	-
TvPs1.6	70±0.01	85±0.02	71±0.02	54±5.66	91±3.54	31±3.54	2.2±0.01	+	-	-	-
TvPs1.7	67±0.01	78±0.02	75±0.03	0	85	47±4.95	0	+	-	-	-
TvPs1.8	63±0.01	76±0.01	71±0.03	0	86±4.24	19±1.41	0	+	+	-	-
TvPs1.12	64±0.01	78±0.02	69±0.01	74±5.66	81±3.54	16±3.54	0	+	-	-	-
TvPs2.4	60±0.01	59±0.03	0	47±2.12	97±2.12	29±1.41	1.6±0.02	+	-	-	-
TvPs3.6	0	0	59±0.03	46±7.07	60±3.54	20±2.12	1.4±0.02	-	-	-	-
TvPs3.7	0	0	53±0.02	23±1.41	76±3.54	44±0.70	2.0±0.01	-	-	-	-
LbPs3.8	0	0	61±0.03	21±8.48	68±3.54	13±0.01	1.7±0.01	-	-	-	-
TrjBac1.17	79±0.03	0	68±0.02	11±3.54	18±3.54	17±3.54	0	+	-	-	+
TrBac2.32	61±0.01	65±0.01	58±0.01	22±7.07	14±2.12	0	0	+	+	-	-
TrBac2.40	54±0.01	62±0.01	0	35±2.12	25±2.12	0	0	+	+	-	-
LPS2.15	62±0.02	65±0.02	64±0.04	53±3.53	61±9.89	18±0.01	0	-	-	-	-
HuBac1.13	52±0.01	68±0.02	62±0.03	41±1.41	47±2.12	5±0.01	0	+	+	-	-

Cuadro 15: Actividad antagonista del crudo de lipopéptidos aislados del sobrenadante libre de células contra los hongos evaluados

Cepas	% Inhibición del crecimiento fúngico		
	<i>R. solani</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. oxysporum</i>
IcBac2.1	66±0.03	80±0.02	71±0.10
IcBac2.16	65±0.02	79±0.02	70±0.07
TruBac1.17	61±0.03	64±0.07	65±0.14
IcPs1.18	63±0.01	76±0.99	72±0.25

Cada valor representa el promedio ± DE (n = 2)

4.10. DETERMINACIÓN DEL TIEMPO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS NO VOLÁTILES CON MAYOR ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Las condiciones de cultivo son críticas para la producción de metabolitos secundarios antifúngicos por bacterias antagónicas. La manipulación de estas condiciones puede aumentar la biosíntesis de metabolitos secundarios. El efecto del período de incubación sobre la actividad antifúngica de *Bacillus IcBac2.1* se registró durante un período de 144 horas. La actividad del aislado se observó a partir del segundo día de incubación y alcanzó el máximo porcentaje de inhibición a las 72 horas correspondientes a la fase estacionaria de crecimiento (Figura 9).

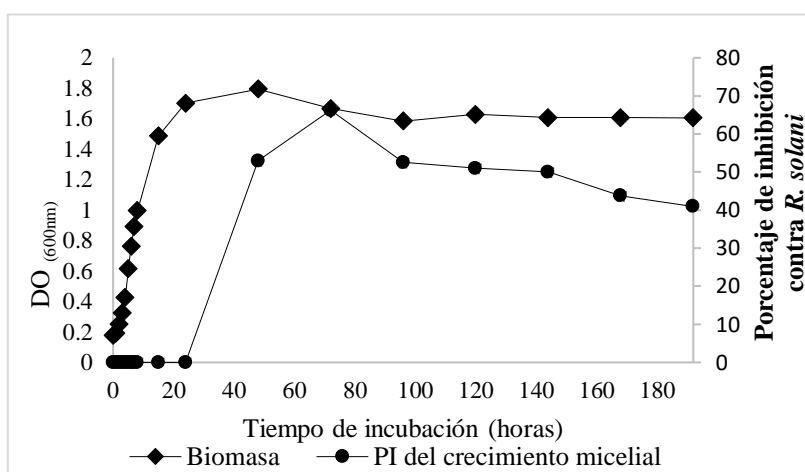


Figura 9: Efecto del periodo de incubación sobre el porcentaje de inhibición frente a *R. solani* por *Bacillus IcBac2.1*. PI: Porcentaje de inhibición. Cada valor representa la media \pm SE (n= 2)

4.11. OPTIMIZACIÓN DE LOS COMPONENTES DEL CULTIVO PARA LA MAYOR PRODUCCIÓN DE METABOLITOS NO VOLÁTILES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA A NIVEL DE MATRAZ

4.11.1. Optimización de las fuentes de carbono y nitrógeno

Se probaron diferentes fuentes de carbono y nitrógeno para incrementar la producción de compuestos antifúngicos por parte de *Bacillus IcBac2*. Se evaluó la producción de biomasa, de compuestos antifúngicos midiendo el tamaño de las zonas de inhibición y peso seco del extracto crudo de metabolitos antifúngicos.

Entre las fuentes de carbono (Figura 10A), los resultados mostraron que al suplementar el medio mínimo mineral con 20 gL⁻¹ de almidón (44.41 por ciento de carbono) se obtuvo una mayor producción de metabolitos extracelulares antifúngicos (0,67 gL⁻¹ o 666 mgL⁻¹ de peso seco del extracto crudo de metabolitos antifúngicos con 24,8 mm de halo de inhibición), así como, una máxima producción de biomasa (2.45 gL⁻¹).

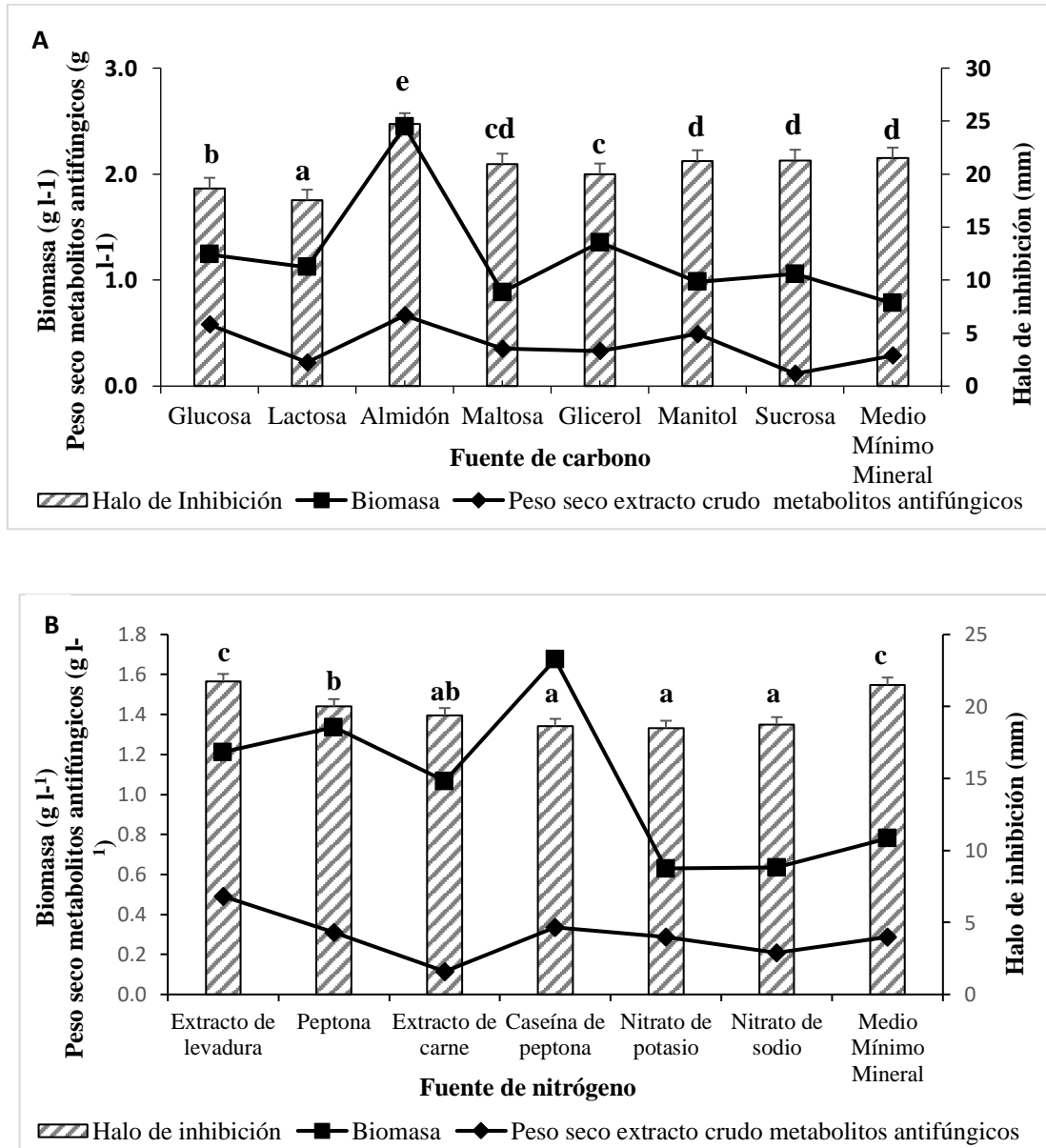


Figura 10: Efecto de las fuentes de carbono (A) y nitrógeno (B) sobre el crecimiento y la producción de compuestos antifúngicos por *Bacillus IcBac2*. Las barras representan los valores medios \pm SE. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas ($p \leq 0.05$) en la prueba de rangos múltiples de Duncan para el ensayo de halos de inhibición

Entre las fuentes de nitrógeno (Figura 10B), 8 gL^{-1} de extracto de levadura (10.5 por ciento de nitrógeno) permitió una mayor producción de metabolitos extracelulares ($0,49 \text{ gL}^{-1}$ o 491 mgL^{-1} de peso seco de metabolitos antifúngicos con 21,8 mm de zona de inhibición) y biomasa (1.21 gL^{-1}). Los resultados mostraron que el almidón y extracto de levadura fueron componentes esenciales en la producción de metabolitos antifúngicos y biomasa.

A pesar de presentar buen crecimiento utilizando otras fuentes de carbono, *Bacillus* IcBac2.1 no mostró la misma producción de metabolitos con actividad antifúngica frente a *R. solani*. Así, *Bacillus* IcBac2.1 mostró buen crecimiento utilizando sucrosa (1.06 gL^{-1}), sin embargo, presentó valores bajos en el halo de inhibición (21.3 mm) y peso seco de metabolitos antifúngicos (0.12 gL^{-1}).

La evaluación del efecto de diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y elementos traza en la producción de biomasa y metabolitos extracelulares con actividad antagonista de *Bacillus* IcBac2.1 contra los hongos fitopatógenos *R. solani*, *S. sclerotiorum* y *F. oxysporum* determinó diferencias estadísticamente significativas entre sí, indicando que la inhibición del crecimiento micelial se debió a un incremento en la producción de compuestos bioactivos extracelulares producidos continuamente durante el cultivo de la bacteria, observándose este comportamiento en los tratamientos que permitieron una mayor producción de biomasa hasta las 72 horas de incubación.

El almidón y extracto de levadura fueron las fuentes de carbono y nitrógeno más efectivas para la producción de compuestos antifúngicos, así como biomasa celular de *Bacillus* IcBac2.1. Muchos sustratos son utilizados como fuentes de carbono y nitrógeno para producir compuestos antifúngicos, así como, células y esporas de *Bacillus*, como la producción de la cepa *B. amyloliquefaciens* CPA-8 utilizando nutrientes de bajo costo como melaza de caña de azúcar como fuente de carbono y harina de soya como fuente de nitrógeno (Yáñez-Mendizábal *et al.* 2012). Por otro lado, Dang *et al.* (2019) aumentaron el rendimiento de lipopéptidos utilizando inulina como fuente de C y L- glutamato de sodio y MgSO_4 como fuente de nitrógeno.

Así también, Abushady *et al.* (2005) reportaron la producción de 720 mgL^{-1} de lipopéptidos por la cepa *B. subtilis* SPB1 suplementado con urea después de 48 horas de incubación. La producción de estos lipopéptidos aumentó a 750 mgL^{-1} cuando la concentración de urea fue $5,0 \text{ gL}^{-1}$ y el medio contenía glucosa (40 gL^{-1}) como fuente de carbono.

Entre diferentes fuentes de nitrógeno y carbono, Meena *et al.* (2018) reportaron el extracto de carne (uno por ciento p/v) como la mejor fuente de nitrógeno para la producción de lipopéptidos extracelulares (1864 mgL^{-1}); mientras que, en el caso de las fuentes de carbono, los resultados mostraron que el sorbitol (uno por ciento) fue el mejor carbohidrato para la producción de lipopéptidos extracelulares por *Bacillus velezensis* KLP2016 (1900 mgL^{-1}).

A pesar de la capacidad de crecer bien utilizando otras fuentes de carbono, el aislado IcBac2.1 no mostró la misma producción de metabolitos con actividad antifúngica frente a *R. solani* en todos ellos. Por ejemplo, IcBac2.1 mostró buen crecimiento utilizando sacarosa (0.0504 gL^{-1}), sin embargo, presentó valores bajos en el halo de inhibición (21.1 mm) y peso seco de metabolitos antifúngicos (0.117 gL^{-1}).

Cuando se probaron diferentes fuentes de nitrógeno, el extracto de levadura fue la mejor fuente de crecimiento ($0,0746 \text{ gL}^{-1}$) con máxima producción de metabolitos antifúngicos (21,8 mm de zona de inhibición y $0,471 \text{ gL}^{-1}$ de peso seco de metabolitos antifúngicos) (Figura 5) con diferencias significativas en comparación con las otras fuentes de nitrógeno. El medio control solo mostró un halo de inhibición de 18 mm y un rendimiento de metabolito antifúngico crudo de 0.288 g L^{-1} . Dados estos resultados, se optimizó un medio de producción utilizando almidón (20 gL^{-1}) y extracto de levadura (5 gL^{-1}).

4.11.2. Optimización de los elementos trazas

La producción de metabolitos antifúngicos varió de 1.042 gL^{-1} a 3.519 gL^{-1} entre las 14 corridas en el diseño Plackett – burman (Cuadro 16). El análisis de varianza de la producción de metabolitos antifúngicos del diseño Plackett – Burman mostró efecto significativo en las siete variables estudiadas $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, H_3PO_4 , CaSO_4 y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ con un p-value menor de 0.05 (Cuadro 17). En el análisis del efecto y coeficiente, de los siete elementos traza solo tres H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mostraron efecto positivo con un coeficiente mayor a 0.99 en la producción de metabolitos antifúngicos. Los otros elementos trazas $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, H_3PO_4 , CaSO_4 y $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ mostraron efecto negativo, por lo cual un incremento en su concentración podría reducir la producción de metabolitos antifúngicos (Cuadro 18).

Entre los elementos traza evaluados, el H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mostraron un efecto estadísticamente significativo y positivo en la producción de metabolitos antifúngicos. Los elementos traza evaluados mostraron ser fuertes inductores positivos en la

producción de metabolitos extracelulares antifúngicos durante la fase estacionaria del crecimiento de la bacteria.

Los minerales traza especialmente los iones Fe^{2+} , Mn^{2+} y Mg^{2+} son importantes elementos debido a que incrementan la producción de metabolitos antifúngicos y el crecimiento celular (Cooper *et al.* 1981). Los resultados, cuando se compararon con trabajos realizados por otros autores, muestran que la cepa IcBac2.1 requiere diferentes fuentes de nutrientes para producir metabolitos antifúngicos y biomasa celular. A pesar de que *B. halotolerans* requirió diferentes fuentes de nutrientes, el extracto crudo y las fracciones semipurificadas de lipopéptidos mostraron una alta actividad contra *R. solani* y otros hongos, que también fue observado por otros autores (Slama *et al.* 2019, Li *et al.* 2022).

Los resultados encontrados en este estudio son la base para optimizar una mayor producción de compuestos bioactivos extracelulares con capacidad de inhibir el crecimiento de fitopatógenos a partir del cultivo de la bacteria *Bacillus* IcBac2.1 habitante de la rizósfera de plantas de frijol.

Cuadro 16: Matriz del diseño Plackett - Burman mostrando las diferentes combinaciones de los 7 factores y sus niveles

Corridas	Variables							Peso seco metabolitos antifúngicos (gL^{-1})
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	
1	1	-1	1	1	-1	1	1	1.453
2	1	1	1	-1	-1	-1	1	2.257
3	0	0	0	0	0	0	0	1.687
4	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1.410
5	1	-1	1	1	1	-1	-1	1.482
6	-1	1	-1	1	1	-1	1	1.952
7	1	1	-1	1	1	1	-1	1.810
8	-1	1	1	1	-1	-1	-1	3.519
9	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1.990
10	-1	-1	1	-1	1	1	-1	2.128
11	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1.906
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1.953
13	0	0	0	0	0	0	0	1.691
14	-1	1	1	-1	1	1	1	1.042

X₁= $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, X₂= H_3BO_3 , X₃= $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, X₄= $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, X₅= H_3PO_4 , X₆= CaSO_4 , X₇ = $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Cuadro 17: Análisis de varianza de la producción de metabolitos antifúngicos del diseño Plackett – Burman

Fuente	Suma de cuadrados	DF	Media de cuadrados	F Value	Prob > F (p-value)
X ₁ -MnSO ₄ .4H ₂ O	9.17E-04	1	9.17E-04	45871.9	0.003*
X ₂ -H ₃ BO ₃	2.43E-04	1	2.43E-04	12138.75	0.0058*
X ₃ -CuSO ₄ .5H ₂ O	1.55E-04	1	1.55E-04	7731.07	0.0072*
X ₄ -Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3.75E-04	1	3.75E-04	18746.07	0.0046*
X ₅ -H ₃ PO ₄	9.14E-04	1	9.14E-04	45697.19	0.003*
X ₆ -CaSO ₄	2.41E-03	1	2.41E-03	1.21E+05	0.0018*
X ₇ -ZnSO ₄ .7H ₂ O	6.03E-04	1	6.03E-04	30157.32	0.0037*
Modelo	0.01	11	9.48E-04	47416.76	0.0036*
Error	2.00E-08	1	2.00E-08		
Total	0.011	13			

* Significancia estadística a un nivel de probabilidad del 95 por ciento

Cuadro 18: Efecto estimado y coeficientes en la producción de metabolitos antifúngicos del diseño Plackett – Burman

Componentes del medio	Efecto	% Contribución	% Coeficiente
X ₁ -MnSO ₄ .4H ₂ O	- 0.0174875	8.62432	0.9970
X ₂ -H ₃ BO ₃	0.00899583	2.28219	0.9942
X ₃ -CuSO ₄ .5H ₂ O	0.00717917	1.45351	0.9928
X ₄ -Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.0111792	3.52442	0.9954
X ₅ -H ₃ PO ₄	- 0.0174542	8.59147	0.9970
X ₆ -CaSO ₄	- 0.0283625	22.686	0.9982
X ₇ -ZnSO ₄ .7H ₂ O	- 0.0141792	5.66984	0.9963

En el presente estudio, la selección de diferentes fuentes de carbono, nitrógeno y elementos trazas como suplemento del medio mínimo mineral para el crecimiento de la bacteria *Bacillus* IcBac2.1 se realizó para conocer la significancia de su efecto en la producción de metabolitos antifúngicos. El Almidón (20gL⁻¹) y extracto de levadura (8 gL⁻¹) fueron seleccionados como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, como las mejores fuentes que incrementaron significativamente la producción de metabolitos antifúngicos a través de la medición del halo de inhibición y peso seco del extracto crudo de metabolitos antifúngicos. Así también, tres elementos trazas H₃BO₃, CuSO₄.5H₂O, Na₂MoO₄.2H₂O fueron seleccionados por presentar efecto significativo y positivo en la producción de metabolitos antifúngicos a través del diseño estadístico Plackett - Burman. Todas estas fuentes de nutrientes promovieron la producción de metabolitos secundarios con actividad

antifúngica producidos a las 72 horas de cultivo por *Bacillus* IcBac2.1. Este género bacteriano se caracteriza por producir una amplia variedad de compuestos antifúngicos, entre ellos varios compuestos difusibles, los lipopéptidos, que se sintetizan de forma no ribosomal a través de grandes multienzimas, se pueden agrupar en tres familias diferentes, es decir, las surfactinas, las iturinas y las fengicinas (Meena y Kanwar 2015). El uso de lipopéptidos ha sido ampliamente estudiado por sus potenciales actividades antagónicas frente a diversos fitopatógenos.

Las tres variables H_3BO_3 , $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ mostraron ser los factores con mayor influencia al mostrar efecto estadísticamente significativo y positivo en la producción de metabolitos antifúngicos. Estas variables fueron posteriormente seleccionados para encontrar sus óptimos valores utilizando el diseño Box-Behnken. La matriz del diseño experimental se muestra en el cuadro 19. El diseño Box-Behnken mostró el mayor valor de peso seco del extracto crudo de metabolitos extracelulares antifúngicos de 0.84 gL^{-1} , 1.25 veces mayor comparado con el método un factor a la vez ($0,67 \text{ gL}^{-1}$), al suplementar el medio mínimo mineral con 20 gL^{-1} de almidón.

Cuadro 19: Matriz del diseño Box-Behnken para la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos por *Bacillus* IcBac2.1

Corrida	X ₁	X ₂	X ₃	Valor experimental	Valor simulado
1	0	1	1	0.060	0.057
2	1	-1	0	0.070	0.068
3	-1	0	1	0.061	0.062
4	-1	0	-1	0.062	0.061
5	0	0	0	0.059	0.058
6	0	0	0	0.058	0.058
7	1	1	0	0.075	0.077
8	1	0	1	0.067	0.067
9	0	1	-1	0.061	0.060
10	0	0	0	0.058	0.058
11	-1	-1	0	0.084	0.082
12	1	0	-1	0.058	0.057
13	-1	1	0	0.062	0.063
14	0	0	0	0.058	0.058
15	0	-1	-1	0.053	0.056
16	0	0	0	0.059	0.058
17	0	-1	1	0.069	0.070

X₁: H_3BO_3 , X₂: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, X₃: $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$

Subsecuentemente los datos fueron ajustados a una ecuación polinomial de segundo orden:

$$Y = +0.080049 - 0.033954 * X_1 - 0.096180 * X_2 + 0.034331 * X_3 + 0.034383 * X_1 * X_2 + 5.80247E-003 * X_1 * X_3 - 0.043457 * X_2 * X_3 + 9.75772E-003 * X_1^2 + 0.13143 * X_2^2 - 0.020290 * X_3^2$$

Donde Y es peso seco del extracto crudo de metabolitos extracelulares antifúngicos (g/L-1), (X₁) H₃BO₃, (X₂) CuSO₄.5H₂O, (X₃) Na₂MoO₄.2H₂O.

Los resultados del ANOVA indican que el modelo simuló y ajustó los datos experimentales con valores de R² (0.95) y F-value significativos (Cuadro 20).

Cuadro 20: ANOVA de la producción de metabolitos antifúngicos del diseño Box-Behnken

Fuente	Suma de cuadrados	DF	Media de cuadrados	F Value	p-value Prob > F
Lineal					
X ₁	1.65313E-07	1	1.65313E-07	0.025002093	0.8788
X ₂	4.02753E-05	1	4.02753E-05	6.091294437	0.0430*
X ₃	6.728E-05	1	6.728E-05	10.17552104	0.0153*
Interacción					
X ₁ X ₂	0.000193906	1	0.000193906	29.32655718	0.0010*
X ₁ X ₃	2.209E-05	1	2.209E-05	3.34092241	0.1103
X ₂ X ₃	7.744E-05	1	7.744E-05	11.71213361	0.0111*
Cuadrática					
X ₁ ²	0.000263028	1	0.000263028	39.78079422	0.0004*
X ₂ ²	0.00018641	1	0.00018641	28.19291735	0.0011*
X ₃ ²	7.10814E-05	1	7.10814E-05	10.7504463	0.0135*
Modelo	0.000921339	9	0.000102371	15.48272825	0.0008*
Residual	4.62836E-05	7	6.61195E-06		
Lack of Fit	4.46206E-05	3	1.48735E-05	35.77520545	0.0024
Pure Error	1.663E-06	4	4.1575E-07		
Cor Total	0.000967622	16			

X₁: H₃BO₃, X₂: CuSO₄.5H₂O, X₃: Na₂MoO₄.2H₂O. *Significancia estadística a un nivel de probabilidad del 95 por ciento

En este estudio el término lineal (excepto X₁), cuadrático y de interacción (excepto X₁X₃) del modelo mostraron ser significativos para la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos por *Bacillus* IcBac2.1. Los efectos de la interacción entre las variables individuales se representaron mediante la gráfica de contorno 2-D como se muestra en la figura 11.

La interacción entre las variables H_3BO_3 y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ mostró un efecto positivo en la producción de metabolitos antifúngicos por *Bacillus IcBac2.1* indicando que los niveles seleccionados convergían hacia el punto central (nivel 0). Mientras que, la interacción entre H_3BO_3 y $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ no tuvo efecto significativo podría deberse a que el efecto de otros factores ha suprimido la producción o que los niveles seleccionados no fueron convergente hacia el centro.

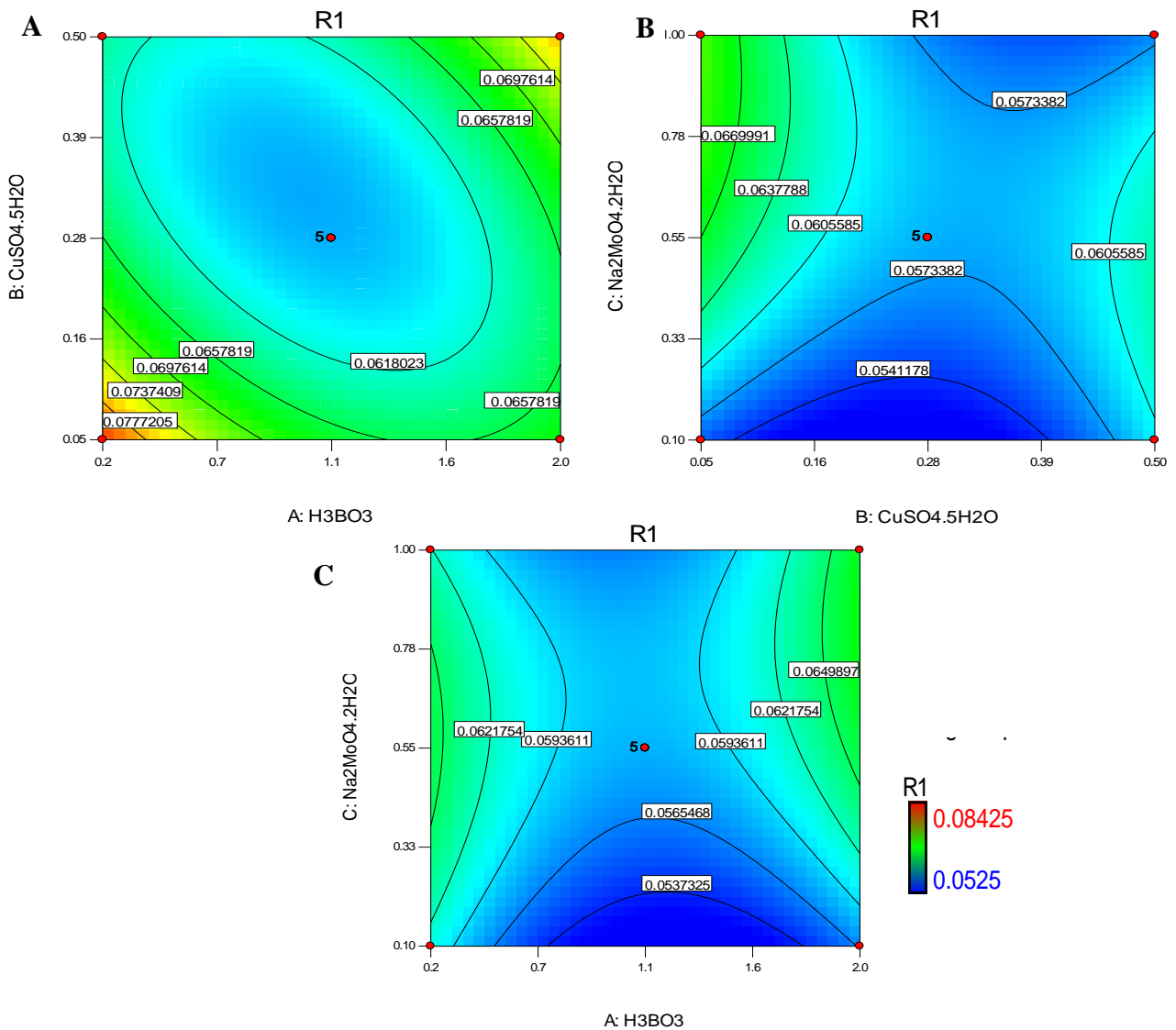


Figura 11: Gráfico de contornos 2-D mostrando el efecto de la interacción entre las variables H_3BO_3 y $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (A), entre las variables $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ y $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (B) y entre las variables H_3BO_3 y $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ en la producción de metabolitos antifúngicos por *Bacillus IcBac2.1*

4.12. INCREMENTO DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS ANTIFÚNGICOS NO VOLÁTILES POR *Bacillus* IcBac2.1 USANDO BIORREACTOR DE TANQUE AGITADO MODIFICADO

La producción de metabolitos antifúngicos extracelulares fue obtenida en un biorreactor de tanque agitado modificado de 3 L de capacidad conectado a dos colectores de espuma con un sistema de recirculación al biorreactor donde se evaluó el efecto de diferentes niveles de aireación y agitación. En todos los tratamientos evaluados se observó la producción constante y vigorosa de espuma desde la fase de crecimiento Log (1- 8 horas) con 58.9 por ciento de Demanda de Oxígeno (DO), mientras que se observó excesiva formación de espuma entre las 20 a 24 horas con 30 por ciento de DO. La espuma que se desbordó a través del dispositivo de gas de escape del biorreactor fue continuamente recogido a los colectores de espuma y recirculado al biorreactor en condiciones estériles (Figura 12).



Figura 12: Producción de biosurfactantes por *Bacillus* IcBac2.1 a través de fermentación Batch en biorreactor de tanque agitado mostrando la formación excesiva de espuma y la colección y recirculación de la espuma en el biorreactor

La producción de compuestos antifúngicos durante la fermentación que se caracterizó por presentar un alto grado de formación de espuma probablemente se debió a la capacidad de *Bacillus* IcBac2.1 de producir compuestos biosurfactantes del tipo lipopéptidos. Es bien

reportado la capacidad del género *Bacillus* de producir varios tipos de lipopéptidos como liquenisinas, bacilomicina, fengycinas y surfactinas (Giri *et al.* 2019).

En todos los tratamientos se logró obtener compuestos antifúngicos con propiedades biosurfactantes. La figura 13 (A – E) muestra el perfil de producción de compuestos biosurfactantes (peso seco del crudo de lipopéptidos), producción de esporas y crecimiento celular de *Bacillus* IcBac2.1. La mejor condición de operación para la producción de biosurfactantes fue usando la saturación inicial de OD del medio como 100 por ciento y sin control a partir de entonces (velocidad de agitación = 400 rpm; velocidad de aireación = 1,0 vvm; pH = 6,8-7,2 y temperatura = 28° C), produjo una alta concentración de crudo de lipopéptidos (11.18 gL⁻¹) a las 48 horas de incubación (Figura 13C). En el colector de espuma se obtuvo el 65 por ciento de la producción del crudo de lipopéptidos, mientras que en el biorreactor se obtuvo el 35 por ciento. Así también, Gong *et al.* (2009) reportaron que la producción de surfactina cruda producida por una cepa mutante de *B. subtilis* E8 aumentó significativamente de (0,75±0,37) g/L a (10,26±0,78) g/L cuando realizó la producción bajo condiciones definidas de aireación (1.0 vvm) y agitación (300 rpm) durante 72 horas bajo un sistema de cultivo en batch. La surfactina cruda se concentró principalmente en el colector de espuma, pero se recuperó algo en el medio de cultivo.

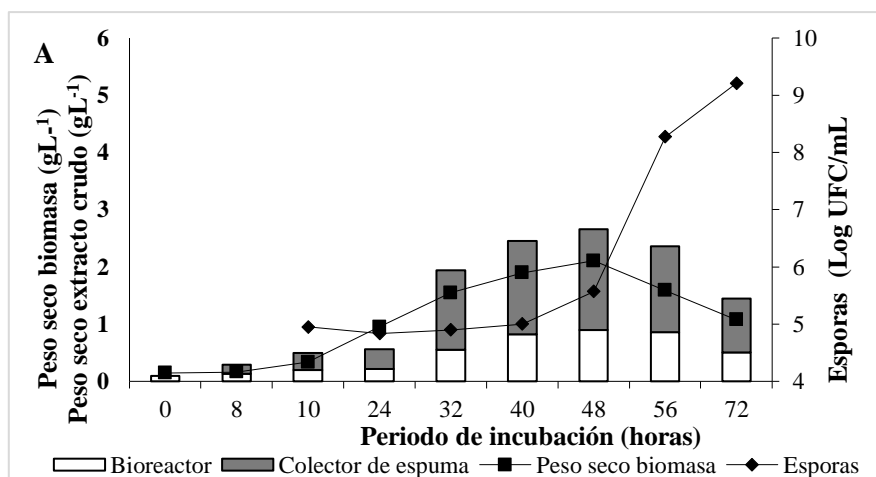
El alto grado de formación de espuma durante la fermentación sugirió que la producción de biomasa y de los biosurfactantes pudo verse afectada por el nivel de agitación y aireación. Por lo tanto, es importante mantener el OD en el medio que satisfaga la tasa de consumo de oxígeno de las células que permita un crecimiento celular eficiente y, por lo tanto, una alta producción de biosurfactante, por lo cual la aireación de 1vvm y agitación de 400 rpm promovió un alto crecimiento celular correspondiente a 5.18 gL⁻¹ y por ende una alta producción de biosurfactantes (11.18 gL⁻¹) a las 48 horas de evaluación. Se ha reportado que tanto la concentración de oxígeno disuelto (OD) en el medio como el suministro excesivo de oxígeno son desfavorables para el crecimiento y la producción de tensioactivos lipopeptídicos como la liquenisina (Lin *et al.* 1999; Sanket *et al.* 2018).

De acuerdo a la máxima velocidad específica de crecimiento (μ) = (1/X) (dX/dT), donde X es la concentración celular y T el tiempo de crecimiento exponencial, demostró que bajo estas condiciones de trabajo se obtuvo un alto valor de μ correspondiente a 0.08 h⁻¹ con tiempo de duplicación de 6.51 h⁻¹ en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 21). Sin embargo, se redujo significativamente la máxima velocidad de crecimiento y el tiempo

de duplicación en comparación con las condiciones de crecimiento celular a 150 rpm en un sistema de fermentación de lote en batch en el mismo medio de cultivo y sin aireación (a nivel de matraz) donde se obtuvo una máxima velocidad de crecimiento de 1.01 h^{-1} y un tiempo de duplicación de 69.09 min^{-1} .

A 500 rpm y 0.5 vvm causó la rápida producción de espuma que dio como resultado el desbordamiento del caldo de cultivo y un tiempo de fermentación corto debido a la rápida disminución del volumen de cultivo. Esto parece conducir a un bajo nivel de rendimiento de biomasa (3.89 gL^{-1}) y producción de biosurfactantes (3.78 gL^{-1}) (Figura 13 D) con máxima velocidad específica de crecimiento de 0.06 h^{-1} (Cuadro 19). Así también, Gong *et al.* (2009) reportaron que la máxima producción de biomasa de *B. subtilis* E8 fue de 6.50 gL^{-1} después de 32 horas de cultivo en batch.

El efecto de la aireación y agitación también se evaluó en la producción de esporas por la bacteria *Bacillus* IcBac2.1, debido a que la síntesis de los biosurfactantes antifúngicos y la formación de esporas ocurrieron durante la fase estacionaria, por lo cual parece haber una correlación directa entre la esporulación y la síntesis de los antibióticos. La máxima producción de esporas estuvo en el rango de $2.4\text{E}+07$ a $4.2\text{E}+08$. El tratamiento de 1 vvm y 400 rpm permitió obtener la mayor producción de esporas ($4.2\text{E}+08$) (Figura 13). Bacterias gran negativas como los miembros del género *Bacillus* son conocidos formadores de esporas. En condiciones ambientales adversas, como la pérdida de un requerimiento nutricional, estas bacterias pueden pasar de un estado vegetativo a un estado latente o esporas, lo cual desencadena una cascada de eventos genéticos (comparable a la diferenciación) que conducen a la producción de una spora. Dentro del proceso, la etapa en la cual ocurre la producción de ácido dipicolínico se ha asociado a menudo la secreción de antibióticos y toxinas (Murray 2021).



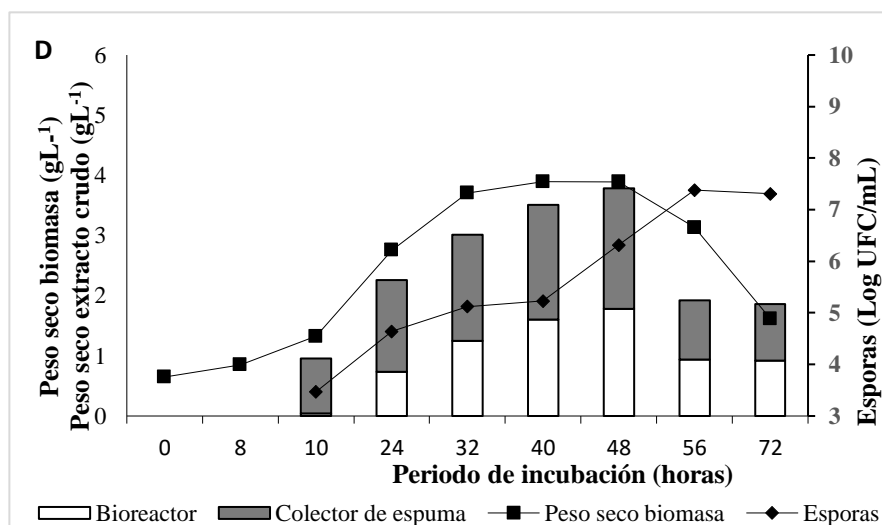
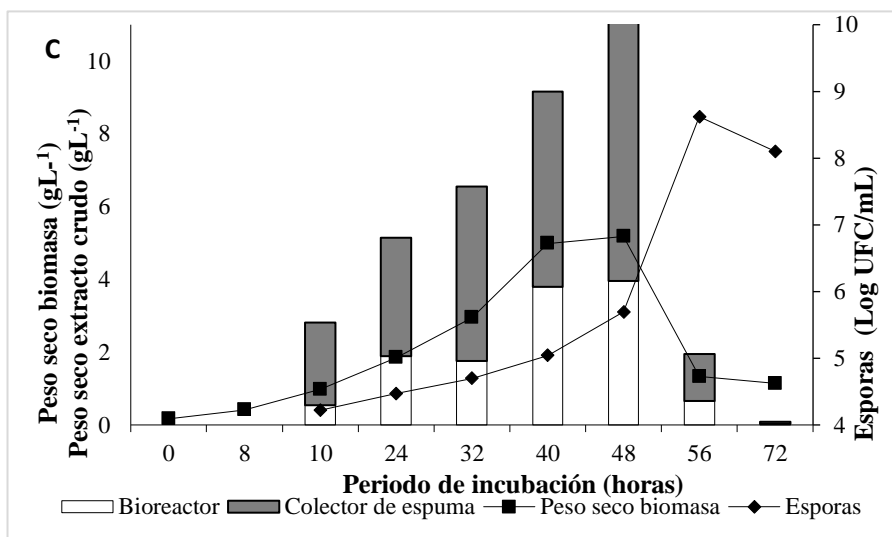
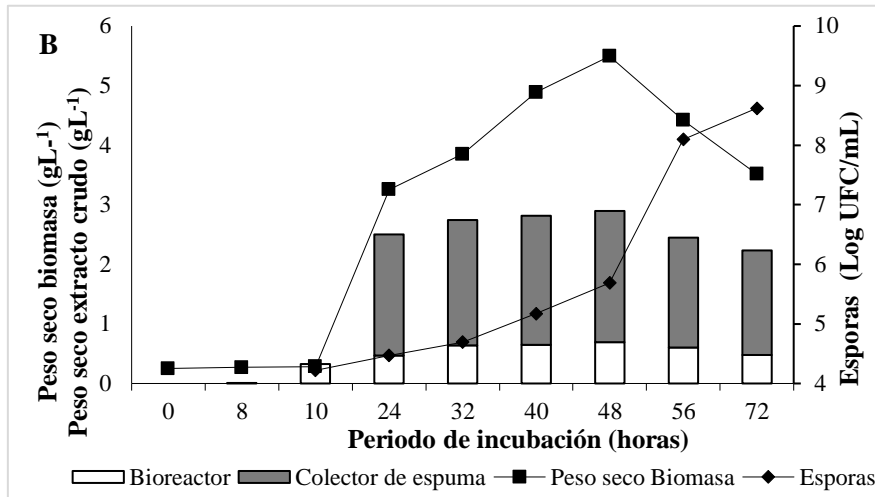


Figura 13: Producción de biosurfactantes por *Bacillus IcBac2.1* en diferentes condiciones de agitación y aireación a nivel de biorreactor de tanque agitado: A. 300 rpm y 1 vvm. B. 300 rpm y 1.5 vvm. C. 400 rpm y 1 vvm. D. 500 rpm y 0.5 vvm

Cuadro 21. Parámetros cinéticos del crecimiento exponencial en los diferentes tratamientos evaluados

Agitación rpm	Aireación vvm	μ (Máxima velocidad de crecimiento h^{-1})	Tiempo de generación h^{-1}
300	1.0	0.07	9.45
300	1.5	0.06	10.87
400	1.0	0.09	6.51
500	0.5	0.06	11.47

Los lipopéptidos biosurfactantes se componen de dos regiones diferentes: una cola (s) de acilo y una secuencia oligopeptídica lineal corta, que contiene un enlace amida. La cola hidrófoba contiene una cadena hidrocarbonada, mientras que la cabeza hidrófila contiene la secuencia peptídica del lipopéptido. El módulo peptídico incluye residuos catiónicos y aniónicos, así como aminoácidos no proteicos (Mondal *et al.* 2017).

Dependiendo de la naturaleza del biosurfactante y de los organismos productores, son posibles varios patrones de producción de biosurfactantes, y generalmente se ven afectados por los nutrientes y los parámetros ambientales y físicos. Se ha demostrado que el suficiente suministro de oxígeno disuelto y la agitación mecánica mejoran la producción de biosurfactantes lipopeptídicos (Davis *et al.* 2001). Sin embargo, la agitación y la aireación vigorosa conduce a la formación de espuma severa y provocan un funcionamiento ineficiente e inestable del fermentador. Por lo tanto, las estrategias de aireación y agitación deben optimizarse no solo para cumplir con el requisito de suficiente oxígeno y transferencia de masa, sino también para minimizar los efectos secundarios de la formación intensiva de espuma.

4.13. MODELAMIENTO MATEMÁTICO DE LA PRODUCCIÓN DE METABOLITOS EXTRACELULARES

Los parámetros cinéticos del modelo Luedeking y Piuret fueron estimados para la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos producidos por *Bacillus* IcBac2.1 a nivel de tanque agitado modificado en condiciones de 400 rpm, 1 vvm a pH 6,8-7,2 y 28° C durante 48 horas donde se obtuvo la mayor producción del crudo de lipopéptidos. El cálculo de los parámetros cinéticos se realizó utilizando Microsoft Excel (Figura 14).

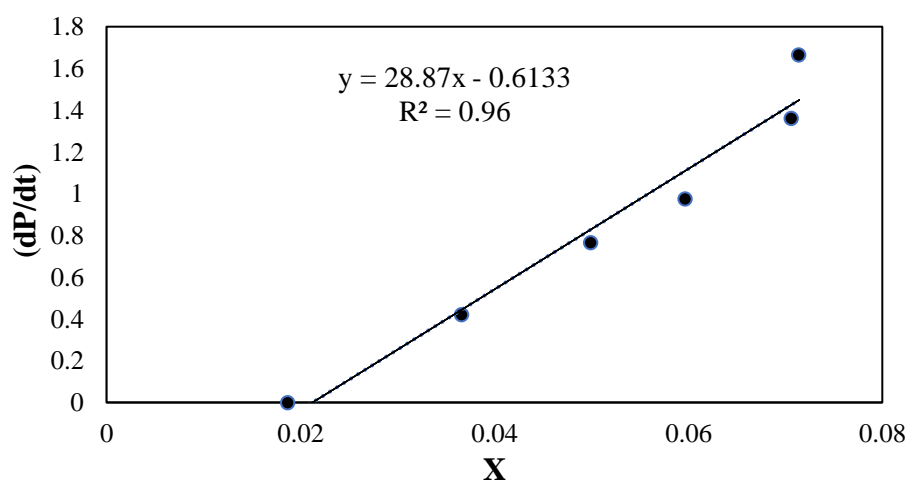


Figura 14: Estimación de los parámetros del modelo cinético de la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos producidos por *Bacillus* IcBac2.1: “ α ” Coeficiente de formación del producto asociado al crecimiento y “ β ” Coeficiente de formación del producto no-asociado al crecimiento

Los valores de las constantes cinéticas α y β fueron 28.87 y -0.613 respectivamente para *Bacillus* IcBac2.1 con el modelo matemático Luedeking y Piuret. El valor de R^2 correspondió a 0.96. Los valores de los parámetros cinéticos experimentales y predecidos por el modelo de Luedeking y Piuret se observan en el cuadro 22. En este estudio, la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos biosurfactantes por *B. halotolerans* IcBac2.1 en el biorreactor modificado estuvo asociado al crecimiento de la biomasa dado que el valor de α es mayor que β . Este resultado es similar al obtenido por Subbalaxmi *et al.* (2021) en la obtención de la enzima tanasa de la bacteria *Bacillus cereus* M1GT.

Cuadro 22. Parámetros cinéticos de la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos

Parámetros del modelo	Valor experimental	Valor Predecido
α	28.87	19.95
β	-0.613	-0.116

La gráfica de los valores experimentales y valores simulados para la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos mediante el modelo Luedeking y Piuret mostró un

buen ajuste lo cual indica que el modelo provee una buena predicción con valor de R^2 de 0.96 (Figura 15).

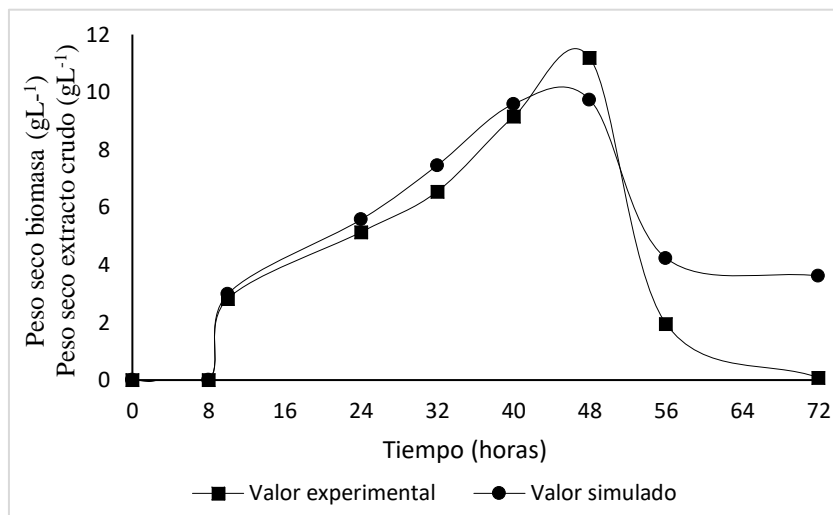


Figura 15: Comparación del perfil cinético del valor experimental (■) y del modelo Luedeking y Piuret (●) en la producción de metabolitos extracelulares antifúngicos por *Bacillus IcBac2.1* a nivel de biorreactor de tanque agitado

4.14. CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS NO VOLÁTILES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

4.14.1. Estabilidad a diferentes temperaturas y pH

Se midió la estabilidad de los lipopéptidos crudos a diferentes valores de pH y temperatura y los resultados se muestran en el cuadro 14. La actividad antagonista del lipopéptido crudo no mostró ninguna disminución notable a alta temperatura de 121 °C y permaneció sin ningún aumento significativo en el micelio inhibición del crecimiento, por lo que se encontró que los lipopéptidos crudos son térmicamente estables. Además, se llevaron a cabo análisis de estabilidad del pH, que revelaron que los lipopéptidos crudos conservan su actividad antagonista hasta pH 10. Por otro lado, la actividad se vio fuertemente afectada por valores de pH más altos de 12 a 14. La actividad antagonista disminuyó al aumentar el pH niveles, de valor ácido a básico; esto puede deberse a la precipitación de los lipopéptidos crudos en soluciones ácidas para purificarlos.

4.14.2. Solubilidad en disolvente orgánico

La partición líquido-líquido utilizando diferentes solventes determinó que el acetato de etilo, cloroformo, butanol, acetona y metanol permitieron la extracción de lipopéptidos crudos presentes en el caldo de fermentación (Cuadro 19). Los extractos de cloroformo, butanol y metanol mostraron una importante inhibición del crecimiento micelial contra todos los hongos probados. Por otro lado, no se observó actividad antagónica cuando se ensayaron extractos de hexano y éter de petróleo. Los resultados revelaron la presencia de compuestos lipofílicos y polares presentes en los lipopéptidos crudos.

4.14.3. Índice de emulsificación (E24)

El índice de emulsificación de los metabolitos antifúngicos frente a diferentes compuestos hidrófobos se determinó a las 24 horas (Cuadro 23). En nuestro trabajo se observó formación de emulsión estable con aceite de soya, maní y sésamo, lo que se reflejó en los índices de emulsificación en el rango de 45 a 49 por ciento. Así, los metabolitos antifúngicos presentaron actividad biosurfactante.

Cuadro 23: Caracterización bioquímica del crudo de lipopéptidos producidos por *Bacillus* IcBac2.1

Crudo de lipopéptidos	IcBac2.1 (mm)		
	<i>F. oxysporum</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>R. solani</i>
Temperaturas			
40°	17	17	24
60°	17	17	22
80°	17	15	20
121°	15	15	20
Control	40	40	40
Estabilidad de pH			
2	19	18	23
4	19	15	23
6	19	15	23
8	18	15	21
10	16	11	21
12	0	0	5
14	0	0	5
Control	40	40	40
Fase orgánica después de la extracción con solvente orgánico			
hexano	0	0	0
Éter de petróleo	0	0	0
Acetato de etilo	10	10	11
Cloroformo	14	15	15

<<Continuación>>

butanol	22	23	22
acetona	11	12	12
metanol	15	16	16
El₂₄ %			
Aceite de soya	45	45	47
Aceite de maní	48	47	46
Aceite de sésamo	46	49	46

Control: Placas sin inoculación del crudo de lipopéptidos. Cada valor representa el promedio

± DE (n = 2)

4.15. PURIFICACIÓN DE METABOLITOS NO VOLÁTILES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

El sobrenadante libre de células obtenido a partir del cultivo de *Bacillus* IcBac2.1 mostro una alta actividad antifúngica contra *R. solani*, *S. sclerotiorum* y *F. oxysporum* (Cuadro 24).

Cuadro 24. Actividad antifúngica contra *R. solani*, *S. sclerotiorum* y *F. oxysporum* obtenida a partir del sobrenadante libre de células de *Bacillus* IcBac2.1 cultivada en medio mínimo mineral. La actividad se midió por el halo de inhibición formado alrededor de la colonia (mm). Los resultados corresponden a una media de dos repeticiones

Cepa	Halo de inhibición (mm)		
	<i>R. solani</i>	<i>S. sclerotiorum</i>	<i>F. oxysporum</i>
IcBac2.1	21±0.03	22±0.02	20±0.10

El extracto crudo obtenido mediante separación líquido – líquido a partir del sobrenadante libre de células utilizando diferentes solventes orgánicos, presentó mayor actividad antifúngica contra *R. solani* con los solventes butanol (16.90 mm), metanol (16.43 mm) y cloroformo (15.38 mm) y con altos valores de halos de inhibición (Figura 16).

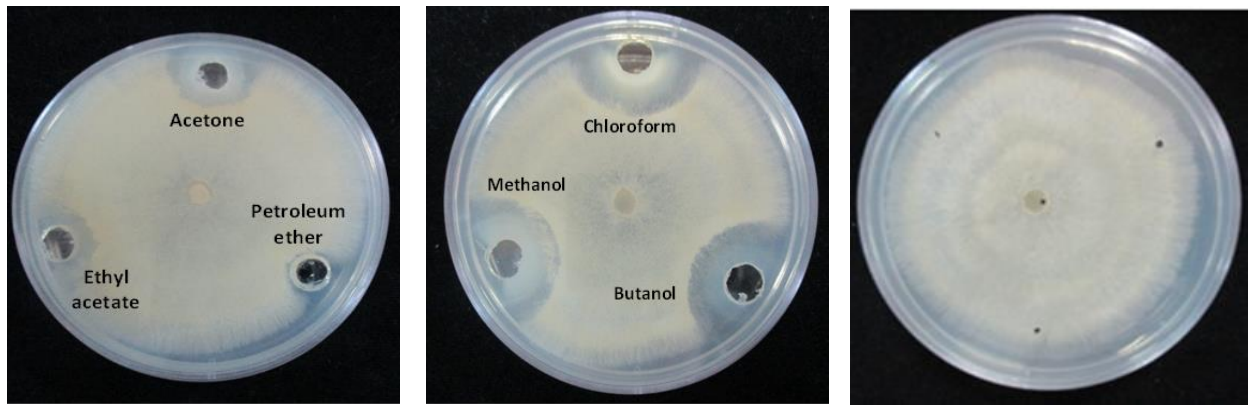


Figura 16: Actividad antifúngica contra *R. solani* mediante la técnica de difusión en agar del extracto crudo obtenido a partir del sobrenadante libre de células del cultivo de *Bacillus* IcBac2.1 separado con diferentes solventes orgánicos

Los solventes acetona (11.5 mm) y acetato de etilo (10.52 mm) presentaron bajos valores de halos de inhibición, mientras que, el éter de petróleo no mostró actividad antifúngica. Se realizó cromatografía en capa fina para observar el perfil cromatográfico y nivel de pureza de cada solvente orgánico, siendo la fase butanólica la que presento una menor cantidad de manchas indicando la presencia de menor contaminación (Figura 14) por lo cual esta fase se utilizó para realizar las siguientes etapas del proceso de purificación.

La extracción de la fracción bioactiva se realizó con metanol, butanol y cloroformo indicando su alta polaridad. El acetato de etilo y el cloroformo se han utilizado previamente para extraer la fracción antifúngica producida por las cepas de *Bacillus*. De ahí que la variabilidad de los solventes eficientes y el método de extracción reportado por varios estudios para la extracción de los compuestos antifúngicos producidos por cepas de *Bacillus* spp. resultaron por su variedad química (péptido, lipopéptido de policétido, fosfolípido y otros) (Sansinenea y Ortiz 2011; Meena y Kanwar 2015).

A partir del fraccionamiento de la fase butanólica por cromatografía líquida al vacío se obtuvo 11 fracciones, de las cuales las fracciones N° 9, 10 y 11 presentaron actividad antifúngica contra *R. solani* a través de la prueba en disco (Figura 17).

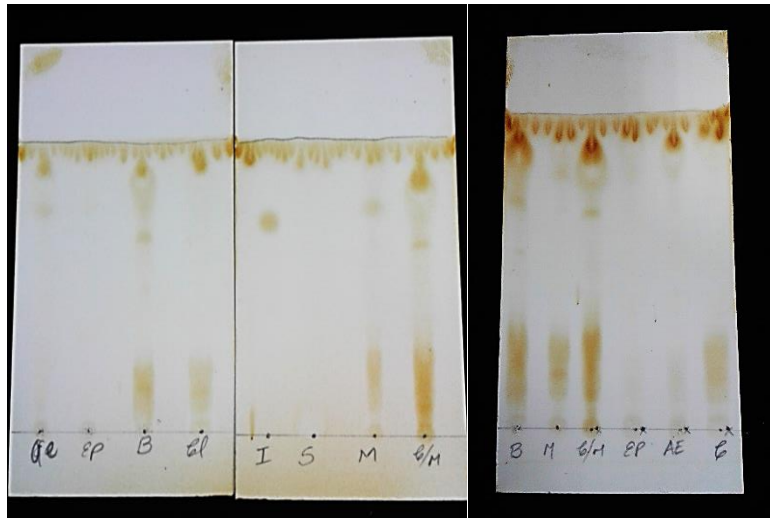


Figura 17: TLC mostrando las manchas correspondientes a la porción lipolítica de los compuestos lipopeptídicos en los extractos orgánicos de butanol (b), Cloroformo (cl), metanol (m), acetato de etilo (ae), éter de petróleo (ep) comparado con la corrida cromatográfica del lipopéptido control iturina (i)

La fracción positiva que mostro menor contaminación en la corrida de cromatografía en capa fina fue analizada por cromatografía flash colectándose 5 fracciones. La prueba de difusión en pocillo determinó positiva la fracción N° 4 y 5 (Figura 18).

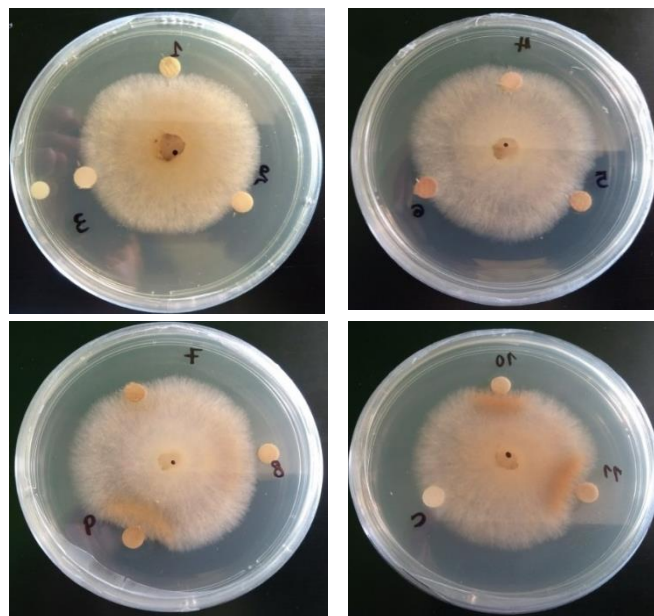


Figura 18: Prueba en disco mostrando inhibición del crecimiento fúngico del hongo fitopatígeno *R. solani* en las fracciones N° 9, 10 y 11, mientras que, las demás fracciones fueron no mostraron actividad antagonista. C: control

La fracción positiva que mostro menor contaminación en la corrida cromatográfica en capa fina fue analizada por HPLC obteniéndose 6 picos (Figura 19), de los cuales el pico N° 6 con tiempo de retención de 21.17 minutos, presentó la mayor actividad antifúngica (halo de inhibición 16.5 mm) seguido del pico N° 5 (halo de inhibición 18 mm) con 19.5 minutos de tiempo de retención (Figura 20). Mientras que, los picos N° 1, 2, 3 y 4 no mostraron actividad antifúngica. El pico N° 5 con menor número de contaminantes fue considerado para el ensayo de espectrometría de masas.

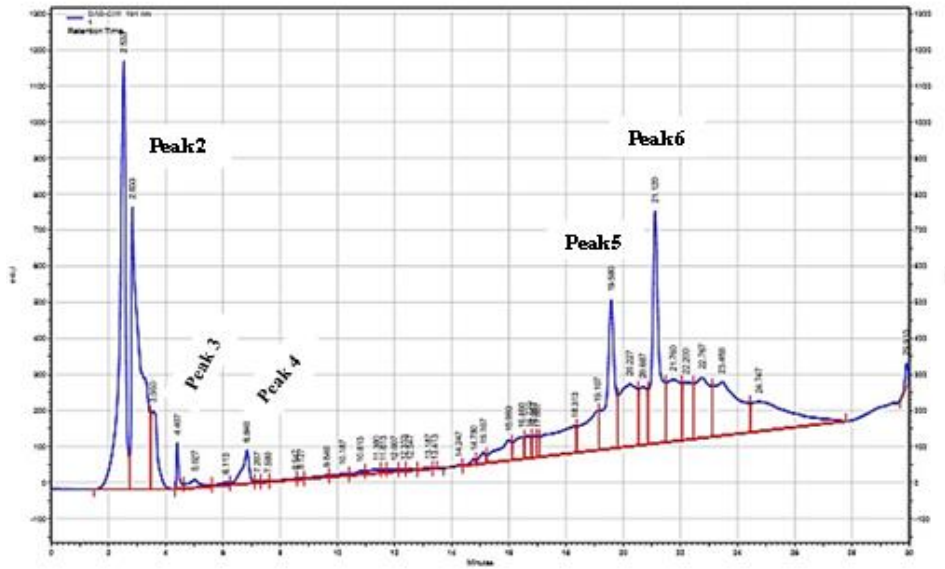


Figura 19: Cromatograma del análisis de HPLC mostrando 6 picos, de los cuales el pico Nro. 6 con mayor actividad antagonista mostró un tiempo de retención de 21.17 minutos

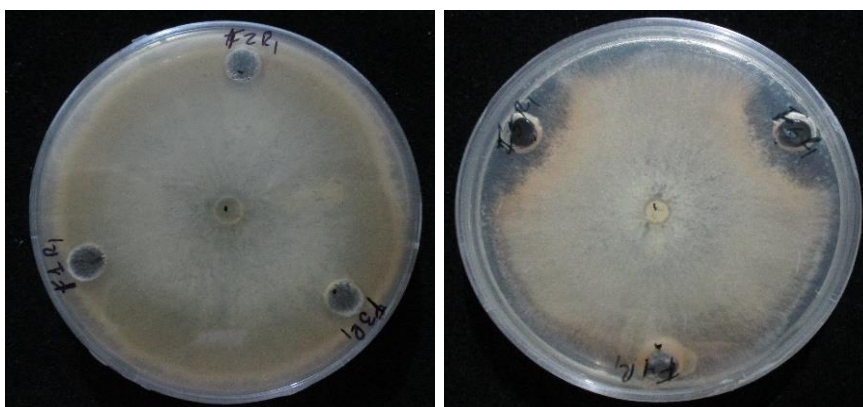
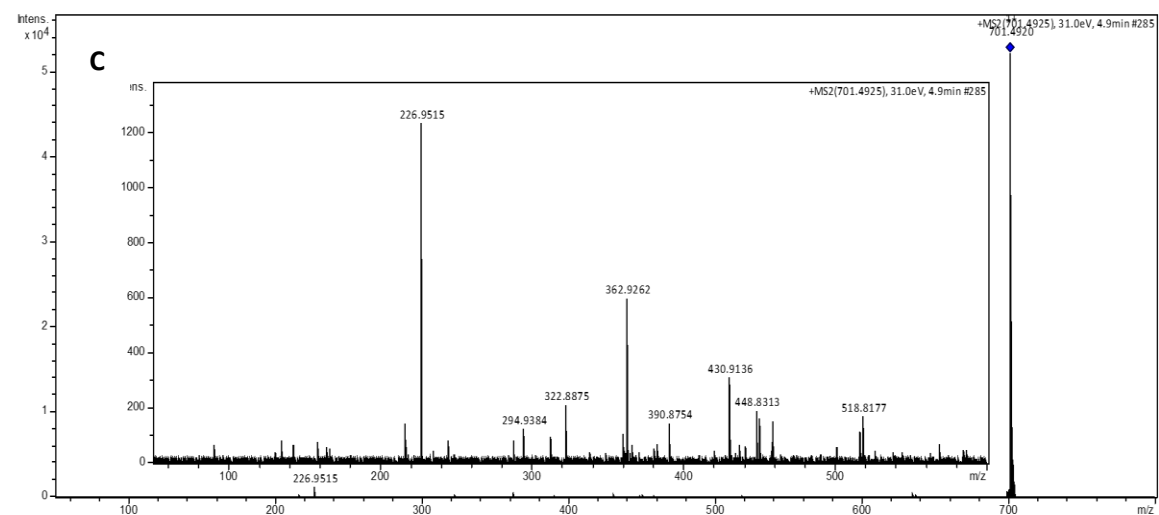
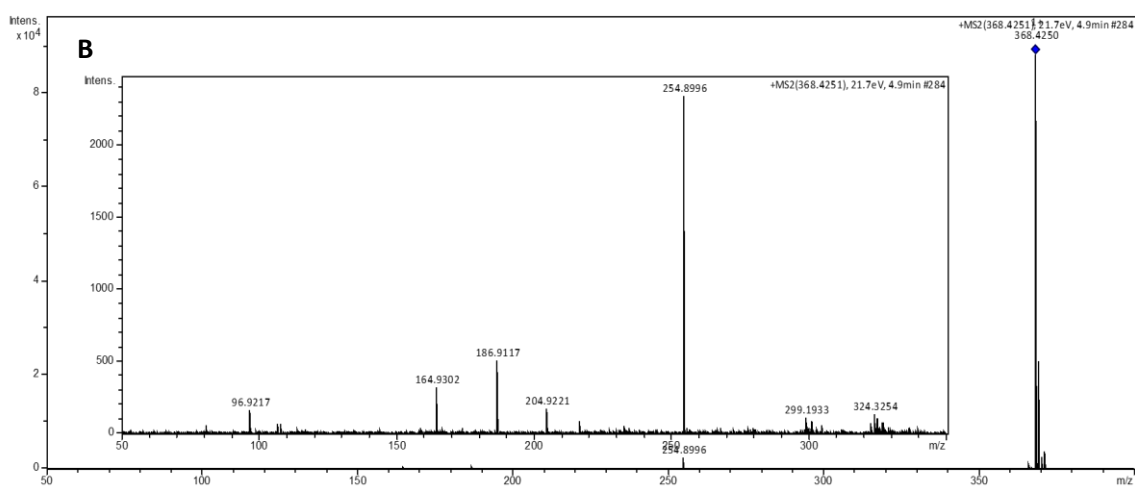
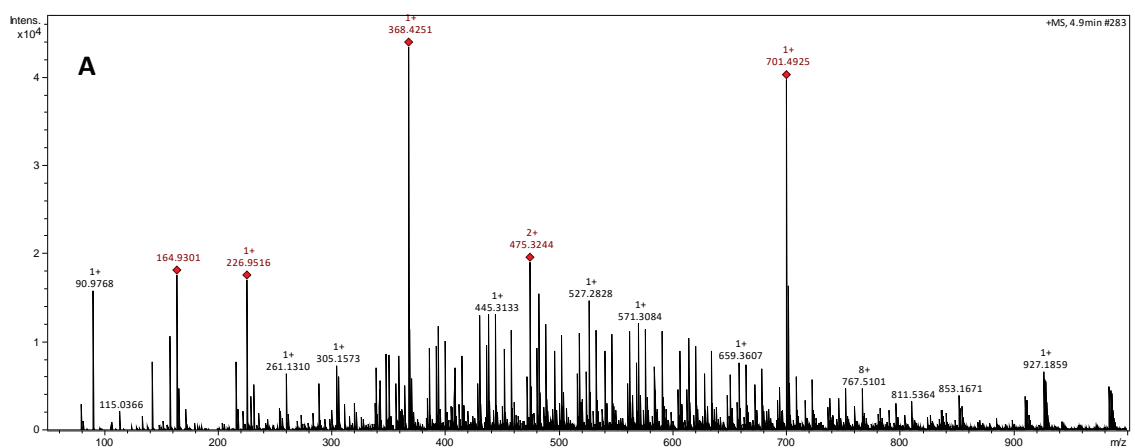


Figura 20: Prueba de difusión en placa mostrando inhibición del crecimiento fúngico del hongo fitopatógeno *R. solani* en las fracciones N° 5 y 6, mientras que, las demás fracciones fueron no mostraron actividad antagonista

4.16. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA POR LC-MC

El análisis LC-MS del pico N° 6, el escaneo del espectro en modo de ionización positiva $[M+H]^+$ identifico 4 compuestos (Figura 21A) con los siguientes pesos moleculares 368.4250 Da (Figura 21B); 701.4925 Da (Figura 21C); 475.3242 Da (Figura 21D) y 164.9301 Da (Figura 21E).



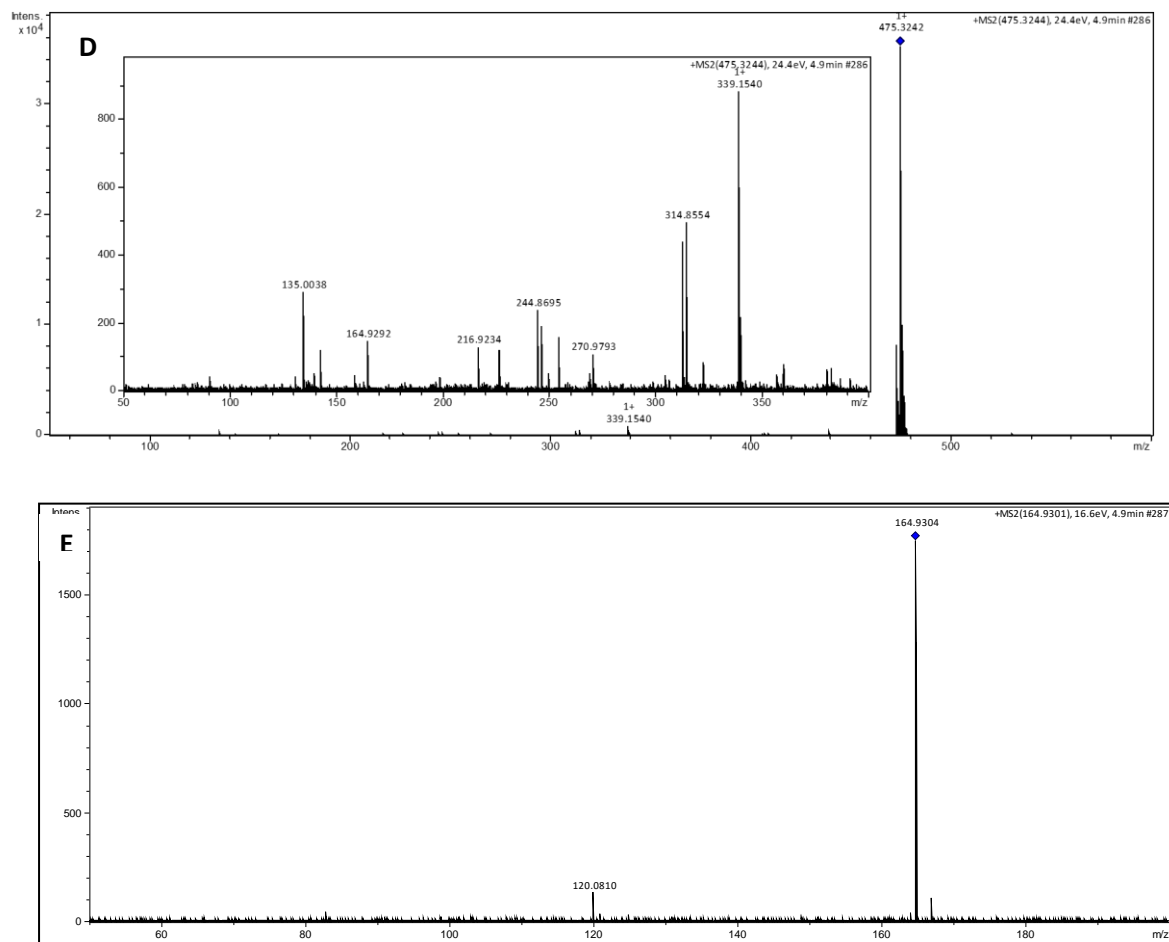


Figura 21: Espectros LC-MS de los extractos butanólicos obtenidos a partir del cultivo de *Bacillus* IcBac2.1 A. Escaneo de espectro de 5 muestras en modo de ionización positiva $[M+H]^+$. B. Espectro MS/MS de ion m/z $[M+H]^+$ 368.4250. C. Espectro MS/MS de ion m/z $[M+H]^+$ 701.4925. D. Espectro de MS/MS do íon m/z $[M+H]^+$ 475.3242. E. Espectro de MS/MS do íon m/z $[M+H]^+$ 164.9301

Entre varios compuestos difusibles, los lipopéptidos, que se sintetizan de forma no ribosomal a través de grandes multienzimas, se pueden agrupar en tres familias diferentes, es decir, surfactinas, iturinas y fengicinas (Meena *et al.* 2015). El uso de lipopéptidos ha sido ampliamente estudiado por sus potenciales actividades antagónicas frente a varios fitopatógenos. Fengicina producida por *Bacillus subtilis* NCD-2 puede reducir el desarrollo del marchitamiento del algodón (una enfermedad de las plántulas) causada por *R. solani* (Guo *et al.* 2014).

Las cepas del grupo *B. subtilis* producen surfactinas, iturinas y fengicinas, mientras que las kurstaquinas son producidas por cepas de *B. thuringiensis* (Béchet *et al.* 2012). Todos se caracterizan por ser resistentes al tratamiento térmico, valores bajos de pH e hidrólisis por

peptidasas y proteasas (Stein 2005). La importancia de la producción de antibióticos por *Bacillus* spp. en la supresión de enfermedades de las plantas se ha demostrado con diferentes trabajos. *Bacillus brevis* y *Bacillus polymyxa* producen antibióticos peptídicos que inhiben fuertemente la germinación de *Botrytis cinerea*, un agente causal de la podredumbre gris en frutos de fresa in vitro y pruebas de campo (Haggag *et al.* 2013).

Los lipopéptidos son una clase de surfactantes producidos por varias especies de *Bacillus* (Lee *et al.* 2007). La formación de una emulsión estable observada con diferentes aceites orgánicos mostró actividad biosurfactante del crudo de lipopéptidos producidos por *B. halotolerans*. La actividad biosurfactante está relacionado con una alta actividad antimicrobiana con la producción de compuestos bioactivos eficientes para controlar enfermedades en plantas causadas por fitopatógenos (Vollenbroich *et al.* 1997). La actividad antifúngica del crudo de lipopéptidos aún después de la exposición a 121 °C y a diferentes valores de pH, demostró que el crudo de lipopéptidos son térmicamente estables, además, mostraron actividad antagónica hasta pH 10 (Memenza-Zegarra y Zúñiga-Dávila 2021; Toral *et al.* 2018).

Se han descrito muchos mecanismos sobre cómo *B. halotolerans* y otras especies inhiben el crecimiento del micelio y protegen la salud de las plantas (Toral *et al.* 2018; Slama *et al.* 2019; Desmyttere *et al.* 2019). *Bacillus* IcBac2.1 produjo en nuestras condiciones cuatro moléculas de lipopéptidos en el rango del peso molecular de 164 a 701 Da, lo cual sugiere que estas moléculas probablemente estarían relacionadas a bacilicina o bacillaene, las cuales son pequeñas en comparación con inturina A (Dang *et al.* 2019), bacilomicina D, fengycina y surfactina C₁₄ (Toral *et al.* 2018) (Cuadro 25). Iturina y Fengicina son los principales lipopéptidos con fuertes actividades antifúngicas, mientras que Surfactina tiene actividad antibacteriana (Meena y Kanwar 2015), probablemente los compuestos presentes en el extracto butanólico está relacionado con fengicina, sin embargo, es necesario realizar más estudios para determinar y caracterizar las moléculas producidos por *Bacillus* IcBac2.1.

Cuadro 25: Características de lipopéptidos producidos por especies de *Bacillus*

Tipo de lipopéptido	Peso molecular	Composición	Referencia bibliográfica
Iturina A	1043.2 Da	Péptido compuesto de 7 residuos de aminoácidos y una cola hidrofóbica de 11-12 carbonos.	Meena y Kanwar 2015
Surfactina	1036 Da	Lipoheptapeptido cíclico anfipático y una cadena de ácido graso β -hidroxi de 12 a 16 átomos de carbono.	Meena y Kanwar 2015
Fengicina	1463.7 Da	Cadena de péptido compuesto de 10 aminoácidos y una cadena de ácido graso de 14 a 17 átomos de carbono.	Meena y Kanwar 2015
Bacilisina	270.28 Da	Péptido cíclico que posee un enlace peptídico de cabeza a cola, así como puentes de sulfuro formados entre grupos de cisteína y residuos de aminoácidos deshidratados	Yang <i>et al.</i> 2009
Bacillaene	580.8 Da	Molécula lineal con dos enlaces amida: el primero une un ácido α -hidroxicarboxílico a un ácido ω -aminocarboxílico y el segundo une el ácido carboxílico.	Helfrich <i>et al.</i> 2019
Subtilosina A	3015.5 Da	Proteasa	Sutyak <i>et al.</i> 2008

El análisis del genoma de la cepa *Bacillus* IcBac2.1 reportó la presencia de clusters de genes responsables de la biosíntesis de metabolitos antifúngicos con 100 por ciento de similitud correspondientes al sideróforo bacilibactina y a los lipopéptidos subtilosina A, bacilisina y

bacillaene. Otro cluster de genes mostro similitud de >61 por ciento a lipopéptidos antifúngicos surfactina, fengicina y pliplastina (Memenza *et al.* 2022).

4.17. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Se evaluó la CMI de los extractos de metanol, acetona y cloroformo contra *R. solani* (Cuadro 26). El extracto de metanol presento una CMI de 3.91 mg/mL con buena actividad antifúngica. Mientras que los extractos de Acetona y cloroformo obtuvieron un CMI de <100 mg/mL y 91.77 mg/mL respectivamente.

Cuadro 26: CMI de extractos orgánicos de metabolitos antifúngicos obtenidos a partir del cultivo de *Bacillus* IcBac2.1

Extracto orgánico	Concentración mínima inhibitoria (mg/mL)
Metanol	3.91
Acetona	<100
Cloroformo	91.77

Todos los extractos exhibieron actividad antagonista contra de *R. solani*, de los cuales metanol mostró una mayor actividad en comparación de los extractos de acetona y cloroformo. Existen muchos estudios sobre la actividad antifúngica de metabolitos aislados de diferentes especies de *Bacillus*. Los extractos orgánicos de hexano (25 mg/mL), acetato de etilo (37.5 mg/mL) y cloroformo (100 mg/mL) obtenidos de *Bacillus amyloliquefaciens* VJ-1 mostraron marcada actividad antagonista contra *Fusarium oxysporum* (Kadaikunnan *et al.*, 2015). Algunas cepas de *B. amyloliquefaciens* pueden producir fengicina capaz de inhibir el crecimiento micelial de *Fusarium graminearum*, (Hanif *et al.* 2019). Park *et al.* (2015) demostró que *B. vallismortis* produjo iturina A, péptido cíclico unido a una cadena de C15 de ácidos grasos β -amino con peso molecular de 852.4 Da, con fuerte antagonismo contra *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici*.

4.18. IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS VOLÁTILES CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA-CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTRÓMETRO DE MASAS (SPME-GC-MS)

Los perfiles de emisión de VOC medidos por análisis SPME/GC-MS variaron en las cepas *Alcaligenes* TvPs2.4 y *Pseudomonas* TvPs1.6. Se detectaron 42 VOC y los perfiles de emisión de ocho de ellos diferían según el tipo de cepa (Cuadro 27). El análisis de los VOC de *Alcaligenes* sp TvPs2.4 registró consistentemente cuatro picos con una abundancia relativamente alta (entre 22,57 y 7,84 por ciento) para D-limoneno, disulfuro de dimetilo, butirato de metilo y 3-metilbutanoato de etilo. Los perfiles de emisión de *Alcaligenes* sp TVPs2.4 también mostraron siete VOC desconocidos. En el caso de *Pseudomonas* sp TvPs1.6, cuatro picos con abundancia relativamente alta (entre 38,89 y 5,84 por ciento) para disulfuro de dimetilo, D-limoneno, 3-metilbutanoato de metilo y 3-metilbutanoato de etilo. *Pseudomonas* sp TvPs1.6 también mostró siete VOC desconocidos.

El disulfuro de dimetilo producido por *Streptomyces globisporus* JK-1 mostró actividad antifúngica contra *Penicillium italicum* en *Citrus micracarpa* a una concentración de 100 $\mu\text{L L}^{-1}$ (Li *et al.* 2010). D-limoneno indujo la expresión del gen PDF1.2 y la resistencia contra *Colletotrichum higginsianum* en *Arabidopsis ecotipo* Col-0 (Fujioka *et al.* 2015). Ácido acético, 2-nonanona, d-limoneno y disulfuro de dimetilo con una cantidad inhibitoria mínima de 4,19, 4,92, 17,20 y 31,38 mg, respectivamente, producidos por diferentes cepas de *Pseudomonas* spp. resultaron los compuestos más activos en la reducción del crecimiento del micelio de *S. sclerotiorum* (Giorgio *et al.* 2015). El micelio de *S. sclerotiorum* expuesto a VOCs de *Pseudomonas* spp., mostró anomalías morfológicas de las hifas en comparación con el tratamiento control. De hecho, las hifas observadas al microscopio de luz óptica, aparecían más delgadas y caracterizadas por la presencia de vacuolización del citoplasma en comparación con el control. Además, los VOCs de *Pseudomonas* spp. causaron hifas con numerosas mitocondrias con crestas hipervesiculadas e hipertróficas y multivesiculación y acumulación citoplasmática de material (proteína o lípido).

Cuadro 27: Perfil VOCs a partir de cultivos de cepas antagonistas usando microextracción en fase sólida (SPME)

Tiempo de retención (min)	Peso molecular	Compuesto	% en la muestra ^a	
			TvPs2.4	TvPs1.6
4.96	102.13	Metil butanoato	1.02	0.46
5.15	90.21	Desconocido (C ₄ H ₁₀ S)	1.08	
5.17	74.16	Desconocido (C ₃ H ₆ S)		1.17
5.66	94.2	Dimetil disulfuro	18.65	38.89
5.88	116.16	Isovalerato de metilo	15.41	
5.90	102.13	3-metilbutanoato de metilo		7.52
6.09	130.21	Desconocido (C ₇ H ₁₄ O ₂)	0.38	0.48
6.17	116.16	Butirato de etilo	0.30	
6.26	104.24	Desconocido (C ₅ H ₁₂ S)	1.98	2.14
6.95	130.19	2-metil etil butanoato	0.98	0.67
7.02	158.24	3-metil etil butanoato	7.84	5.28
7.11	152	Desconocido	10.77	
7.12	118.22	Desconocido (C ₅ H ₁₀ OS)		6.73
7.76	146.18	3-metil-1-metil etil butanoato	2.01	2.82
9.01	222	Desconocido	5.86	
9.02	132.61	Desconocido (C ₆ H ₁₂ OS)		7.42
9.10	172.27	2-metil-hexiléster del ácido propanoico		0.62
10.12	158.81	Desconocido (C ₉ H ₁₈ O ₂)		0.36
10.22	136.23	β-Pineno	0.55	
10.66	240	Desconocido	0.55	
10.67	15.24	3-metil-2-metilpropil éster del ácido butanoico		0.80
11.33	136.23	Terpineno	0.84	
11.60	134.21	o-Cymeno	2.65	1.65
11.78	136.24	D-Limoneno	22.57	16.10
11.97	154.25	Eucaliptol	1.93	1.10
12.07	158.24	3-metil butil butanoato	2.15	
12.08	158.81	Desconocido (C ₉ H ₁₈ O ₂)		4.83
14.04	142.24	2-Nonanona	1.03	0.66
15.90	152.23	α-Tujona	0.83	
21.70	555.13	Desconocido (C ₃₅ H ₆₈ O ₄)	0.62	0.31

Los datos son el promedio de 2 cultivos que crecieron en el mismo medio de cultivo. ^aEl porcentaje en la muestra representa la cantidad de cada compuesto en el área total relativa a todos los compuestos enlistados detectados para cada cepa

4.19. EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE RIZOBACTERIA PROMOTORA DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN EL CONTROL DE FITOPATÓGENOS A NIVEL DE CAMPO

El campo experimental presentó suelo franco con 3.15 por ciento de materia orgánica, 4.67 ppm de fósforo, 150 ppm de potasio, conductividad eléctrica 4.20 dS/m y pH 8.22. Durante el experimento las condiciones climáticas fueron de 94.71 por ciento de humedad, temperaturas promedio entre 13.67 y 17.09 °C y precipitaciones totales de 40 mm.

Durante el ensayo de campo, las condiciones climáticas tuvieron una influencia moderada en el desarrollo de la enfermedad. Las plantas de frijol común presentaron pudrición de vainas y partes verdes cubiertas por micelio fúngico blanco de *S. sclerotiorum*. Al momento de la cosecha, todos los tratamientos inoculados presentaron el menor porcentaje de incidencia de la enfermedad causada por el hongo fitopatógeno con diferencias significativas en comparación con el testigo sin tratar (14 por ciento IE).

El análisis de ANOVA de la incidencia de la enfermedad causada por el hongo fitopatógeno determinó que si hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Cuadro 28).

Cuadro 28: Análisis de ANOVA de la incidencia de la enfermedad causada por *S. sclerotiorum* en los tratamientos evaluados

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	P-Value (Sig.)
Inter grupos	322	6	53.6667	51.23	0
Intra grupos	14.6667	14	1.04762		
Total	336.667	20			

El tratamiento *Bacillus* IcBac2.1 + *Rhizobium* E10 presentó el menor porcentaje de incidencia de la enfermedad (dos por ciento DI), seguido de *Rhizobium* M2a (tres por ciento DI) y *Bacillus* IcBac2.1 (cuatro por ciento DI) sin diferencia significativa en comparación con el control químico (dos por ciento DI) (Figura 22).

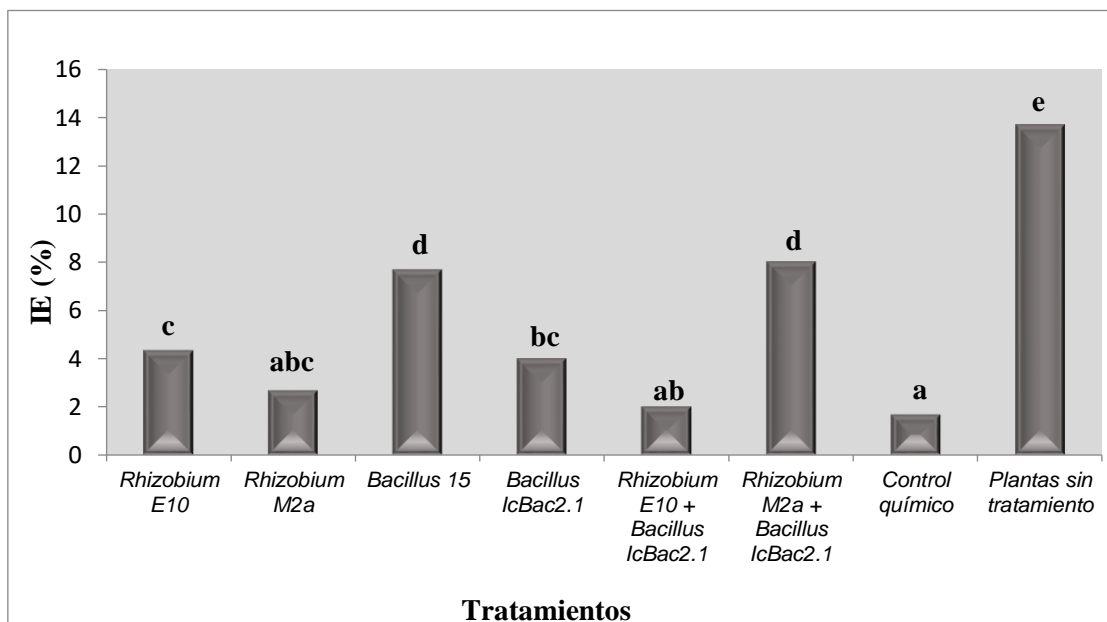


Figura 22: Efecto de rizobacterias sobre la incidencia de la enfermedad causada por *S. sclerotiorum* entre los tratamientos evaluados. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas (p 0.05) en la prueba LSD

La evaluación del crecimiento de las plantas mostró que hubo una respuesta positiva a la inoculación bacteriana, a pesar de las malas condiciones del suelo, por ser alcalino, salino y deficiente en fósforo. Los tratamientos inoculados con cepas bacterianas mostraron mayores porcentajes de germinación en comparación con las plantas no tratadas (71 por ciento). Los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos *Bacillus* IcBac2.1 + *Rhizobium* E10 (84 por ciento) y *Rhizobium* M2a (82 por ciento), similar al control químico (85 por ciento) (Cuadro 19). Las plantas tratadas con *Bacillus* IcBac2.1 + *Rhizobium* E10 también presentaron mayor valor de altura de planta (46 cm), peso fresco (82,88 g) y peso seco (23,43 g) y número de botones florales (17), en comparación con el control sin tratar. El segundo mejor tratamiento correspondió a las plantas inoculadas con la cepa *Bacillus* IcBac2.1 con altura de planta (43,37 cm), peso fresco (114,64 g) y peso seco (26,62 g), y número de botones florales (17).

El análisis de ANOVA del rendimiento de grano determinó que si hubo diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Cuadro 29).

Cuadro 29: Análisis de ANOVA del rendimiento de grano en los tratamientos evaluados

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	P-Value (Sig.)
Inter grupos	2.30E+06	6	383849	3.46	0.0261
Intra grupos	1.55E+06	14	111004		
Total	3.86E+06	20			

El resultado también mostró que todos los tratamientos tuvieron un efecto positivo en el rendimiento de grano con diferencias significativas en comparación con el control sin tratamiento (11 vainas/planta y 883,2 kg/ha) (Cuadro 27). El tratamiento inoculado con *Bacillus* IcBac2.1 + *Rhizobium* E10 presentó el mayor rendimiento (16 vaina/planta y 1717,8 kg/ha), seguido del tratamiento con *Bacillus* IcBac2.1 (18 vaina/planta y 1361,99 kg/ha) (Figura 30).

Cuadro 30: Efecto de *Bacillus* IcBac2.1 en el porcentaje de germinación de semillas y parámetros de crecimiento en plantas de frijol común en condiciones de campo

Tratamientos	%G	AP (cm)	PF (g)	PS (g)	BF	VP	R (kg/ha)
<i>Rhizobium</i> E10	74	36.83	86.80	21.67	22	17 b	1162.41 c
<i>Rhizobium</i> M2a	82	40.43	77.53	21.95	17	16 b	1272.73 c
<i>Bacillus</i> 15	78	39.07	75.98	20.69	18	16 b	1391.16 c
<i>Bacillus</i> IcBac2.1	81	43.37	114.64	26.62	17	18 b	1361.99 c
<i>Bacillus</i> IcBac2.1 + <i>Rhizobium</i> E10	84	46.00	82.28	23.43	17	16 b	1717.82 a
<i>Bacillus</i> IcBac2.1 + <i>Rhizobium</i> M2a	71	43.77	63.45	20.44	17	16 b	1361.90 c
Control químico	85	44.27	82.77	21.11	15	17 b	1430.93 b
Plantas sin tratamiento	73	40.90	69.89	20.05	16	11 a	883.19 d
Mean square	92.613	27.796	700.772	13.794	14.095	11.518	4431.23
F	0.914 ns	0.887 ns	0.544 ns	0.356 ns	0.252 ns	3.412*	64.433**

Los valores promedio seguidos de la misma letra no difieren significativamente en el test LSD. %G Porcentaje de germinación, AP: Altura de la planta, PF: Peso fresco, PS: Peso seco, BF: Número de botones florales, VP Vaina/planta, R: Rendimiento de grano

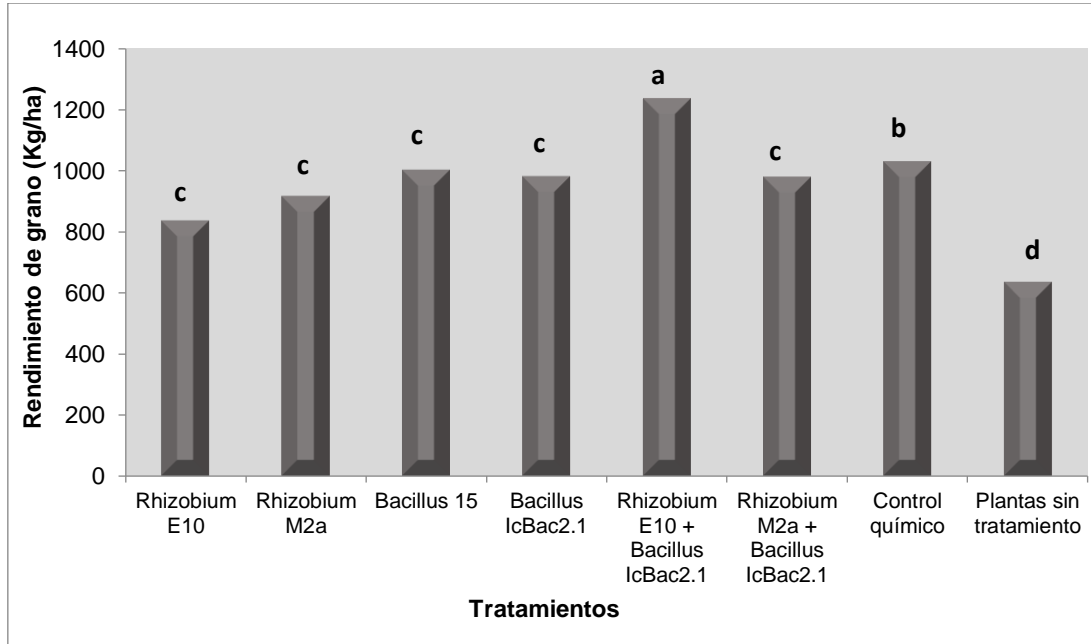


Figura 23: Efecto de rizobacteria sobre el rendimiento de grano entre los tratamientos evaluados. Letras diferentes significan diferencias estadísticamente significativas (p 0.05) en la prueba LSD

La inoculación con *Rhizobium* sp o la combinación de *Rhizobium* sp con *Bacillus* sp redujo la incidencia de la enfermedad causada por *S. sclerotiorum* y mejoró el rendimiento del cultivo de frijol común en condiciones de campo. *Rhizobium* spp. y *Bacillus* spp. han sido ampliamente reportados como controladores de enfermedades fúngicas y mejoradores de la productividad de los cultivos (Gopalakrishnan *et al.* 2015; Cawoy *et al.* 2011).

Todos los tratamientos tuvieron un efecto benéfico en la reducción de la incidencia de la enfermedad, sin embargo, el efecto sinérgico de la inoculación combinada de *Rhizobium* E10 con *Bacillus* IcBac2.1 mostró los mejores resultados cuando se comparó con la inoculación con un solo microorganismo al reducir significativamente la incidencia de la enfermedad causada por *S. sclerotiorum* y mejorar el rendimiento del cultivo de frijol común en condiciones de campo.

Arcos y Zúñiga (2015) reportaron la reducción de la enfermedad causada por *Rhizoctonia solani* utilizando cepas de *Bacillus* aisladas de la rizósfera del cultivo de la papa a partir de

zonas andinas. Se han propuesto varios mecanismos para explicar el efecto inhibitor de *Bacillus* sp del crecimiento micelial de *S. sclerotiorum*, que incluye la producción de metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas, competencia por nutrientes y/o espacio, o combinación de estos mecanismos (Arguelles-Arias *et al.* 2009; Zhang y Xue 2010). Las cepas de *Rhizobium* no solo fijan N en simbiosis con las leguminosas, sino también son importantes promotoras del crecimiento de la planta mediante la producción de fitohormonas y la solubilización de fosfatos (Gopalakrishnan *et al.* 2015).

V. CONCLUSIONES

1. Veintiséis cepas aisladas de la rizosfera de plantas de frijol común mostraron la capacidad de controlar el crecimiento micelial de *Sclerotinia*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* debido a la producción de compuestos orgánicos volátiles y no volátiles. La mayoría de las cepas pudieron suprimir el crecimiento fúngico debido a la presencia de enzimas hidrolíticas, sideróforos y metabolitos extracelulares antibióticos.

2. La secuencia del gen ARNr 16S mostró que las cepas estaban más estrechamente relacionadas con *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Serratia* y *Alcaligenes*.

3. Los metabolitos extracelulares aislados del sobrenadante libre de células se precipitaron a pH 2 y se caracterizaron por ser compuestos anfifílicos mostrando actividad antifúngica en extractos crudos de butanol, acetona y metanol inhibiendo el crecimiento micelial de *R. solani*. Así también, TLC reveló la presencia de compuestos lipídicos cuando se utilizó yodine como reactivo. Este resultado mostró el carácter anfifílico de los compuestos antifúngicos producidos por *Bacillus* IcBac2.1 que probablemente corresponden a lipopéptidos. El extracto crudo de lipopéptidos fue soluble en solventes polares, biosurfactantes y estables a altas temperaturas y pH ácidos.

4. A nivel de matraz se desarrolló la formulación del medio de cultivo por parte de *Bacillus* IcBac2.1 a base de almidón (20 gL^{-1}) y extracto de levadura (8 gL^{-1}) incrementando el peso seco de biomasa celular ($1,44 \text{ g l}^{-1}$), la concentración del crudo de lipopéptidos antifúngicos ($1,76 \text{ g l}^{-1}$) y la actividad antifúngica (26,1 mm de halo de inhibición) contra *R. solani*. Así también, los elementos traza H_3BO_3 , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mostraron un efecto estadísticamente significativo y positivo con un coeficiente mayor a 0.99 en la producción de metabolitos antifúngicos.

5. A nivel de biorreactor de tanque agitado modificado de 3 L de capacidad conectado a dos colectores de espuma con un sistema de recirculación al biorreactor usando la saturación inicial de OD del medio como 100 por ciento y sin control con una velocidad de agitación 400 rpm; velocidad de aireación de 1,0 vvm, 6,8 -7,2 de pH y a 28° C a las 48 horas de

cultivo produjo una alta concentración del crudo de lipopéptidos (11.18 gL^{-1}) y concentración celular (5.18 gL^{-1}).

6. El análisis de LC-MS de la fracción semipurificada del crudo de lipopéptidos mostró cuatro moléculas pequeñas con diferente peso molecular en el rango de 164 a 701 Da.

7. En la evaluación de la eficacia de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal y de sus metabolitos antifúngicos en el control de fitopatógenos a nivel de campo, el tratamiento *Bacillus* IcBac2.1 + *Rhizobium* E10 redujo la incidencia de la enfermedad causada por *S. sclerotiorum* (dos por ciento IE) sin diferencias significativas comparada con el control químico. Así también, las plantas inoculadas con este tratamiento presentaron el mayor rendimiento de grano en la cosecha ($1717,8 \text{ kg/ha}$) con diferencias significativas comparada con las plantas sin tratar ($883,2 \text{ kg/ha}$).

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar el escalamiento de la producción de metabolitos antifúngicos producidos por *Bacillus* sp IcBac2.1 a nivel de biorreactor.
- Estudiar la producción de metabolitos antifúngicos por otros microorganismos aislados a nivel de biorreactor.
- Realizar otros estudios a nivel de campo utilizando biomasa microbiana y metabolitos antifúngicos los cuales presenten un mayor nivel de purificación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahemad M. 2015. Phosphate-solubilizing bacteria-assisted phytoremediation of metalliferous soils: A review. *3 Biotech* 5:111–121. DOI: 10.1007/s13205-014-0206-0.

Ahmed, A; Hasnain, S. 2010. Auxin-producing *Bacillus* sp.: auxin quantification and effect on the growth of *Solanum tuberosum*. *Pure and Applied Chemistry* 82: 313–319. doi: 10.1351/PAC-CON-09-02-06.

Ahmad, M; Ahmad, I; Hilger, TH; Nadeem, SM; Akhtar, MF; Jamil, M; Hussain, A; Zahir, ZA. 2018. Preliminary study on phosphate solubilizing *Bacillus subtilis* strain Q3 and *Paenibacillus* sp. strain Q6 for improving cotton growth under alkaline conditions. *PeerJ* 6:5122. doi: 10.7717/peerj.5122.

Anderson, AJ; Kim, YC. 2020. Insights into plant-beneficial traits of probiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates. *Journal Medical Microbiology* 69: 361-371. DOI: 10.1099/jmm.0.001157.

APHA-AWWA-WEF (American Public Health Association, the American Water Works Association, Water Environment Federation, EEUU). 2012. Standard Methods for the Examination of water and Waste Water. 22 ed. Washington DC. American Public Health Association. ISBN 9780875530130.

APHA (American Public Health Association, EEUU). 2015. Compendium of methods for microbial examination of foods. 5th Edition. American Public Health Association. ISBN 978-0875532738.

Aparna, A; Srinikethan, G; Hegde, S. 2012. Isolation, Screening and Production of Biosurfactant by *Bacillus clausii* 5B. *Research in Biotechnology* 3: 49-56.

Arrebola, E; Tienda, S; Vida, C; De Vicente, A; Cazorla, FM. 2019. Fitness features involved in the biocontrol interaction of *Pseudomonas chlororaphis* with host plants: The case study of PcPCL1606. *Frontier of Microbiology* 10:719. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00719.

- Audenaert, k; Pattery, T; Comelis, P; Hofte, M. 2002. Induction of systemic resistance of *Botrytis cinerea* on tomato by *Pseudomonas aureginosa* 7NSK2: Role of salicylic acid, pyochelin and pyocyanin. *Molecular Plant Microbe Interaction* 15: 1147-1156.
- Balouiri, M; Sadiki, M; Ibsouda SK. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6: 71-79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
- Barnett, H; Hunter, B. 1982. Illustrated genera of imperfect fungi. Third edition. Mineapolis, Minesota. USA. Burgess publishing.
- Bhattacharai, A; Bhattacharai, B; Pandey S. 2015. Variation of soil microbial population in different soil horizons. *Journal of Microbiology & Experimentation* 2: 75-78. DOI: 10.15406/jmen.2015.02.00044.
- Blanco-Vargas, A; Rodríguez-Gacha, LM; Sánchez-Castro, N; Garzón-Jaramillo, R; Pedroza-Camacho, LD; Poutou-Piñales, RA; Rivera-Hoyos, CM; Díaz-Ariza, LA; Pedroza-Rodríguez, AM. 2020. Phosphate-solubilizing *Pseudomonas* sp., and *Serratia* sp., co-culture for *Allium cepa* L. growth promotion. *Heliyon*. 13: 5218. doi: 10.1016/j.heliyon.2020.
- Béchet, M; Caradec, T; Hussein, W; Abderrahmani, A; Chollet, M; Leclère, V; Dubois, T; Lereclus, D; Pupin, M; Jacques, P. 2012. Structure, biosynthesis and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95: 593-600.
- Biessy, A; Novinscak, A; Blom, J; Léger, G; Thomashow, LS; Cazorla, FM; Josic, D; Filion, M. 2019. Diversity of phytobeneficial traits revealed by whole-genome analysis of worldwide-isolated phenazine-producing *Pseudomonas* spp. *Environmental Microbiology* 21:437–455. DOI: 10.1111/1462-2920.14476.
- Calvo, P; Raymundo, LE; Zúñiga, D. 2008. A study of potato (*Solanum tuberosum*) crop rhizosphere microbial population in highland zones. *Ecología Aplicada* 7: 141-148.
- Calvo, P; Zúñiga, D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. Aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada* 9: 31-39.

- Calvo, P; Ormeño, E; Martínez, E; Zúñiga, D. 2010. Characterization of *Bacillus* isolates of potato rhizosphere from andean soils of Peru and their potential PGPR characteristics. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 899-906.
- Camarena, M; Huaranga, A; Mostacero, E; Patricio, J. 2012. Tecnologías para el incremento de la producción del frijol vainita (*Phaseolus vulgaris* L.) para la exportación. Primera edición Universidad Nacional Agraria La Molina. p 13, 72-75. ISBN 978-612-4147-00-5.
- Carissimi, M; Giraud, M; Germani, G; Sand, S. 2009. Antifungal activity of *Bacillus* sp. E164 against *Bipolaris*. *Biociencias* 17: 48-58.
- Castro, R; Álvarez, A; Machado, E; Mendoza, M; Gómez, R; García, P. 2011. Caracterización de una quitinasa extracelular producida por *Serratia* sp. biomi-363706 usando quitina coloidal como sustrato. *Revista Sociedad Química del Perú* 77: 101-108.
- Claus, D; Berkeley, RCW. 1986. Genus *Bacillus*. En *Bergey's Manual of Systematic*. 9 na. Edición. *Bacteriology* (Eds. P. H. Sneath, N. Mair, M. E. Sharpe and J.G. Holt), Baltimore, Williams and Wilkins. p. 1105-1139.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1987. Simbiosis Leguminosa-rizobio. *Manual de Métodos de Evaluación, Selección y Manejo Agronómico*. Colombia. Editado por Rosema & Sylvester - Bradley. p. 1-25.
- Chakraborty, B; Chakraborty, U; Sha, A; Sunar, K; Dey, P. 2010. Evaluation of phosphate solubilizers from soils of North bengal and their diversity analysis. *World Journal of Agricultural Sciences*. 6: 195-200.
- Chen, C; Be'linger, RR; Benhamou, N; Paulitz, TC. 2000. Defense enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 56: 13-23.
- Conn, KL; Nowak, J; Lazarovits, G. 1997. A gnotobiotic bioassay for studying interactions between potato and plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 43: 801-808.
- Cooper, DG; Macdonald, CR; Duff, SJB; Kosaric, N. 1981. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Applied and Environmental Microbiology* 42: 408-412.

Dang, Y; Zhao, F; Liu, X; Fan, X; Huang, R; Gao, W; Wang, S; Yang, C. 2019. Enhanced production of antifungal lipopeptide iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* LL3 through metabolic engineering and culture conditions optimization. *Microbial Cell Factories* 18:68. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1121>.

Defago, G. 1993. 2,4-Diacetylphloroglucinol, a promising compound in biocontrol. *Plant Pathology* 42: 311-312.

Delgado, A. 1985. Systematics of genus *Phaseolus* (Leguminosae) in North and Central America. PhD Thesis, The University of Texas at Austin.

De la Cruz, R; Chávez, C; Hernández, M; Rodríguez, R; Hernández, D; Aguilar, C. 2011. Antagonist capacity of Newly Isolated Strains of *Pseudomonas Fluorescens* against Three Important Phytopathogenic Bacteria. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences* 6: 267-272.

De Zouza, J; De Boer, P; De Waard, T; Van Beek, T; Raaijmakers, JM. 2003. Biochemical, genetics and zoosporicidal properties of cyclic lipopeptide surfactants produce by *Pseudomonas fluorescens*. *Applied Environmental Microbiology* 69: 7161-7172.

Desmyttere, H; Deweer, C; Muchembled, J; Sahmer, K; Jacquin, J; Coutte, F; Jacques, P. 2019. Antifungal activities of *Bacillus subtilis* lipopeptides to two *Venturia inaequalis* strains possessing different tebuconazole sensitivity. *Frontier in Microbiology* 10: 2327. doi:002010.3389/fmicb.2019.02327.

Effmert, U, Kalderás, J, Warnke, R, Piechulla, B. 2012. Volatile mediated interactions between bacteria and fungi in the soil. *Journal of Chemical Ecology* 38, 665–703. doi: 10.1007/s10886-012-0135-5.

Elad, Y; Baker, R. 1985. The role of competition for iron and carbon in suppression of chlamidospore germination of *Fusarium* spp. by *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 75: 1053-1059. doi:10.1094/Phyto-75-1053.

FAOSTAT (Food and Agriculture Organization Corporate Statistical). 2014. Consultado 30 diciembre 2014. Disponible en <http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>.

Felestrino, ÉB; Santiago, IF; Freitas, LS; Rosa, LH; Ribeiro, SP; Moreira, LM. 2017. Plant Growth Promoting Bacteria Associated with *Langsdorffia hypogaea*-Rhizosphere-Host

Biological Interface: A Neglected Model of Bacterial Prospection. *Frontier in Microbiology* 8:1-15. doi: 10.3389/fmicb.2017.00172.

Fonseca de Faria, A; Teodoro-Martinez, D; Nazareno de Oliveira, G; Gontijo, B; Serrano, I; Simone, J; Rogério, M; Eberlin, M; Grossman, M; Alves, L; Durrant, L. 2011. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. *Process Biochemistry* 46: 1951-1957.

Frank, P; Simione, M. 1998. Cryopreservation Manual Nalge Nunc International. M.S. of the American Type Culture Collection (ATCC) in cooperation with Nalge Nunc International Corp. Consultado: el 20 de Mayo del 2016. Disponible en: <https://www.vanderbilt.edu/viibre/CryoPreservationManual.pdf>.

Frankowski, J; Lorito, M; Scala, F.; Schmidt, R; Berg, G; Bahl, H. 2001. Purification and properties of two chitinolytic enzymes of *Serratia plymuthica* HRO-C48. *Archives of Microbiology*. 176:421-426.

French, E; Hebert, T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. Primera edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura San José, Costa Rica. p. 142-153.

Fritze, D. 2004. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. *Phytopathology* 94: 1245-1248.

Fujioka, K; Gotoh, H; Noumi, T; Yoshida, A; Noutoshi, Y; Inagaki, Y; Yamamoto, M; Shiraishi, T; Toyoda, K. 2015. Protection induced by volatile limonene against anthracnose disease in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of General Plant Pathology* 81: 415-419.

Frankowski, J; Berg, G; Bahl, H. 2001. Mechanisms involved in the antifungal activity of the rhizobacterium *Serratia plymuthica*. *Biological control of fungal and plant pathogens IOBC bulletin* 21: 45-50.

Giorgio, A; De Stradis, A; Lo Cantore, P; Iacobellis, NS. 2015. Biocide effects of volatile organic compounds produced by potential biocontrol rhizobacteria on *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontier of Microbiology* 6:1-13. doi: 10.3389/fmicb.2015.01056.

- Glick, B. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41: 109-117.
- Goldstein, A; Rogers, R. 1999. Biomediated continuous release phosphate fertilizer. US Patent 5912398.
- Gordon, S; Weber, R. 1951. Colorimetric estimation of Indolacetic acid. *Plant Physiology* 26: 192-195.
- Gouda, S; Kerry, RG; Das, G; Paramithiotis, S; Shin, HS; Patra, JK. 2018. Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiology Research* 206: 131-140.
- Graham, P. 1988. Biological dinitrogen fixation: Symbiotic. *Principles and Application of soil Microbiology* 322-345.
- Gray, EJ; Smith, DL. 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signaling processes. *Soil Biology and Biochemistry* 37: 395-412.
- Guillen –Cruz, R; Hernández, F; Gallegos, G; Rodríguez, R; Aguilar, C; Padrón, E; Reyes, M. 2006. *Bacillus* spp. Como biocontrolador en un suelo infestado por *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Phytophthora capsici* Leonian y su efecto en el desarrollo y rendimiento del cultivo de chile (*Capsicum annum* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 105 -114.
- Guo, Q; Dong, W; Li, S; Lu, X; Wang, P; Zhang, X; Wang, Y; Ma, P. 2014. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research* 169: 533-540.
- Gyaneshwar, P; Hirsch, AM; Moulin, L; Chen, WM; Elliott, GN; Bontemps, C; Estrada-de Los Santos, P; Gross, E; Dos Reis, FB; Sprent, JI; Young, JP; James, EK. 2011. Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular Plant Microbe Interactions* 24: 1276-88. Doi: 10.1094/MPMI-06-11-0172.
- Haggag, W; Abd-El-Kareem, F; Abou-Hussein, S. 2013. Bioprocessing of *Brevibacillus brevis* and *Bacillus Polymyxa*: a potential biocontrol agent of gray mould disease of

strawberry fruits. *International Journal of Engineering and Innovative Technology* 3:509-518.

Hashidoko, Y; Nakayama, T; Homma, Y; Tahara, S. 1999. Structure elucidation of xanthovacin A, a new antibiotic produced from *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88. *Tetrahedron Letters* 40: 2957-2960.

Helfrich, EJM; Ueoka, R; Dolev, A. et al. 2019. Automated structure prediction of *trans*-acyltransferase polyketide synthase products. *Natural Chemical Biology* 15: 813–821. Doi: 10.1038/s41589-019-0313-7.

Holt, JG; Kreig, NR. 2012. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Baltimore. 11th edition. Eds by William and Wilkins Company Baltimore, USA. p. 459-467.

INEI (Instituto Nacional de Estadística e Informática, Perú). 2014. Consultado 15 enero 2014. Disponible en <http://www.inei.gob.pe/estadisticas/indice-tematico/economia>.

Insam, H, and Seewald, MSA. 2010. Volatile organic compounds (VOCs) in soils. *Biology and Fertility of Soils* 46: 199-213. doi: 10.1007/s00374-010-0442-3.

Jacques, P; Hbid, C; Destain, J; Razafindralambo, H; Paquot, M; De Pauw, E; Thonart, P. 1999. Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 99: 77-79. doi: 10.1385/ABAB:77:1-3:223.

Jayalakshmi, S; Raju, S; Usha, S; Benagi, V; Sreeramulu, k. 2009. *Trichoderma harzianum* L1 as a potential source for lytic enzymes and elicitor of defense response in chickpea (*Cicer arietinum* L.) against wilt disease cause by *Fusarium oxysporum* f.sp. *cicero*. *Australian Journal of Crop Science* 3: 44-42.

Jishma, P; Hussain, N; Chellappan, R; Rajendran, R; Mathew, J; Radhakrishnan, EK. 2017. Strain-specific variation in plant growth promoting volatile organic compounds production by five different *Pseudomonas* spp. as confirmed by response of *Vigna radiata* seedlings. *Journal of Applied Microbiology* 123: 204-216.

Jeun, YC; Park, KS; Kim, WD; Fowler, CH; Kloepper, JW. 2005. Cytological observations of cucumber plants during induced resistance elicited by rhizobacteria. *Biological control* 29:34-42.

Jones, DL; Oburger, E. 2011. Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. Phosphorus in Action. BÃ¼nemann E, Oberson A, Frossard E. New York (US): Springer. p 169-198.

Kadiri, D; Gorle, N; Peetala, K; Peela, S. 2013. Isolation, screening and identification of phosphate solubilizing bacteria from different regions of Visakhapatnam and Araku valley. International Journal of Advanced Biotechnology and Research. 4: 518-526.

Kafle, A; Cope, KR; Raths, R; Krishna Yakha, J; Subramanian, S; Bücking, H; Garcia, K. 2019. Harnessing Soil Microbes to Improve Plant Phosphate Efficiency in Cropping Systems. Agronomy 9: 1-15. Doi: 10.3390/agronomy9030127

Kai, M; Effmert, U; Berg, G; Piechulla, B. 2007. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Archives of Microbiology 187: 351-360.

Kakar, KU; Nawaz, Z; Cui, Z; Almoneafy, AA; Ullah, R; Shu, QY. 2018. Rhizosphere-associated *Alcaligenes* and *Bacillus* strains that induce resistance against blast and sheath blight diseases, enhance plant growth and improve mineral content in rice. Journal Applied of Microbiology 124: 779-796. DOI: 10.1111/jam.13678.

Kalbe, C; Marten, P; Berg, G. 1996. Members of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape. Microbiological Research 151: 4433-4400.

Kang, BR; Yang, KY; Cho, BH; Han, TH; Kim, IS; Lee, MC; Anderson, AJ; Kim, YC. 2006. Production of indole-3-acetic acid in the plant-beneficial strain *Pseudomonas chlororaphis* O6 is negatively regulated by the global sensor kinase GacS. Current Microbiology 52: 473-476. DOI: 10.1007/s00284-005-0427-x.

Khalid, A; Arshad, M; Zahir, ZA. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. Journal of Applied Microbiology 96: 473-488.

Kim, P; Bai, H; Bai, D; Chae, H; Chun, S; Kim, Y; Park, R; Chi, Y. 2004. Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. Journal of Applied Microbiology 97: 942-949. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02356.x

- Kim, B; Moon, S; Hwang, B. 1999. Isolation, identification and antifungal activity of a macrolide antibiotic, oligomycin A, produced by *Streptomyces libani*. Canadian Journal of Botany 77: 850-858.
- Kloepper, JW; Rodriguez-Ubana, R; Zehnder, GW; Murphy, JF; Sikora, E; Fernández, C. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. Australasian Plant Pathology 28:21-26.
- Kloepper, J; Schroth, M. 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proceedings of the 4th international conference on plant pathogenic bacteria. Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, INRA, Angers, France. p. 879-882.
- Korpi, A, Järnberg, J, Pasanen, AL. 2009. Microbial volatile organic compounds. Crit. Rev. Toxicol. 39: 139-193. doi: 10.1080/10408440802291497.
- Lee, YK; Yoon, BD; Yoon, JH; Lee, SG; Song, JJ; Kim, JG; Oh, HM; Kim, HS. 2007. Cloning of *srfA* operon from *Bacillus subtilis* C9 and its expression in *E. coli*. Applied Microbiology Biotechnology 75: 567–572. doi:10.1016/j.biortech.2012.02.057.
- Li, S; Xu, J; Fu, L; Xu, G; Lin, X; Qiao, J; Xia, Y. 2022. biocontrol of wheat crown rot using *Bacillus halotolerans* QTH8. Pathogens 11:1-15. <https://doi.org/10.3390/pathogens11050595>.
- Li, Q; Ning, P; Zheng, I; Huang, J. 2010. Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. Postharvest Biology and Technology 58:157-165.
- Lim, HS; Kim, YS; Kim, SD. 1991. *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. Applied and Environmental Microbiology 57:510-516.
- Loper, J; Buyer, J. 1991. Siderophores in microbial interactions on plant surfaces. Molecular Plant - Microbe Interaction 4: 5-13.
- Loper, J; Henkels, M. 1997. Availability of iron to *Pseudomonas fluorescens* in rhizosphere and bulk soil evaluated with an ice nucleation reporter gene. Applied and Environmental Microbiology 63: 99-105.

Louden, BC; Haarmann, D; Lynne, AM. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology & Biology Education* 12(1):51-53.

M'Piga, P; Belanger, RR; Paulitz, TC; Benhamou, N. 1997. Increased resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants treated with the endophytic bacterium *Pseudomonas fluorescens* strain 63-28. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 50:301-320.

Meena, KR; Tandon, T; Sharma, A; Kanwar, SS. 2018. Lipopeptide antibiotic production by *Bacillus velezensis* KLP2016. *Journal Applied Pharmaceutical Science* 8: 091-098. doi: 10.7324/JAPS.2018.8313.

Meena, KR; Kanwar, SS. 2015. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. doi: 10.1155/2015/473050.

Memenza-Zegarra, M; Zúñiga-Dávila, D. 2021. Bioprospection of native antagonistic rhizobacteria from the Peruvian Coastal ecosystems associated with *Phaseolus vulgaris*. *Current Microbiology* 78: 1418-1431. doi: 10.1007/s00284-021-02388-x.

Memenza-Zegarra, M; Ormeño-Orrillo, E; Zúñiga-Dávila, D. 2022. Draft Genome Sequence of *Bacillus halotolerans* IcBac2.1, a Strain with Potential as a Phytopathogen Control Agent. *Microbiology Resource Announcements* vol. 11 N° 11. Doi: 0.1128/mra.00857-22.

Merck. 1998. Manual de Medios de Cultivo. E. Merck, Darmstadt, Alemania. 364 p.

MINAGRI (Ministerio del Ambiente) 2018. Mapa nacional de ecosistemas del Peru. Memoria descriptiva. <https://sinia.minam.gob.pe/normas/aprueban-mapa-nacional-ecosistemas-memoria-descriptiva-las-definiciones>. Revisado 21 diciembre 2018.

MINAGRI (Ministerio del Ambiente) 2021. Elaboración de la línea de base de la diversidad del frijol con fines de bioseguridad: prospección de la diversidad, estudio socioeconómico, ecológico de organismos y microorganismos, flujo de genes y sistematización.

Naik, PR; Sakthivel, N. 2006. Functional characterization of a novel hydrocarbonoclastic *Pseudomonas* sp. strain PUP6 with plant-growing-promoting traits and antifungal potential. *Research in Microbiology* 157: 538-546.

- Nautiyal, C. 1999. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiology Letters* 170: 65-270.
- Nguyen, C; Yan, W; Le Tacon, F; Lapeyrie, F. 1992. Genetic variability of phosphate solubilizing activity by monocaryotic and dicaryotic mycelia of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orton. *Plant Soil*. 143: 193-199.
- Osorio, N. 2007. A review on beneficial effects of rhizosphere bacteria on soil nutrient availability and plant nutrient uptake. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 60: 3621 - 3643.
- Palleroni, NJ. 1984. Pseudomonadaceae. In: Tansill B, editor. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Md: Williams & Wilkins. p. 141–199.
- Parhamfar, M; Badoei, A; Parhamfar, M; Fahimi, S. 2016. Purification and characterization of an extracellular phosphatase enzyme from *Bacillus* spp. *Journal of Cell and Molecular Research* 8: 90–97.
- Pereira, J; Queiroz, R; Charneau, R; Felix, C; Ricart, C; Lopes da Silva, F; Steindorff, A; Ulhoa, C; Noronha, E. 2014. Analysis of *Phaseolus vulgaris* Response to Its Association with *Trichoderma harzianum* (ALL-42) in the Presence or Absence of the Phytopathogenic Fungi *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*. *Plos One* 9: 1-23.
- Podile, AR, Kishore, GK. 2007. Plant growth-promoting rhizobacteria. In: Gnanamanickam, S.S. (eds) *Plant-Associated Bacteria*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4538-7_6.
- Ragab, MMM; Saber, MM; El-Morsy, SA; Abd El-Aziz, ARM. 2012. *In Vitro* Evaluation of Some Fungicides Alternatives Against *Fusarium Oxysporum* the Causal of Wilt Disease of Pepper (*Capsicum annum* L.). *International Journal of Agriculture and Forestry* 2: 70-77.
- Reyes, I; Valery, A. 2007. Efecto de la fertilidad del suelo sobre la microbiota y la promoción del crecimiento (*Zea mays* L.) con *Azotobacter* spp. *Bioagro* 19: 117-126.
- Rivas, R; Peix, A; Mateos, P; Trujillo, F; Martínez-Molina, E; Velazqueze, E. 2006. Biodiversity of populations of phosphate solubilizing rhizobia that nodulates chickpea in different spanish soil. *Plant and soil* 287: 23-33.

Rizzi, A; Roy, S; Bellenger, JP; Beauregard, PB. 2019. Iron homeostasis in *Bacillus subtilis* require siderophore production and biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology 85: 1217. doi: 10.1128/AEM.02439-18.

Rogel, MA; Ormeño-Orrillo, E; Martínez-Romero, E. 2011. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to Legumes. Systematic and Applied Microbiology 34:96-104. Doi: 10.1016/j.syapm.2010.11.015.

Romero, D; Brom, S. 2004. The symbiotic plasmid of the Rhizobiaceae. In Plasmid biology. Funnell, B.E., Phillips, G.J. (eds). Washington: ASM Press, pp. 271-290.

Ryu, R; Patten, C. 2008. Aromatic amino acid-dependent expression of indole-3-pyruvate decarboxylase is regulated by 4 TyrR in *Enterobacter cloacae* UW5. American Society for Microbiology 190 (Suppl 21): 1-35.

Sagar, K; Bashir, Y; Phukan, MM; Konwar, BK. 2013. Isolation of lipolytic bacteria from waste contaminated soil: A study with regard to process optimization for lipase. International Journal of Scientific & Technology Research 2: 214-218.

Sanjuán, J. 2007. Introducción. En Biofertilizantes en Iberoamérica: Una visión técnica, científica y empresarial. Eds. M Izaguirre, C Labandera y J Sanjuán. 1era Edición D Internacional S.A. D T 2166 y M G. Monte-Uruguay. p. 3.

Satapute, PP; Olekar, HS; Shetti, AA; Kulkarni, AG; Hiremath, GB; Patagundi, BI; Shivsharan, CT; Kaliwal, BB. 2012. Isolation and characterization of nitrogen fixing *Bacillus subtilis* strain As-4 from agricultural soil. International Journal of Recent Scientific Research 3: 762 – 765.

Sayyed, RZ; Chincholkar, SB. 2010. Growth and siderophores production in *Alcaligenes faecalis* is regulated by metal ions. Indian Journal of Microbiology 50: 179 -182. DOI: 10.1007/s12088-010-0021-1.

Sayyed, RZ; Gangurde, NS; Patel, PR; Joshi, SA; Chincholkar, SB. 2010. Siderophore production by *Alcaligenes faecalis* and its application for growth promotion in arachis hypogaea. Indian Journal of Microbiology 9: 302-307. DOI: 10.1089/hum.2009.157.

Shameer, S; Prasad, TNVKV. 2018. Plant growth promoting rhizobacteria for sustainable agricultural practices with special reference to biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation* 84: 603–615. doi: 10.1007/s10725-017-0365-1.

Shan, SJ; Wang, WW; Song, CX; Wang, MG; Sun, BJ; Li, Y. 2019. The symbiotic bacteria *Alcaligenes faecalis* of the entomopathogenic nematodes *Oscheius* spp. Exhibit potential biocontrol of plant-and entomopathogenic fungi. *Microbial Biotechnology* 12: 459-471. DOI: 10.1111/1751-7915.13365.

SENASA (Servicio Nacional de Sanidad Agraria, Perú). 2012. Consultado 20 junio 2012. Disponible en <http://www.senasa.edu.pe>.

SENAMHI (Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología del Perú). 2015. Disponible en: <http://www.senamhi.gob.pe/>.

Sihem, B; Rafik, E; Mathieu, F; Mohamed, C; Lebrihi, A. 2011. Identification and partial characterization of antifungal and antibacterial activities of two *Bacillus* sp. strains isolated from salt soil in Tunisia. *African Journal of Microbiology Research* 5: 1599-1608.

Silo-Suh, L; Stabb, E; Raffael, S; Handelsman, J. 1994. Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. *Current Microbiology* 37: 6 -11.

Singh, PP; Shin, YC; Park, CS; Chung, YR. 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* 89:92-99.

Slama, HB; Cherif-Silini, H; Chenari Bouket, A; Qader, M; Silini, A; Yahiaoui, B; Alenezi, FN; Luptakova, L; Triki, MA; Vallat, A; Oszako, T; Rateb, ME; Belbahri, L. 2019. Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Frontier in Microbiology* 9: 1-24. doi: 10.3389/fmicb.2018.03236.

Solanki, M; Kundu, BS; Nehra, K. 2018. Molecular diversity of phosphate solubilizing bacteria isolated from the rhizosphere of chickpea, mustard and wheat. *Annals of Agricultural Sciences* 16: 458–463. doi: 10.1016/j.aasci.2018.05.007.

Spaepen, S; Vanderleyden, J; Remans, R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signalling. *FEMS Microbiology Reviews* 31 (Suppl 4): 425-448.

- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology* 56: 845-857. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x.
- Stella, M; Suhaimi, M. 2010. Selection of suitable growth medium for free-living diazotrophs isolated from compost. *Journal Tropical of Agriculture and Food Science* 38: 211-219.
- Stella, M; Halimi, M.S. 2015. Gluconic acid production by bacteria to liberate phosphorus from insoluble phosphate complexes. *Journal of Tropical Agriculture and Food Science* 43: 41–53.
- Subbalaxmi, S; Kannan, N; Aleksandra, N; Vytla Ramachandra, M. 2021. Mathematical modeling and simulation of newly isolated *bacillus cereus* M1GT for tannase production through semi-solid-state fermentation with agriculture residue *triphala*. *South African Journal of Chemical Engineering* 35: 89-97.
- Sudarshan, SR; Mannivannan, A; Narendhirakannan, RT. 2014. Screening of cellulase producing microorganisms from lake area containing water hyacinth for enzymatic hydrolysis of cellulose. *Journal of Advance Scientific Research* 5: 23-30.
- Suganya, R. 2013. Screening optimization and production of biosurfactants from *Bacillus* and *Pseudomonas* species. *International Journal of Current Pharmaceutical Research* 5: 19-23.
- Sutyak, KE; Wirawan, RE; Aroutcheva, AA; Chikindas, ML. 2008. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilosin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal Applied Microbiology* 104: 1067-74. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03626.x.
- Tan, Z; Lin, B; Zhang, R. 2013. A novel antifungal protein of *Bacillus subtilis* B25. *Springer Plus* 2: 543.
- Tilocca, B.; Cao, A.; Migheli, Q. 2020. Scent of a killer: Microbial volatilome and its role in the biological control of plant pathogens. *Frontier in Microbiology* 11: 1-13. doi: 10.3389/fmicb.2020.00041.

Toral, L; Rodríguez, M; Béjar, V; Sampedro, I. 2018. Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Frontier in Microbiology* 9: 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2018.01315.

Torres, F; Berrú, M. 2012. Frijol Caupí Manual de Manejo para producir semilla. Fundación Romero www.fundacionromero.org.pe.

Versalovic, J; Koeuth, T; Lupski, JR. 1991. Distribution of repetitive ADN sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research* 19: 6823-6831.

Vespermann, A; Kai, M; Piechulla, B. 2007. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Applied and Environmental Microbiology* 73:5639-5641.

Van Peer, R; Niemann, GJ; Schippers, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology* 81: 728-734.

Venant, N; Pascal, K; Ernest, S. 2013. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of Tomato and their *in vitro* antagonistic effects against phytopathogenic fungi. *Global Advance Research Journal of Microbiology* 2: 65-71.

Vollenbroich, D; Ozel, M; Vater, J; Kamp, RM; Pauli, G. 1997. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals* 25: 289-297.

Wagi, S; Ahmed, A. 2019. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA. *PeerJ*. 23:7258. doi: 10.7717/peerj.7258.

Wheatley, RE. 2002. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. A. van Leeuw. *Journal of Microbiology* 81: 357-364.

Yáñez-Mendizábal, V; Viñas, I; Usall, J; Torres, R; Solsona, C; Teixidó, N. 2012. Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control* 60: 280-289.

Yang, YL; Xu, Y; Straight, P. *et al.* 2009. Translating metabolic exchange with imaging mass spectrometry. *Nature Chemical Biology* 5: 885–887. Doi: 10.1038/nchembio.252.

Yokoyama, SI; Adachi, Y; Asakura, S; Kohyama, E. 2013. Characterization of *Alcaligenes faecalis* strain AD15 indicating biocontrol activity against plant pathogens. *Journal of General and Applied Microbiology* 59: 89-95. Doi: 10.2323/jgam.59.089.

Youseif, SH; Abd El-Megeed, FH; Mohamed, AH; Ageez, A; Veliz, E; Martínez-Romero, E. 2021. Diverse *Rhizobium* strains isolated from root nodules of *Trifolium alexandrinum* in Egypt and symbiovars. *Systematic and Applied Microbiology* 44: 126156. Doi: 10.1016/j.syapm.2020.126156.

Yuan, C; Flanagan, S. 2003. The mechanism underlining the efficacy of a novel biofungicide, Serenade in disease control. *Phytopathology* 90: S87.

Zhang, H; Godana, EA; Sui, Y; Yang, Q; Zhang, X; Zhao, L. 2020. Biological control as an alternative to synthetic fungicides for the management of grey and blue mould diseases of table grapes: a review. *Critical Review in Microbiology* 46: 450-462. doi: 10.1080/1040841X.2020.1794793.

Zhu, Z; Zhang, GY; Luo, Y; Ran, W; Shen, QR. 2012. Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soybean flour and rice straw as the substrate. *Bioresource Technology* 112: 254-260.

Zúñiga, D. 2012. Manual de Microbiología Agrícola: *Rhizobium*, PGPRs, Indicadores de Fertilidad e Inocuidad. In: Ed. Olaya M. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú. p. 53-55. ISBN 978-612-4147-04-3.