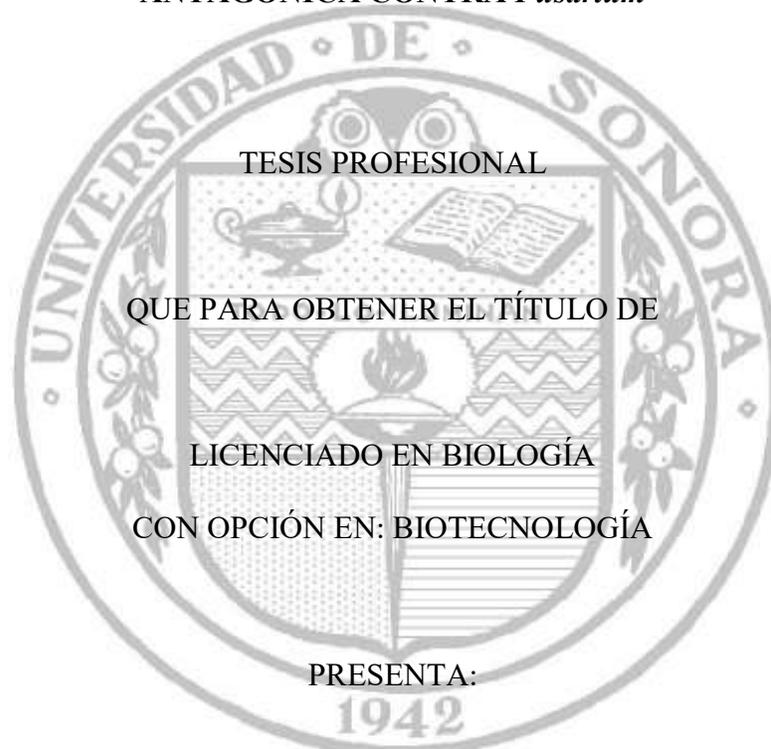


UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS

CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEL GÉNERO *Bacillus* AISLADAS DE SUELOS DE MILPA DEL ALTO MEZQUITAL HIDALGO CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA CONTRA *Fusarium*



TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

CON OPCIÓN EN: BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

1942

SHARON PALAFOX FÉLIX

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMATO DE APROBACIÓN

Los miembros del Comité de Tesis designado para revisar la Tesis de Sharon Palafox Félix la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito para obtener el Título de Licenciado en Biología con Opción en Biotecnología.

Dra. Rosina Cabrera Ruiz
Directora de Tesis

Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán
Sinodal Secretario

M.C. Nolberta Huerta Aldaz
Sinodal

Dra. María Magdalena Ortega Nieblas
Suplente

DEDICATORIA

A mi padre, Eduardo, por su sacrificio y esfuerzo para siempre darme todo lo necesario para cumplir con mis objetivos a lo largo de mi vida, nunca dejaré de agradecer todas esas deudas apuntadas en hielo.

A mi madre, Leticia, gracias por apoyarme, cuidarme y siempre acompañarme en mis noches de desvelo haciéndolas más amenas.

A mis hermanas, Alexis y Michel, por su cuidado, apoyo y cariño a lo largo de mi vida.

A mi familia, por su apoyo y cariño incondicional y haber forjado lo que soy ahora.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad de Sonora** por brindarme las herramientas y tutores necesarios para desarrollarme profesional y académicamente.

Al **Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C.**, por permitirme desarrollar mi tesis de licenciatura en sus instalaciones y, por el apoyo económico brindado en el Programa de Iniciación para la Formación de Capital Humano de Alto Nivel 2018.

Al **Centro de Investigación y Desarrollo en Agrobiotecnología Alimentaria**, principalmente al proyecto FOMIX Hidalgo 2015-01-267837, por la beca brindada para la realización de este trabajo.

A mi directora de tesis, la **Dra. Rosina Cabrera Ruiz**, por sus enseñanzas, consejos y paciencia a través de la realización del presente trabajo, además de brindarme su tiempo, apoyo y amistad. Gracias por guiarme en mis comienzos dentro del ámbito de la investigación y la ciencia.

A la **Dra. Mayra de la Torre**, responsable del Laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos del CIAD, por las facilidades proporcionadas que permitieron la realización del presente trabajo de tesis.

A los miembros del comité de tesis, **Dr. Luis Enrique Gutiérrez Millán, M.C. Nolberta Huerta Aldaz** y la **Dra. María Magdalena Ortega Nieblas**, por su asesoría, recomendaciones y tiempo en la revisión del presente documento.

Al **Dr. Eneas Aguirre von Wobeser** por su ayuda y colaboración en la elaboración del árbol filogenético de las especies de *Bacillus* en el presente trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos de CIAD: **Héctor García, Abel Verdugo, Dr. Jorge Rocha, Gabriela Gastelum, Daniel Solís, Manuel Corral, Jorge Peralta, Katia Balderrama, Nedie Chávez y Luis Armenta**. Gracias a todos por su apoyo, amistad y compañía, a lo largo de estos dos años, serán buenos recuerdos los que permanecerán dentro del laboratorio, me alegra hayamos coincidido.

A mis amigos **Martha, Gloria, Quevedo, Lafontaine, Joanna, Alondra, Diana, Gema, Karen, Germán, Carrasco, Perla** y **Michel** (los PW), porque llegaron en el momento que menos esperaba “*Amistad es amigo*”, gracias por todo su apoyo.

A **Julián Ortega, Oscar Tanahara** y mi hermana, **Alexis Palafox**, gracias por ayudarme, animarme a seguir y siempre creer en mí.

A mis mejores amigas **Gabriela Ruffo** e **Ytzayanna Peñuñuri**, que me acompañaron desde el primer día de la carrera, por su incomparable amistad y apoyo durante todo este trayecto, han sido más que un pilar en mi vida. Pronto este capítulo termina y juntas lo estamos logrando.

Finalmente, a mi mejor amigo, **Julio Camargo**, gracias por acompañarme todos estos años, darme tu cariño y apoyo incondicional. Pero más que nada, gracias por convertirme en una mejor persona.

Y todos aquellos compañeros que de una u otra manera estuvieron presentes a lo largo de mi trayecto en la Universidad de Sonora. Gracias.

CONTENIDO

	Página
FORMATO DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	vi
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMEN	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II. 1. Suelo y su Composición	3
II. 2. Ecología Microbiana	4
II. 3. Género <i>Bacillus</i>	5
II.3.1. Funciones del género <i>Bacillus</i> en el suelo	7
II. 4. Hongos Fitopatógenos	9
II. 5. Control Biológico	10
II. 6. Sistemas Agrícolas Convencionales y de Conservación	11
II. 7. Sistema Agrícola Milpa: Ejemplo de Agricultura de Conservación	12
III. JUSTIFICACIÓN	16
IV. HIPÓTESIS CIENTÍFICA	17
V. OBJETIVOS	18
V. 1. Objetivo General	18
V. 2. Objetivos Particulares	18
VI. METODOLOGÍA	19
VI. 1. Descripción del Sitio de Estudio y Muestreo	19
VI. 2. Aislamiento de Bacterias Formadoras de Esporas	20
VI. 3. Descripción de Morfología Macroscópica y Microscópica	21
VI. 4. Determinación de Actividad Proteolítica Extracelular	21
VI. 5. Ensayos de Movilidad: <i>Swimming</i> y <i>Swarming</i>	22
VI. 6. Ensayos de Desafíos para Evaluar Actividad Antagónica <i>in vitro</i>	22
VI. 7. Identificación Molecular de Bacterias y Hongos	23
VI.7.1. Extracción del ADN genómico	23
VI.7.2. Amplificación del gen 16S ARNr y 5.8S ARNr mediante	24
PCR	
VI. 8. Cinéticas de Crecimiento	27

VI.8.1. Análisis de datos	27
VII. RESULTADOS	28
VII. 1. Fertilidad y Salinidad del Suelo de Milpa de El Boxo Hidalgo	28
VII. 2. Aislamiento y Caracterización Morfológica de los Aislados Bacterianos	29
VII. 3. Fenotipo de Proteasas Extracelulares de los Aislados Bacterianos	33
VII. 4. Fenotipo de Movilidad de los Aislados bacterianos: <i>Swimming</i> y <i>Swarming</i>	34
VII. 5. Actividad Antagónica de los Aislados Bacterianos contra <i>Fusarium</i> sp.	36
VII. 6. Identificación Molecular de los Aislados Bacterianos	39
VII. 7. Cinética de Crecimiento de <i>Bacillus mycoides</i> Cepa Bx10	44
VIII. DISCUSIÓN	46
VIII. 1. Fertilidad y Salinidad del Suelo de Milpa de El Boxo Hidalgo	46
VIII. 2. Aislamiento y Caracterización Morfológica de los Aislados Bacterianos	49
VIII. 3. Fenotipo de Proteasas Extracelulares de los Aislados Bacterianos	49
VIII. 4. Fenotipo de Movilidad de los Aislados Bacterianos: <i>Swimming</i> y <i>Swarming</i>	50
VIII. 5. Actividad Antagónica de los Aislados Bacterianos contra <i>Fusarium</i> sp.	51
VIII. 6. Identificación Molecular de los Aislados Bacterianos	53
VIII. 7. Cinética de Crecimiento de <i>Bacillus mycoides</i> Cepa Bx10	55
IX. CONCLUSIONES	56
X. RECOMENDACIONES	58
XI. LITERATURA CITADA	59

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I	Condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S ARNr.	25
Tabla II	Condiciones de PCR para la amplificación del gen 5.8S ARNr.	26
Tabla III	Parámetros fisicoquímicos de fertilidad y salinidad del suelo. M.O.= Materia orgánica, pH= Potencial de hidrógeno, CE= Conductividad eléctrica, N-NO ₃ = Nitrógeno de nitratos, P-PO ₄ = Fósforo de fosfatos, RAS= Relación/adsorción de sodio, NO ₃ = Nitratos, PO ₄ = Fosfatos, CO ₃ = Carbonato.	29
Tabla IV	Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas de suelos de Milpa de la comunidad del Boxo (Bx) del Estado de Hidalgo.	31
Tabla V	Identificación molecular de las cepas bacterianas aisladas mediante la secuenciación del gen 16S ARNr. Fuente: BLAST, GenBank.	41
Tabla VI	Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de <i>Bacillus mycoides</i> cepa Bx10 a diferentes temperaturas. μ = Velocidad específica de crecimiento (h ⁻¹), X _M = Biomasa máxima, R ² = Coeficiente de determinación.	45

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Sistema milpa en El Boxo, Hidalgo.	14
Figura 2	Sitio de muestreo: El Boxo, Alto Mezquital Hidalgo.	19
Figura 3	Esquema de toma de la muestra de suelo.	20
Figura 4	Diseño de pruebas de antagonismo entre bacterias y hongos en placas Petri con medio PDA. a) Siembra de bacteria por estría. b) Siembra de bacteria por gota.	23
Figura 5	Diagrama triangular para determinación de la textura de suelos. Clasificación U.S.D.A. Fuente: Agenda de Campo para el Estudio del Suelo (Porta-Casanellas y López-Acevedo, 2005).	28
Figura 6	Prueba proteolítica en Agar-leche. a. Cepa Bx1 con actividad proteolítica positiva. b. Cepa Bx3: positiva. c. Cepa Bx4: positiva. d. Cepa Bx5: parcial. e. Cepa Bx6: positiva. f. Cepa Bx7: negativa. g. Cepa Bx8: positiva. h. Cepa Bx9: parcial. i. Cepa Bx10: positiva. j. Cepa Bx11: negativa. k. Cepa Bx12: positiva. l. Cepa Bx13: negativa.	34
Figura 7	Fenotipo de <i>swimming</i> de los aislados bacterianos.	35
Figura 8	Fenotipo de <i>swarming</i> de los aislados bacterianos.	35

Figura 9	Morfología macroscópica y microscópica de <i>Fusarium</i> sp. en medio PDA. a. Crecimiento de <i>Fusarium</i> sp. en placa. b. y c. Observación microscópica con colorante azul de algodón.	36
Figura 10	Ensayos de antagonismo en agar PDA entre cepas aisladas y el hongo fitopatógeno de <i>Fusarium</i> sp. a. Cepa Bx1. b. Cepa Bx3. c. Cepa Bx4. d. Cepa Bx8. e. Cepa Bx10. f. Cepa Bx13. g. Placa control.	37
Figura 11	Ensayos de antagonismo en agar PDA entre cepas aisladas y el hongo fitopatógeno de <i>Fusarium</i> sp. a. Cepa Bx3. b. Cepa Bx4. c. Cepa Bx6. d. Cepa Bx7. e. Cepa Bx8. f. Cepa Bx10. g. Bx13. h. Placa control.	38
Figura 12	Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación del fragmento de 350 pb del gen 16S ARNr. Carril 1: Marcador molecular 1 Kb. Carril 6: Cepa Bx7. Carril 9: Cepa Bx11. Carril 12: Control negativo. Amplificación con los iniciadores universales 515F - 806R.	39
Figura 13	Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación del fragmento de 1500 pb de la cepa Bx10. Amplificación con los iniciadores 27F y 1492R.	40
Figura 14	Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% mostrando la amplificación del fragmento de 1.500 pb del gen 16S ARNr. Carril 1: Marcador molecular 1 Kb. Carril 3: Cepa Bx4. Carril 5: Cepa Bx6. Carril 7: Cepa Bx8. Carril 9: Cepa Bx12. Carril 11: Control negativo. Amplificación con los iniciadores 27F y 1492R.	40

Figura 15	Árbol filogenético del gen 16S ARNr de los aislados de suelos de milpa del Boxo Hidalgo, pertenecientes al género <i>Bacillus</i> .	43
Figura 16	Curvas de crecimiento de <i>Bacillus mycoides</i> a diferentes temperaturas ajustado al modelo exponencial.	45

RESUMEN

La *milpa* es resultado de la conservación de prácticas tradicionales que mantienen la diversidad de microorganismos endémicos del suelo donde pueden desempeñar funciones específicas como el control de enfermedades en plantas, constituyendo una alternativa ecológica al uso de químicos en cultivos. *Bacillus* es un género abundante en el suelo que se encuentra entre los principales agentes biológicos que controlan enfermedades en la agricultura, ya que sus especies desarrollan mecanismos de antagonismo y resistencia a distintos ambientes, conferida por la producción de esporas resistentes. El objetivo del presente estudio fue aislar, caracterizar e identificar especies benéficas pertenecientes a *Bacillus* provenientes de suelos de milpa de El Boxo, Hidalgo. Se aislaron doce cepas bacterianas, de las cuales seis correspondieron a especies de *Bacillus* y una a *Paenibacillus*. Las cepas Bx3 y Bx6 identificadas como *B. pumilus* presentaron movilidad por *swimming* y *swarming*, mientras que la cepa Bx8 sólo presentó *swimming*. Todas las cepas identificadas, a excepción de *Paenibacillus* Bx7, mostraron actividad proteolítica, de las cuales *B. pumilus* (Bx3 y Bx6), *Paenibacillus* (Bx7) y *B. mycoides* (Bx10) presentaron actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *Fusarium graminearum*. Por otra parte, Bx5 y Bx9 identificadas como *B. simplex*, no presentaron actividad antagónica, pero podrían estar relacionadas con la promoción de crecimiento en plantas, siendo un factor importante en la protección de la milpa de El Boxo. *B. mycoides* Bx10 representa una cepa potencial para ser utilizada en campo debido a su alta actividad antifúngica. De acuerdo a su caracterización cinética en medio de esporulación, esta cepa presentó una temperatura óptima de crecimiento de 30°C y producción de endosporas a partir de las 28 h. La información generada en este estudio podrá ser utilizada para el diseño de biofertilizantes y biopesticidas, así como para generar estrategias de aplicación en sistemas agrícolas en el estado de Hidalgo.

I. INTRODUCCIÓN

La agricultura de conservación consiste en un sistema de producción agrícola sustentable que comprende un conjunto de prácticas agronómicas, cuyas técnicas de cultivo y manejo del suelo lo protegen de la erosión y la degradación, manteniendo su calidad y biodiversidad (Gil-Ribes et al., 2017). La milpa, también llamado “sistema de referencia”, representa un ejemplo de agricultura de conservación, ya que es resultado del uso de prácticas tradicionales de indígenas y campesinos. El sistema milpa consiste en un policultivo que contempla usualmente la asociación de cultivos como el maíz, frijol y calabaza y en donde se aprovecha el espacio cultivado, a la vez que se disminuye el uso de insumos agroquímicos y de maquinaria de siembra/cosecha, lo que conserva la diversidad microbiana endémica (Sánchez-Morales y Romero-Arenas, 2016).

El comportamiento microbiano y sus efectos sobre el suelo se ve influenciado por las características físicas y químicas de éste. Los microorganismos son un elemento esencial en el suelo donde se establecen interacciones unos con otros para desempeñar funciones específicas como el reciclaje de nutrientes, además de regular la disponibilidad de elementos benéficos mediante simbiosis para incrementar la capacidad de las plantas para adquirir nitrógeno y fósforo y algunos hongos y bacterias resultan ser agentes de biorremediación en ambientes contaminados o agentes de control de fitopatógenos (Frioni, 2005). En este sentido, la utilización de microorganismos para el control de enfermedades de las plantas constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sustentable, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y productos químicos que ocasionan la contaminación de los suelos y agua (Whipps, 2001).

Fusarium spp. representan una de las principales comunidades de hongos fitopatógenos que afectan a los cultivos de maíz a nivel mundial. Este hongo puede ocasionar enfermedades en raíz, vástago, hojas y fruto, provocando enormes pérdidas económicas. Además, *Fusarium* spp. producen y acumulan micotoxinas directamente sobre los granos, lo cual afecta la calidad del producto y puede constituir un problema relevante de salud para los humanos y el ganado.

En el estado de Hidalgo, México, el maíz es uno de los principales cultivos de riego y de temporal, ubicándose el estado en noveno lugar a nivel nacional en cuanto a mayor producción de grano de maíz (García, 2018). Dicha actividad puede verse afectada por el hongo patógeno de plantas *Fusarium* que se encuentra naturalmente en el suelo, con una distribución cosmopolita y que se concentra principalmente en las zonas maiceras, por ello resulta ser el principal patógeno que afecta a los cultivos de maíz. Algunas especies que se han aislado a partir de mazorcas de maíz son las especies de *F. moniliforme* y *F. graminearum* (García-Aguirre et al., 2010).

Por otro lado, el género bacteriano *Bacillus* se encuentra entre los agentes biológicos más estudiados para el control de enfermedades en agricultura (Whipps, 2001). Las especies de *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Bacillus licheniformis* han mostrado ser agentes potenciales de biocontrol contra fitopatógenos y organismos plaga (Zhao et al., 2014; Villarreal-Delgado et al., 2017).

Las prácticas agrícolas que representan al sistema milpa sugieren la conservación de una alta diversidad de microorganismos benéficos en el suelo. Con base en esto, el presente estudio tiene como objetivo aislar, caracterizar e identificar cepas del género *Bacillus* en suelos destinados a prácticas agrícolas tradicionales, como lo representan la milpa de la región de el Alto Mezquital Hidalgo, con capacidad de antagonizar al hongo fitopatógeno *Fusarium* de importancia agroeconómica para el estado.

II. ANTECEDENTES

II.1. Suelo y su Composición

El suelo es la capa más superficial de la litósfera y se define como un subsistema natural, complejo y dinámico que está integrado por materia mineral, orgánica, aire y agua. El suelo alberga a una población viva que incluye macrofauna (insectos), mesofauna (nemátodos, artrópodos), microfauna (protozoarios) y microflora (bacterias, hongos, algas y actinomicetos). Estos elementos establecen estrechas relaciones siendo la actividad de los microorganismos en el suelo fundamental, ya que degradan la materia orgánica y ayudan a mantener los ciclos biogeoquímicos (Nannipieri et al., 2002; Nortcliff et al., 2011; UNAN, 2011).

Las interacciones entre los microorganismos y las partículas del suelo a menudo involucran simultáneamente procesos biológicos, físicos y fisicoquímicos. Las interacciones biológicas involucran el crecimiento y multiplicación de las células, así como la secreción de sustancias orgánicas, como enzimas y otros biopolímeros. Los procesos físicos se relacionan con la geometría y cohesión de la matriz del sólido, incluyendo la distribución del tamaño del poro, la retención de agua, estabilidad agregada y propiedades mecánicas; dichas características son altamente dependientes del tamaño, forma y el arreglo espacial de las partículas. Por otra parte, las interacciones fisicoquímicas incluyen procesos en las interfaces o en la solución del suelo, por ejemplo, la sorción, disolución, hidrólisis, oxidación y parámetros como el pH, las características de las partículas de la superficie, el área, carga electrostática, energía libre y grupos funcionales (Chenu y Stotzky, 2002).

El comportamiento de una población microbiana y sus efectos sobre el suelo dependen en gran parte de las características físicas y químicas de éste. El entendimiento de dicho comportamiento resulta esencial para predecir la aparición y la velocidad de las funciones mediadas por microorganismos que son de importancia agronómica y ambiental, tales como la mineralización del nitrógeno, desnitrificación, fijación del nitrógeno, reincorporación de

carbono y nitrógeno, estabilidad de la estructura del suelo, biodegradación de contaminación orgánica, etc. (Chenu y Stotzky, 2002; Frioni, 2005).

II.2. Ecología Microbiana

La ecología microbiana estudia las interrelaciones entre los microorganismos y el ambiente, así como las propiedades y el comportamiento de éstos en su entorno natural. Los microorganismos son un componente fundamental en el hábitat del suelo, donde desempeñan actividades importantes en el funcionamiento del ecosistema, mediante el control de las reacciones del ciclo de nutrientes esenciales para mantener una fertilidad, contribuyendo a la génesis y mantenimiento del suelo. El 90% de la descomposición de la materia orgánica es realizado por bacterias y hongos, por lo que están cercanamente asociados en el ciclo de nutrientes que resultan de suma importancia para la agricultura. A pesar de ello, se ha demostrado que una reducción en cualquier grupo de especies microbianas tiene poco efecto en los procesos generales en el suelo, dado que otros microorganismos pueden asumir su función (Brussaard, 1997; Clegg y Murray, 2002; Nannipieri et al., 2002; Frioni, 2005).

La diversidad microbiana se refiere a la cantidad y distribución de información genética dentro de las especies microbianas, referente a la diversidad de especies de bacterias y hongos en una comunidad, en contraste a la diversidad ecológica que es referente a la variación en la estructura de la comunidad, complejidad de las interacciones, número de los niveles tróficos y el número de gremios. De acuerdo a Park et al. (2018), actualmente existen 87,106 genomas bacterianos referenciados en el GenBank y se estima que un solo gramo de suelo puede albergar hasta 10^{10} células bacterianas, con una diversidad estimada de entre 4×10^3 a 5×10^4 especies (Torsvik et al., 1990; Roesch et al., 2007). En el suelo se han identificado 26 *phyllums* predominantes, siendo el *phyllum* más abundante el de *Proteobacteria* (27%), seguido por *Actinobacteria* (14%), *Chloroflexi* (8%) y *Firmicutes* (6%) (Nannipieri et al., 2002; Wang et al., 2017).

Gibbons y Murray (1978), describieron la división de Firmicutes para abarcar a todas las bacterias Gram-positivas. Las bacterias de este *phyllum* contienen a un grupo heterogéneo de

microorganismos tradicionalmente incluidos en tres clases *Bacilli*, *Clostridia* y *Mollicutes*, cuenta con 26 familias y 223 géneros. Los miembros de este filo son altamente diversos en su morfología y fisiología, siendo capaces de habitar una amplia variedad de ambientes, incluyendo hábitats hipersalinos. Dentro de este filo, las clases *Bacilli* y *Clostridia* contienen tres y dos familias, respectivamente, con un gran número de especies halófitas aisladas de diferentes entornos salinos e hipersalinos. El *phylum* Firmicutes resulta ser abundante en el suelo debido a que la mayoría de las bacterias que lo conforma produce endosporas, las cuales son formas estructurales resistentes a diversos ambientes, en numerosos hábitats y con nichos ecológicos distintos. Se ha reportado que algunos géneros pertenecientes a este *phylum* se caracterizan por ser antagonistas de patógenos de plantas, lo que representa un papel importante de defensa utilizado para control biológico de fitopatógenos (De Vos et al., 2009; Horikoshi et al., 2011; López-Rivera, 2011).

II.3. Género *Bacillus*

Las especies del género *Bacillus* son bacilos aerobios estrictos o anaerobio facultativos, que en su mayoría poseen movilidad por flagelos insertados en disposición peritrica y que pueden llegar a medir de 0.5-2.5 a 1.2-10 μm ; además, son saprófitas, catalasa positiva y quimiorganótrofas de metabolismo fermentativo o realizan una respiración aerobia. Dichas especies presentan una amplia gama de habilidades fisiológicas que les permiten vivir en diversos ambientes naturales. El ciclo de vida de *Bacillus* se divide en dos fases: crecimiento vegetativo y esporulación. Durante la primera fase de crecimiento, la bacteria crece de forma exponencial cuando se encuentra en un ambiente donde las condiciones de nutrientes son favorables. Cuando los nutrientes comienzan a ser limitados, la bacteria inicia el proceso de esporulación, formando una endospora. La estructura de la endospora, que desarrollan las bacterias del género *Bacillus*, les permiten sobrevivir en condiciones extremas de temperatura, desecación, pH, entre otros (Tejera-Hernández et al., 2011).

Las endosporas bacterianas constituyen una estructura de resistencia que puede permanecer viable durante largos periodos de tiempo hasta que las condiciones ambientales

como la disponibilidad de nutrientes, temperatura y pH sean favorables para el desarrollo de la forma vegetativa. Dichas estructuras pueden sobrevivir independientemente de la célula madre y ser aisladas desde una gran variedad de sustratos, ya que son resistentes al aire seco, largos periodos de sobrevivencia bajo condiciones adversas, y a sus características termorresistentes (pueden permanecer viables a 80-100°C). La resistencia al calor de las endosporas fue reconocida en *Bacillus subtilis* por Cohn en 1877. Estas características de resistencia explican la gran cantidad de especies del género *Bacillus* que se encuentran en una gran variedad de hábitats (Márquez-Torres, 2007; Tejera-Hernández et al., 2011).

Por otra parte, dentro del género *Bacillus* se han reportado especies móviles, lo que indica la presencia de flagelos, pero no es considerada una particularidad taxonómica del género; sin embargo, la presencia o ausencia de movilidad como “*swarming*” y “*swimming*” sí lo son. El “*swarming*” se refiere al comportamiento grupal de las bacterias en la periferia de la colonia, en la cual unos organismos se desplazan sobre sus vecinos formando una película de crecimiento. Por otro lado, el “*swimming*” es resultado del flagelo y el movimiento que éste realiza sobre la biopelícula de agua que queda en los medios de cultivo sólidos. Ambos movimientos le confieren a la célula supervivencia ante la escasez y competencia de nutrientes (Hernández y Rodríguez, 1993; De Vos et al., 2009).

Las principales características bioquímicas que presenta *Bacillus* incluyen mecanismos como: i) la producción de lipopéptidos, los cuales han sido ampliamente estudiados debido a su actividad antibacteriana y fúngica. Dicha actividad se ve reflejada en la interacción con la membrana citoplasmática de bacterias u hongos, creando un desbalance osmótico desencadenando la muerte de la célula, ii) la capacidad de distintas especies para producir una gran variedad de antibióticos que le confieren a la bacteria la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos como agentes fitopatógenos, iii) la producción de enzimas líticas como quitinasas, proteasas y β -glucanasas involucradas en la degradación de la pared de agentes fitopatógenos como hongos, ya que la pared de éstos se encuentra conformada por glicoproteínas, polisacáridos y otros componentes que varían según la especie fúngica; iv) la producción de sideróforos, los cuales son estructuras proteicas receptoras de bajo peso molecular y con alta afinidad por el hierro que algunas especies del género *Bacillus* han desarrollado para regular la concentración del hierro en el medio a través de su quelación, facilitando así su captación. El hierro es un nutriente esencial para importantes funciones

celulares, como las reacciones redox, transporte de electrones y catalizando reacciones enzimáticas; y v) la producción de δ -endotoxinas producidas particularmente por *Bacillus thuringiensis* (Bt) que son cuerpos paraesporales proteicos conformados por unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares. Estos cuerpos paraesporales pueden ser utilizados eficazmente para el control biológico de insectos, ya que las toxinas producidas durante la fase de esporulación, denominadas proteínas *Cry* (cristal), son tóxicas para organismos específicos (la mayoría pertenece al orden de los insectos). Así mismo, las proteínas *Cyt* (citolítica) que han sido relacionadas con efectos tóxicos sobre una gran variedad de insectos (Villarreal-Delgado et al., 2017).

II.3.1. Funciones del género *Bacillus* en el suelo

Bacillus es el género más abundante en la rizosfera, siendo las especies de *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. licheniformis* y *B. megaterium* las de mayor importancia en el suelo, donde desempeñan un papel importante al asociarse con las plantas, con quienes establecen estrecha relación promoviendo su crecimiento y desarrollo, a la vez que les proporciona protección contra el ataque de organismos patógenos. Ecológicamente, a esta relación benéfica entre las bacterias y las plantas se le denomina “mutualismo”, la cual se define como la condición en donde dos seres vivos de diversas especies viven juntos, habitualmente, pero no necesariamente, con beneficio recíproco para el hospedero (planta) y el simbiote (bacteria). La mayoría de estas asociaciones ocurren al nivel rizosfera, la cual está influenciada por las raíces de las plantas. Aproximadamente el 40% del carbono fijado en la fotosíntesis, en la parte aérea de la planta, puede ser excretado a la rizosfera, lo que afecta positivamente a la mayoría de las bacterias que ahí habitan. Estas bacterias se nutren de los exudados de las raíces que secretan las plantas, tales como azúcares, vitaminas, factores de crecimiento, ácidos orgánicos, glúcidos y mucigel. Mientras tanto, las bacterias secretan metabolitos que afectan fuertemente el ambiente e incrementan la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Hernández-Montiel y Escalona-Aguilar, 2003; Lyngwi y Joshi, 2015).

Las bacterias miembros del grupo *Bacillus*, están entre los sistemas bacterianos más estudiados experimentalmente en microbiología. Las investigaciones en *Bacillus subtilis* son notablemente diversas, incluyendo la genética, la bioquímica, la biología celular y la ecología, lo cual ha tenido un impacto importante en la biología básica y aplicada. Diversas especies de los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* se utilizan en los campos agrícolas para promover la salud de los cultivos de diferentes maneras. Algunas de estas especies estimulan directamente el crecimiento de las plantas mediante el aumento de la adquisición de nutrientes o, mediante la activación de los mecanismos de defensa de la planta huésped antes de una infección; otras especies pueden inhibir o suprimir las poblaciones de microorganismos patógenos y/o plagas (Kumar et al., 2011).

El uso de microorganismos para suprimir las enfermedades de las plantas, denominado control biológico o biocontrol, ofrece una poderosa alternativa al uso de productos químicos sintéticos. Especies de *Bacillus*, y algunas formas relacionadas, son posibles agentes de biocontrol contra varios microorganismos patógenos. Su capacidad de formación de esporas los convierte en candidatos ideales para desarrollar productos biopesticidas eficaces desde el punto de vista tecnológico (Lyngwi y Joshi, 2015).

El aislamiento de bacterias de *Bacillus* spp. se ha realizado con el objetivo de la búsqueda de agentes de biocontrol (BCA) de plagas y patógenos de las plantas. Sin embargo, una mayor comprensión de su ecología, incluyendo la diversidad, distribución y fisiología de este género Gram-positivo, es útil para la identificación de nuevas cepas con capacidad para ser utilizado con éxito como BCAs. El desarrollo de herramientas moleculares y genómicas ofrece nuevas posibilidades para mejorar la selección, caracterización y manejo del control biológico, incluyendo modificaciones de cepas silvestres para mejorar su capacidad de controlar enfermedades transmitidas por el suelo. Desde el punto de vista de la biotecnología, una característica importante para las especies de *Bacillus* es su diverso metabolismo secundario, así como su capacidad para producir más de 20 antibióticos con una variedad de estructuras. El género cuenta con genes específicos para la biosíntesis de antibióticos que en el caso del genoma de *Bacillus subtilis* equivalen del 4-5%, el cual está dedicado a la síntesis de metabolitos secundarios con la capacidad de producir diversos compuestos antimicrobianos (Stein, 2005; Kumar et al., 2011).

II.4. Hongos Fitopatógenos

En la agricultura mundial, los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades de pre y postcosecha en los cultivos de hortalizas, cereales y frutas, siendo estos responsables de pérdidas económicas cuantiosas. El daño que ocasionan los microorganismos patógenos no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas de producción biológica. Es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospederas atacadas por estos microorganismos (Juárez-Becerra et al., 2010).

Uno de los géneros de hongos filamentosos patógenos que afecta directamente a las plantas es *Fusarium*. El género *Fusarium* fue introducido por Link en 1809 y es conocido por ser un género que alberga diversas especies de hongos fitopatógenos, así como de enfermedades en humanos y animales domésticos. La amplia diversidad de hospederos convierte a *Fusarium* en un género de importancia para la agricultura, la economía y la salud. *Fusarium* es considerado cosmopolita con especies que habitan en el suelo, aire y agua. Como parte de su estructura microscópica, el género *Fusarium* cuenta con una fiálide que generalmente es fina, con forma de botella, simple o ramificada, cortas o largas, monofialídica o polifialídica. Las distintas especies de este género producen diferentes tipos de esporas, que pueden ser macroconidios que presentan forma de medialuna, hialinos y son septados. Los microconidios, ausentes en algunas especies, poseen variadas formas (fusiformes, ovales, clavadas, entre otras), así como agrupaciones (estructuras mucoides llamadas “falsas cabezas”) en cadenas largas o cortas. Otro tipo de conidios son los mesoconidios, que son similares a los macroconidios, pero de menor tamaño y nunca forman estructuras mucoides. Por último, pueden observarse las clamidosporas características con doble pared gruesa, lisa o rugosa; de manera aislada, en pareja o en grupo (Arbeláez, 2000; Leslie y Summerell, 2006; Lezcano et al., 2012).

La taxonomía del género *Fusarium* resulta compleja y ha sufrido diversos cambios desde su creación, independientemente de las identificaciones moleculares actuales, aún se utiliza un sistema de clasificación basado principalmente en las características estructurales de las colonias y las esporas del hongo. Se han reconocido entre 9 y 78 especies del género, dependiendo del

autor, lo que muestra la complejidad taxonómica del género (Arbeláez, 2000; Leslie y Summerell, 2006).

Las enfermedades en las plantas causadas por *Fusarium* consisten en marchitamientos vasculares, manchas y añublos de las hojas, pudrición de raíces y de tallos, pudrición de frutos, granos y semillas, sin embargo, no todas las especies del género resultan ser patógenas, algunas se utilizan en el control biológico de ciertas enfermedades causadas por especies patogénicas (Nelson, 1990). Por otro lado, existen especies oportunistas que causan infecciones en el hombre y en los animales debido a la producción de toxinas de algunas especies (Arbeláez, 2000).

Fusarium se encuentra naturalmente en el suelo y en ocasiones puede estar asociado a las pudriciones de raíz y tallos de una diversidad de plantas. Montiel-González et al. (2005) considera al género como el más complejo de los que atacan las raíces de las plantas cultivadas, como el maíz. Este hongo puede llegar a causar daño en todas las etapas del cultivo de maíz, por ejemplo, durante la semilla, el micelio puede invadir y ocasionar manchas en las cubiertas externas, causando disminución de la germinación por la muerte del embrión. En la plántula y planta adulta, debilita y pudre la raíz, ocasionando acame. En el maíz, la pudrición de tallo y mazorca está asociado con las especies *F. verticillioides* (Sheld) y *F. graminearum* (Schwabe) (González et al., 2007; Figueroa-Rivera et al., 2010).

II.5. Control Biológico

El control biológico o biocontrol consiste en el uso de organismos vivos para disminuir la densidad de población o impacto de un organismo plaga y hacerlo menos abundante o menos perjudicial. Podemos distinguir entre lucha microbiológica (LMB), si se utilizan microorganismos entomopatógenos (virus, bacterias, hongos, nemátodos, etc.) y lucha macrobiológica (LB) si se usan enemigos naturales artrópodos (insectos, ácaros, arañas). A pesar de ser una técnica milenaria, el biocontrol se dejó de practicar con la generalización de la lucha química como medida de control de plagas, enfermedades y malezas, hasta que por los diversos problemas que ha ocasionado el uso intensivo de plaguicidas, volvió a integrarse como alternativa en el manejo de la salud vegetal (Jacas-Miret, 2005; Nicholls-Estrada, 2008).

La utilización de microorganismos en el control biológico de enfermedades de las plantas constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y productos químicos. Entre los agentes de control biológico más estudiados se encuentran los microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* y *Bacillus* (Whipps, 2001). Las especies del género *Bacillus* poseen características especiales que los hacen posibles candidatos como agentes de control biológico. Su utilización para el biocontrol de las enfermedades de las plantas es de gran interés, debido a la capacidad que presentan estas bacterias para producir antibióticos y otras sustancias con capacidad antibacteriana y antifúngica que impiden el establecimiento de patógenos vegetales. Entre las especies más utilizadas con este propósito se encuentran *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumilus* y *B. polymyxa*. El rápido crecimiento que muestran estas bacterias en cultivo líquido, la formación de endosporas resistentes al calor y la desecación, así como la producción de metabolitos secundarios, son características que permiten considerar a estos microorganismos como potenciales agentes de control biológico para el desarrollo de estrategias que permitan prácticas más sustentables en agricultura (Reinoso-Pozo et al., 2006). Específicamente, resulta importante la búsqueda de bacterias del género *Bacillus* con características bioquímicas y fisiológicas que permitan combatir enfermedades de importancia agrícola ocasionadas por hongos fitopatógenos como *Fusarium*.

II.6. Sistemas Agrícolas Convencionales y de Conservación

Las actividades humanas inducen a la degradación del suelo provocando una disminución de la diversidad microbiana e influyendo directamente en la sostenibilidad ambiental, social y económica. Por décadas se han implementado técnicas de cultivo consideradas de mayor producción, para el incremento de los rendimientos de áreas cultivadas mediante el uso de semillas híbridas, fertilización química, maquinaria y equipo con alto uso de energéticos fósiles, haciendo cada vez menos sustentables las prácticas agrícolas. Dichas prácticas son conocidas como sistemas de cultivo convencionales, en donde, predomina la técnica de monocultivo,

favoreciendo la pérdida de especies, deterioro de los suelos por extracción de nutrientes y la erosión.

Las prácticas agrícolas convencionales progresivamente han deteriorado la productividad y calidad de los suelos de cultivo, llevando así a la pérdida de comunidades microbianas beneficiosas y al deterioro del funcionamiento del ecosistema. Actualmente, se realizan grandes inversiones para aumentar la fertilidad y producción de los suelos, pues existe una demanda creciente de suelos destinados a la producción agrícola para satisfacer la demanda de alimentos por la creciente población. El uso de pesticidas químicos y fertilizantes, como intento de mejorar la productividad y controlar enfermedades de plantas provocan la inestabilidad ambiental. El mantener una seguridad alimentaria y desarrollar una agricultura racional sustentable, sin uso de agentes químicos dañinos para la salud y que contaminan los ecosistemas, es un reto actualmente (Shankar, 2015; Mishra y Arora, 2016; Sánchez-Morales y Romero-Arenas, 2016).

En contraste a la agricultura convencional, la agricultura de conservación es considerada como un sistema de producción agrícola sostenible, con prácticas agronómicas adaptadas al cultivo y a las condiciones de la región. Estas técnicas de cultivo protegen al suelo de la erosión y degradación, mejoran su calidad y biodiversidad, y contribuyen a la preservación de los recursos naturales. El manejo de los cultivos con estas prácticas supone una mejora del medio ambiente en los ecosistemas agrícolas, implicando un incremento del contenido de materia orgánica, mejorando la estructura y porosidad del suelo, aumentando la biodiversidad e incrementando la fertilidad natural del suelo (Gil-Ribes et al., 2017).

II.7. Sistema Agrícola Milpa: Ejemplo de Agricultura de Conservación

La milpa (del náhuatl milpan de *milli* “parcela sembrada” y *pan* “encima de”) es comprendida como un sistema agrícola tradicional conformado por un policultivo que constituye un espacio dinámico de recursos genéticos. Su especie principal es el maíz, acompañado de diversas especies de frijol, calabaza, chile, entre otros. Este sistema agrícola representa una alternativa viable que combina prácticas campesinas e indígenas y significa una producción diversificada

de alimentos y al mismo tiempo, un menor desgaste de nutrientes en los suelos. La interacción de una gran cantidad de especies convierte a la milpa en un ecosistema donde se favorecen interacciones ecológicas benéficas como el control biológico de plagas, fertilidad del suelo y polinización (Buenrostro, 2009; Sánchez-Morales y Romero-Arenas, 2016). Sin embargo, el sistema tradicional milpa se ve directamente afectado por el clima y la falta de mano de obra. El suelo, la vegetación, las costumbres alimentarias de la región y los intereses y destrezas del agricultor se encuentran influenciadas por el clima de la región. Usualmente, los agricultores, generalmente de subsistencia, mantienen diversidad en su cultivo como estrategia para enfrentar futuros cambios ambientales y necesidades económicas actuales, además de otorgar la capacidad del cultivo para combatir plagas y enfermedades. El barbecho en la milpa está relacionado con la práctica de roza y tumba que aportan nutrientes al policultivo, a diferencia de la agricultura convencional que utiliza nutrición vegetal mediante fertilizantes y plaguicidas, que deteriora la diversidad de microorganismos en el suelo y los nutrientes disponibles para las plantas. Por su parte, los campesinos e indígenas que desarrollan el sistema milpa en las comunidades originarias de México, que integran y heredan los conocimientos sobre el mantenimiento de un sistema agrícola sustentable, ha disminuido y dicho fenómeno es causado debido a la falta de recursos económicos (Sánchez-Morales y Romero-Arenas, 2016; Ebel et al., 2017).

En este contexto, el estado de Hidalgo cuenta con regiones donde el sistema milpa forma parte de las actividades agrícolas de subsistencia importantes. La comunidad de El Boxo, en el municipio de El Cardonal, localizada en una subregión del Valle del Mezquital denominada Alto Mezquital, presenta como principal actividad agrícola el “sistema tradicional milpa”. En El Boxo se cultivan hasta 3 tipos de maíces criollos identificados como maíz pinto, maíz carbonero y maíz blanco. El maíz se encuentra asociado con otros cultivos como frijol, calabaza, haba y quelite, también forman parte de la milpa árboles frutales como manzana y pera. Las parcelas se encuentran organizadas en terrazas lo que facilita el riego, evita la erosión del suelo y la entrada de fuertes corrientes de aire que dañen el cultivo. El sistema *milpa* está compuesto por un policultivo en terrazas en laderas, para facilitar el sistema de riego, ya que las lluvias en la región son constantes durante todo el año (Figura 1). Las terrazas son delimitadas por agave y por árboles frutales como pera y manzana. La función de las plantas de agave es evitar la erosión del suelo, mientras que la de frutales es impedir el paso de viento para evitar la ruptura

de las plantas de maíz. Cabe destacar que, el sistema agrícola establecido en la comunidad de El Boxo es sostenible, ya que los pobladores de esta comunidad no emplean productos químicos como fertilizantes o herbicidas para el control de plagas y malezas, en su lugar utilizan estiércol de ganado con el rastrojo generado en cosechas anteriores que no es removido del suelo, no se barbecha la tierra y las hierbas se retiran de manera manual, lo que supone la existencia de una alta diversidad de microorganismos benéficos en el suelo incluyendo especies del género *Bacillus*. Los cultivos de maíz de esta región no son atacados por plagas microbianas o fitopatógenos; sin embargo, puede presentarse el desarrollo de gusanos en la mazorca, los cuales son aprovechados por la comunidad como alimento. El rendimiento obtenido oscila entre 6 a 7 toneladas de maíz por hectárea, el cual es utilizado principalmente para autoconsumo, si hay sobrantes puede ser comercializado (García, 2018).



Figura 1. Sistema milpa en El Boxo, Hidalgo.

El estado de Hidalgo se encuentra en el 13° lugar a nivel nacional en producción agrícola, destacándose los cultivos de alfalfa verde con un 57.7%, pastos y praderas en verde 12.1%, maíz grano 8.5%, avena forrajera 6.6%, maguey (aguamiel) 5.8% y cebada grano 2.3%. Durante 2018, el Estado se ubicó como el noveno lugar en producción de grano

de maíz a nivel nacional con 37 mil toneladas, representando el 0.5% del total producido en México, mejorando del periodo del 2017 cuando produjo 33 mil toneladas. En cuanto a agricultura, a pesar de ser una zona semidesértica, el Valle del Mezquital es denominado "El Granero de Hidalgo", ya que el 61% de la población realiza prácticas agrícolas como principal actividad económica. Dicha región cuenta con una superficie de siembra de 4,079 Km² con una precipitación media anual de 450-500 mm siendo una de las principales zonas de riego, destinándose 34,000 hectáreas al cultivo de maíz. En cuanto a la presencia de plagas y enfermedades, la región agrícola del Valle del Mezquital presenta problemas fitosanitarios, entre los que destaca la enfermedad de pudrición de mazorca causada por especies del hongo fitopatógeno *Fusarium* (SEDAGROH, 2016; García, 2018; Pérez-Camarillo et al., 2018).

III. JUSTIFICACIÓN

La diversidad microbiana del suelo es uno de los factores cruciales que pueden regir el funcionamiento del ecosistema. Los cambios en los patrones de uso de la tierra tienen un impacto considerable en la diversidad de las diferentes composiciones de las comunidades microbianas en los suelos, tal como la práctica de sistema de cultivo convencional y uso de agroquímicos. La mayor diversidad de microorganismos en los ecosistemas podría establecer un equilibrio funcional, lo que podría facilitar el mantenimiento de la sostenibilidad, mediante actividades agrícolas sustentables. Sin embargo, se han realizado pocos estudios para evaluar las relaciones benéficas entre la diversidad microbiana, la sostenibilidad del suelo y el ecosistema (Shankar, 2015). Por lo tanto, es importante explorar el papel de la diversidad microbiana no identificada (> 99%) y sus procesos en relación con el manejo de ecosistemas no degradados ni perturbados, como las milpas del Alto Mezquital, en el estado de Hidalgo. La búsqueda de bacterias benéficas, como las del género *Bacillus*, en suelos poco explorados como los del sistema milpa, resulta ser de importancia en el suelo, debido a la resistencia conferida por su capacidad de formación de esporas y supervivencia a diversos ambientes; además por ser identificado como antagonista de enfermedades en plantas, provocadas por el hongo fitopatógeno *Fusarium*.

IV. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

El suelo destinado al sistema de cultivo tradicional milpa de la comunidad de El Boxo Hidalgo permitirá el aislamiento de bacterias del género *Bacillus* con capacidad antagónica contra hongos fitopatógenos como *Fusarium* sp.

V. OBJETIVOS

V.1. Objetivo general

Aislar, identificar y caracterizar cepas del género *Bacillus* con capacidad antagónica contra *Fusarium* sp. a partir de suelos de milpas del Boxo, Hidalgo.

V.2. Objetivos específicos

I. Aislar cepas bacterianas con capacidad de esporulación mediante técnicas tradicionales de microbiología a partir de muestras de suelos de milpas de El Boxo Hidalgo.

II. Realizar la caracterización morfológica macroscópica y microscópica de los aislados bacterianos, así como de los fenotipos de producción de proteasas extracelulares y movilidad.

III. Evaluar *in vitro* la actividad antagónica de los aislados bacterianos contra el hongo fitopatógeno *Fusarium*.

IV. Identificar molecularmente las cepas que hayan mostrado actividad antagónica contra el hongo fitopatógeno *Fusarium* y realizar un análisis filogenético con las secuencias obtenidas.

V. Caracterizar en cultivo líquido el crecimiento y fisiología de un aislado microbiano con actividad antagónica contra *Fusarium* sp.

VI. METODOLOGÍA

VI.1. Descripción del Sitio de Estudio y Muestreo

En la presente investigación se trabajó con muestras de suelo previamente obtenidas y almacenadas en el Laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD). Dichas muestras, fueron recolectadas de suelos agrícolas, destinados al sistema de cultivo tradicional milpa, ubicados en la comunidad El Boxo, municipio de Cardonal, en el Alto Mezquital en el estado de Hidalgo. En la Figura 2 se muestra la localización geográfica del sitio de muestreo.

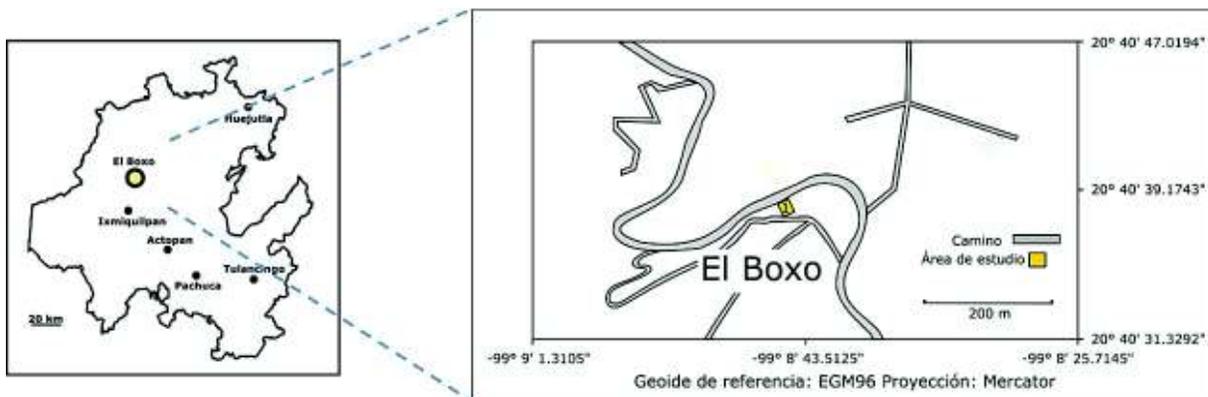


Figura 2. Sitio de muestreo: El Boxo, Alto Mezquital Hidalgo.

Las muestras de suelos fueron tomadas a 10 cm de profundidad en el área cercana a la raíz de las plantas de maíz (Figura 3), se colocaron en bolsas estériles de polietileno, se cerraron herméticamente y se trasladaron en refrigeración al laboratorio para su posterior procesamiento. También se tomaron aproximadamente 1 kg de suelo para realizar análisis fisicoquímicos. Las propiedades físicas y químicas de los suelos fueron analizadas por un servicio comercial de

AGROANALÍTICA 2000 S.A. DE C.V. donde se determinaron los índices de fertilidad y salinidad. Los parámetros que se determinaron fueron pH, conductividad eléctrica, porcentaje de materia orgánica, presencia de arcillas, limos y arenas, el contenido de macro y microelementos, relación de adsorción de sodio, contenido de nitratos, fosfatos, sulfatos, carbonatos, bicarbonatos y presencia de iones intercambiables.

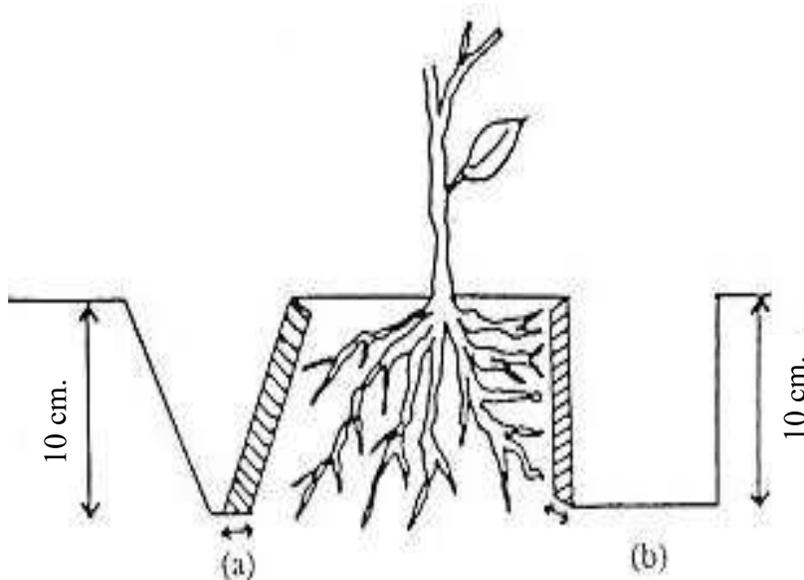


Figura 3. Esquema de toma de la muestra de suelo.

VI.2. Aislamiento de Bacterias Formadoras de Esporas

Para el aislamiento de las cepas bacterianas fueron utilizados medios microbiológicos generales. Se tomaron aproximadamente 1 g de suelo, el cual se resuspendió en solución salina estéril, y la suspensión se calentó a 80°C por 10 min para asegurarse del aislamiento de bacterias formadoras de esporas; después se realizaron diluciones seriales (dilución hasta 10^{-5}) y se tomaron 100 μ l de cada dilución para ser sembradas por extensión en superficie sobre cajas Petri con agar nutritivo. Después, las cajas inoculadas se incubaron a 25°C en una incubadora fija hasta observar crecimiento microbiano. Posteriormente, se realizó el aislamiento de las colonias desarrolladas para lo cual, cada colonia fue sembrada por estría en cajas con agar nutritivo. Se

realizó la purificación de los aislados bacterianos mediante resiembras de las colonias por aproximadamente tres semanas. Finalmente, las cepas purificadas se conservaron con glicerol al 30% a -70°C (Reinoso-Pozo et al., 2006).

VI.3. Descripción de Morfología Macroscópica y Microscópica

La caracterización macroscópica de las cepas microbianas aisladas se realizó mediante la descripción del tamaño de la colonia, forma, textura, consistencia y en algunos casos, colores característicos. Por otra parte, las colonias purificadas fueron observadas al microscopio para realizar su caracterización microscópica. Se realizó además Tinción de Gram, donde se observó el tamaño celular, la forma (anchura, longitud y forma de los extremos) y la formación de esporas (Fester, 2005).

VI.4. Determinación de Actividad Proteolítica Extracelular

Para la evaluación de la actividad proteolítica de las cepas microbianas aisladas se utilizó medio de cultivo agar-leche al 5%. Se preparó solución al 10% de leche descremada en polvo en agua grado HPLC y se pasterizó hasta 100°C , una vez alcanzada la temperatura se detuvo el proceso, con el objetivo de no desnaturalizar las proteínas de la leche. Por otra parte, se preparó una solución 2X de agar nutritivo estéril. Ambas soluciones fueron mezcladas hasta llegar a la homogeneidad, para su posterior vaciado en cajas Petri.

Las placas conteniendo agar-leche fueron utilizadas para inocular las cepas aisladas mediante inoculación en gota y por estría. Se evaluó la actividad proteolítica mediante la presencia de un halo de hidrólisis alrededor de la colonia bacteriana, lo cual indicaba actividad proteolítica positiva (Cabrera et al., 2014).

VI.5. Ensayos de Movilidad: *Swimming* y *Swarming*

Los ensayos de *swimming* y *swarming* se realizaron en placas con medio Luria Bertani (LB) con 0.3% y 0.7% de agar, respectivamente. Las placas no deben presentar rastros de agua en la superficie al momento de ser inoculadas. Se colocó en el centro de la placa 1 μ L de caldo nutritivo con crecimiento bacteriano, para lo cual, las cepas fueron cultivadas previamente en medio nutritivo por 24 horas a 25°C y 160 rpm. Una vez inoculadas las placas, éstas fueron incubadas por 12 horas a 25°C. Los fenotipos de “*swimming*” y “*swarming*” fueron evaluados mediante observación directa en la placa (O’May y Tufenkji, 2011).

VI.6. Ensayos de Desafíos para Evaluar Actividad Antagónica *in vitro*

Para las pruebas de antagonismo, se diseñaron pruebas de desafíos *in vitro* entre las cepas aisladas y el hongo fitopatógeno de *Fusarium* sp. previamente aislado en el laboratorio, en placas Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA). La cepa bacteriana se creció en medio nutritivo líquido y se sembró mediante estría (Figura 4a) o por gota (Figura 4b). Del lado opuesto, se sembró el hongo fitopatógeno. Después, las placas se incubaron a 25°C y se realizaron observaciones diarias. Se consideró una actividad antagónica positiva si presentó una inhibición o afectación en el crecimiento del hongo (García-López, 2017).

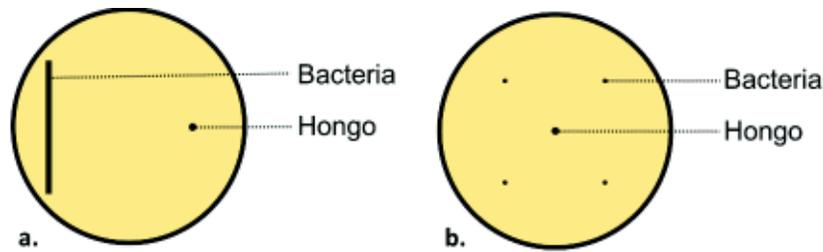


Figura 4. Diseño de pruebas de antagonismo entre bacterias y hongos en placas Petri con medio PDA. a) Siembra de bacteria por estría. b) Siembra de bacteria por gota.

VI.7. Identificación Molecular de Bacterias y Hongos

A partir de ADN genómico se identificaron las cepas bacterianas aisladas mediante amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr. Mientras que, para la identificación de la cepa de *Fusarium*, previamente aislada en el Laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos del CIAD, se utilizó el gen 5.8S ARNr.

VI.7.1. Extracción del ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico de las cepas aisladas se siguió el protocolo descrito por Reader y Broda (1985), o bien, mediante calentamiento de la colonia. En el caso de la extracción de ADN del hongo fitopatógeno se siguió el mismo protocolo de Reader y Broda (1985), pero con la modificación del uso de perlas de vidrio para mejorar la etapa de lisis celular.

Las cepas de bacterias y del hongo fueron cultivadas en 10 mL de caldo nutritivo a 25°C con agitación constante de 160 rpm por un periodo de 2 a 4 días, para la obtención de biomasa. Después, esta biomasa bacteriana fue colocada en tubos de 50 mL y se centrifugó a 10,000 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y se recuperó el paquete celular obtenido. Este paquete celular fue resuspendido en 1 mL de buffer de extracción (200 mM Tris HCl pH 8.0, 250 mM NaCl, 25 mM ácido etilendiaminotetraacético y 0.5% dodecilsulfato sódico) para ser homogenizado

mediante vórtex durante 5 min. Para la extracción de ADN a partir de la biomasa del hongo se agregaron perlas de vidrio para favorecer la lisis celular de las hifas. A continuación, se adicionaron 700 μL de fenol (4°C) y se mezcló nuevamente en vórtex durante 30 segundos (s). Se adicionaron 300 μL de cloroformo y se agitó mediante vórtex durante 30 s. La suspensión obtenida se centrifugó durante 30 min a 13,000 rpm a 4°C . Posteriormente, se tomó la fase acuosa (450 μL aprox.) y ésta fue transferida a microtubos de 2 mL donde se le agregó un volumen de cloroformo y se mezcló nuevamente en vórtex por 30 s. La mezcla obtenida fue centrifugada por 10 min a 13,000 rpm. La fase acuosa resultante (400 μL aprox.) se transfirió a microtubos de 2 mL y se adicionaron 0.6 volúmenes de isopropanol (500 μL aproximadamente). Enseguida, se homogenizó la mezcla por inversión (10 veces) para después ser centrifugada por 5 min a 13,000 rpm. Al término, se descartó el sobrenadante y se lavó el paquete obtenido con 500 μL de etanol al 70% (4°C). Posteriormente, fue centrifugado de nuevo a 13,000 x g por 2 min a 4°C ; el lavado fue realizado dos veces. Por último, el ADN fue resuspendido en 30 μL de agua grado biología molecular.

Adicionalmente, se realizó la extracción de ADN bacteriano por calentamiento de una colonia. Para lo cual, una colonia fue resuspendida en 100 μL de agua grado biología molecular y posteriormente fue sometida a calentamiento a 95°C por 7 min. Enseguida, la suspensión completa fue centrifugada a 12,000 rpm por 10 min y 4°C . Después, el sobrenadante fue descartado y el ADN obtenido se resuspendió en agua grado biología molecular.

La cuantificación de ácidos nucleicos y pureza del ADN se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm y la relación 260/280 utilizando un NanoDrop (Thermo scientific NanoDrop One). Además, se evaluó la integridad del ADN obtenido por electroforesis de gel de agarosa al 1%. El ADN fue almacenado a -20°C para su posterior uso.

VI.7.2. Amplificación del gen 16S ARNr y 5.8S ARNr mediante PCR

Para la amplificación del gen 16S ARNr se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los iniciadores que se utilizaron para la amplificación del 16S ARNr fueron:

27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (sentido) y 1492R 5'-

TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3' (antisentido) y 515F 5'-GTG YCA GCM GCC GCG GTA A-3' (sentido) y 806R 5'-GGA CTA CNV GGG TWT CTA AT-3' (antisentido) (Eart Microbiome Project, 2016). Las reacciones de PCR contenían 25 µL de DreamTaq PCR Master Mix, 1 µL de ADN, 2 µL de cada iniciador y 20 µL de agua ultra pura grado biología molecular. Las condiciones de PCR se muestran en la Tabla I.

Tabla I. Condiciones de PCR para la amplificación del gen 16S ARNr.

ETAPA	CICLO DE PCR	515F – 806R		27F – 1492R		CICLOS
		TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	
1	Desnaturalización inicial	95	3	95	3	35
2	Desnaturalización	95	1	94	0.30	
3	Alineación	51	0.40	55	0.30	
4	Extensión	72	1.20	72	0.30	
5	Extensión final	72	10	72	5	
6	Conservación	4	-	12	-	

La amplificación del gen 5.8S ARNr por PCR. Los iniciadores utilizados fueron ITS1: 5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3' e ITS4: 5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3' y permiten amplificar de la región intergénica ITS1 a la ITS4 del gen (Strobel et al., 2011). La mezcla para la reacción de PCR contenía 25 µL de DreamTaq PCR Master Mix, 1µL de ADN, 2 µL de cada iniciador y 20 µL de agua ultra pura grado biología molecular. Las condiciones de PCR son descritos en la Tabla II.

Tabla II. Condiciones de PCR para la amplificación del gen 5.8S ARNr.

ETAPA	CICLO DE PCR	TEMPERATURA (°C)	TIEMPO (min)	CICLOS
1	Desnaturalización inicial	94	3	
2	Desnaturalización	94	0.15	
3	Alineación	50	0.30	30
4	Extensión	72	0.45	
5	Extensión final	72	5	
6	Conservación	4	-	

Las reacciones fueron realizadas en un termociclador (BIO RAD T100 Thermal Cycler) y los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8% o 1%. Posteriormente, se realizó la purificación de los productos de PCR con el kit PureLink Invitrogen y el kit de purificación de bandas Zymoclean Gel DNA. Los productos de PCR purificados fueron secuenciados mediante servicio comercial a la unidad de Secuenciación Automatizada de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las secuencias obtenidas fueron limpiadas y procesadas mediante análisis *in silico* con el programa BLAST y posteriormente fueron comparadas con la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI) para realizar la identificación de las cepas.

A partir de las secuencias obtenidas, se realizó un análisis filogenético. La filogenia de las cepas fue construida utilizando la plataforma SeaView (Gouy et al., 2010). Las secuencias fueron alineadas utilizando MUSCLE (Edgar, 2004), incluyendo referencias descargadas del GenBank. El árbol filogenético fue construido con estimación de Maximum Likelihood, usando un modelo de sustitución GTR (Tavaré, 1986). El árbol obtenido fue visualizado con el paquete ggtree (Yu et al., 2017) en un ambiente de R (R Core Team, 2018).

VI.8. Cinéticas de Crecimiento

Se caracterizó el crecimiento de uno de los aislados de *Bacillus* mediante cinéticas de crecimiento en cultivo líquido; el criterio para la selección del aislado a caracterizar fue que la cepa bacteriana haya presentado importante actividad antagónica *in vitro* contra *Fusarium*. Para las cinéticas de crecimiento se partió de un pre-inóculo que consistió en cultivar a la cepa de interés en medio nutritivo a 25°C por 12 h y 160 rpm. A partir del pre-inóculo, se realizaron las cinéticas de crecimiento en medio de esporulación Schaeffer's (SSM), para lo cual, se inocularon 10^7 células · mL⁻¹ del pre-inóculo en 100 mL de medio SSM. Los cultivos fueron incubados a 25, 30 y 40°C con agitación constante a 160 rpm hasta por 48 h. La biomasa fue cuantificada siguiendo su crecimiento mediante su densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) y mediante conteo de número de células en cámara de Neubauer. Se utilizaron tres unidades experimentales por tratamiento (Schaeffer et al., 1965).

VI.8.1 Análisis de datos

Los datos de producción de biomasa fueron ajustados con el modelo exponencial de crecimiento (Ecuación 1) para estimar los parámetros de crecimiento utilizando el software GraphPad Prism.

$$X_t = X_0 e^{\mu t} \quad [1]$$

Donde X_t es la biomasa (células · mL⁻¹) a cualquier tiempo de la fermentación, X_0 es la biomasa inicial (células · mL⁻¹), t es el tiempo (h), μ es la velocidad específica de crecimiento (h⁻¹).

VII. RESULTADOS

VII. 1. Fertilidad y Salinidad del Suelo de Milpa de El Boxo Hidalgo

Las muestras de suelo utilizadas en el presente estudio fueron recolectadas de parcelas destinadas al cultivo *milpa* en la comunidad El Boxo, localizada en el municipio del Cardonal en la región del Alto Mezquital del Estado de Hidalgo, comunidad de origen Hñähñü (Otomí). El suelo presentó un contenido del 39% de arcilla, 32 % de limo y 29% de arena. A partir de dichos resultados se determinó el tipo de suelo utilizando el diagrama triangular para determinación de textura (Clasificación U.S.D.A.), el cual correspondió a un suelo franco arcilloso (Figura 5). Los resultados de fertilidad y salinidad del suelo de milpa analizados se muestran en la Tabla III. El suelo presentó un contenido de materia orgánica (M.O.) de 3.61%, pH de 6.7 y una conductividad eléctrica de 1.75 mmhos. Por otra parte, el análisis de salinidad mostró un contenido de 2.79 meq/L de nitratos (NO_3^-), 0.22 meq/L de iones fosfato (PO_4^-) y 1 meq/L de iones carbonato (CO_3^-).

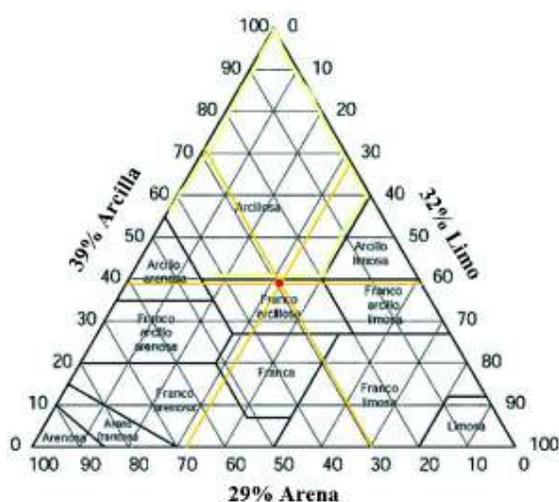


Figura 5. Diagrama triangular para determinación de la textura de suelos. Clasificación U.S.D.A. Fuente: Agenda de Campo para el Estudio del Suelo (Porta-Casanellas y López-Acevedo, 2005).

Tabla III. Parámetros fisicoquímicos de fertilidad y salinidad del suelo. M.O.= Materia orgánica, pH= Potencial de hidrógeno, CE= Conductividad eléctrica, N-NO₃= Nitrógeno de nitratos, P-PO₄= Fósforo de fosfatos, RAS= Relación/adsorción de sodio, NO₃= Nitratos, PO₄= Fosfatos, CO₃= Carbonato.

PARÁMETROS	COMPOSICIÓN
M.O. %	3.61
pH	6.7
CE- (mmhos)	1.75
N-NO ₃ (ppm)	47.4
P-PO ₄ (ppm)	196.6
K (ppm)	289
Ca (ppm)	7,680
Mg (ppm)	570
S (ppm)	20
Fe (ppm)	8.8
Cu (ppm)	2.2
Zn (ppm)	11
Mn (ppm)	5.5
Na (ppm)	92
RAS	0.59
NO ₃ ⁻ (meq/L)	2.78
PO ₄ ⁻ (meq/L)	0.22
CO ₃ ⁻ (meq/L)	1
Arcilla (%)	39
Limo (%)	32
Arena (%)	29

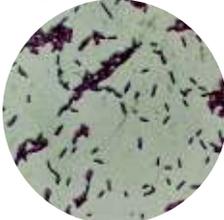
VII.2. Aislamiento y Caracterización Morfológica de los Aislados Bacterianos

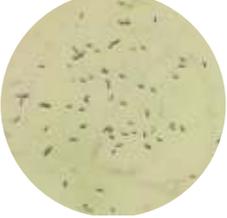
Se aislaron 12 cepas de bacterias termo-resistentes provenientes del suelo tipo franco arcilloso, utilizando medios de cultivo generales. En la Tabla IV se describen las características macroscópicas y microscópicas de los aislados bacterianos. De manera general, se obtuvieron 11 cepas con morfología de bacilos y una cepa filamentosa, todas identificadas como bacterias Gram-positivas. Las cepas de bacilos aisladas presentaron estructura en cadenas de por lo menos

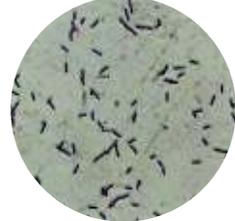
tres células, que llegan a presentar conglomeraciones después de 24 horas de crecimiento en cultivo líquido en medio nutritivo. También, se observó la presencia de endosporas bacterianas y libres las cuales presentaron forma ovalada. Las características microscópicas descritas anteriormente corresponden a las reportadas para células del género *Bacillus*. De acuerdo a De Vos et al. (2009), las células del género *Bacillus* pueden aparecer ya sea individualmente, en pares, en cadenas y como filamentos, tienen forma de bastón con puntas redondeadas o cuadradas. El tamaño de las células varía de 0.4 a 1.8 μm y longitud de 0.9 a 10.0 μm , aunque estas dimensiones pueden verse afectadas dependiendo de las condiciones del medio de cultivo. Además, presentan endosporas que pueden ser ovaladas o esféricas, las cuales normalmente se encuentran en una ubicación subterminal, pero también pueden ser encontradas centrales o paracentrales y de subterminal a terminal.

Macroscópicamente, las colonias de las cepas aisladas presentaron coloración blanca-amarillenta, de forma circular con margen entero o irregular. Las características macroscópicas del género *Bacillus* muestra una diversidad de morfologías coloniales que varían de especie a especie y a menudo dependen del medio de cultivo y las condiciones de crecimiento. Las características morfológicas aisladas incluyen colonias húmedas, brillantes y de apariencia granulares y/o arrugadas, con formas que varían de circulares a irregulares y con frecuencia se extendieron con bordes enteros ondulados hasta flaqueados. Después de un período de incubación de 24 - 48 h, los tamaños coloniales van de un rango de 1 a 5 mm, comúnmente de colores gris cremoso a blanquecino. Las elevaciones encontradas van desde planas hasta una elevación convexa y la consistencia suele ser butirosa, pero algunas colonias presentaron consistencia mucoide adherente, filamentosa o secas que coinciden con las características morfológicas coloniales y celulares publicadas por De Vos et al. (2009).

Tabla IV. Morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas de suelos de Milpa de la comunidad del Boxo (Bx) del Estado de Hidalgo.

CEPA	MORFOLOGÍA	
	MACROSCÓPICA	MICROSCÓPICA
Bx1	<p>Colonias pequeñas en forma puntiformes con elevación plana y margen entero, color amarillo claro y consistencia cremosa.</p> 	<p>Bacilos individuales Gram positivos parciales, formando conglomerados.</p> 
Bx3	<p>Colonias elevadas de forma irregular y bordes lobulares, consistencia cremosa y pigmentación blanca amarillenta.</p> 	<p>Bacilos pequeños Gram positivos formando cadenas cortas de dos o más células y conglomerados.</p> 
Bx4	<p>Colonias pequeñas de forma puntiforme, planas con margen entero y textura viscosa. Superficie uniforme de color blanco.</p> 	<p>Bacilos alargados individuales o en pares, Gram positivos con formación de conglomerados de células.</p> 
Bx5	<p>Colonias grandes de forma circular, elevación convexa y margen rizado. Color amarillo y consistencia viscosa.</p> 	<p>Bacilos pequeños Gram positivos, individuales y formando cadenas pequeñas de dos células y conglomeraciones.</p> 

<p>Bx6</p>	<p>Colonias de forma circular con elevación umbonada y margen ondulado. Superficie rugosa, color blanca amarillenta.</p> 	<p>Bacilos Gram positivos formando cadenas alargadas de dos o más células y conglomeraciones.</p> 
<p>Bx7</p>	<p>Colonias planas puntiformes de margen entero. Lisas y consistencia cremosa.</p> 	<p>Bacilos Gram positivos individuales o de cadenas cortas de dos células.</p> 
<p>Bx8</p>	<p>Colonias pequeñas puntiformes y transparentes. Consistencia cremosa.</p> 	<p>Bacilos pequeños Gram positivos formando conglomeraciones y cadenas alargadas. Se encontró la presencia de esporas libres.</p> 
<p>Bx9</p>	<p>Colonias pequeñas de forma circular con elevación y margen entero. Textura lisa y color blanco.</p> 	<p>Bacilos Gram positivos formando cadenas alargadas de varias células y conglomeraciones.</p> 
<p>Bx10</p>	<p>Colonias elevadas circulares con margen entero, consistencia butirosa y textura rugosa.</p> 	<p>Bacilos Gram positivos de cadenas largas, formando conglomeraciones. Con las condiciones adecuadas forman bacilos alargados, endosporas y esporas libres.</p> 

Bx11	Colonias pequeñas puntiformes de margen entero y circulares. Consistencia viscosa, sin textura y color blanco amarillento.	Células en forma de bacilos alargados individuales o en cadenas cortas, Gram positivos.
		
Bx12	Colonias elevadas circulares con margen rizado. Consistencia dura y textura rugosa. Color amarillento.	Bacilos Gram positivos alargados formando estructuras de células largas en conglomerados.
		
Bx13	Forma y margen filamentosos, con elevación algodonosa, consistencia seca y adherida al agar.	Estructura filamentososa con células alargadas y ramificadas. Presencia de conglomerados. Gram positivo.
		

VII. 3. Fenotipo de Proteasas Extracelulares de los Aislados Bacterianos

Se evaluó la producción de proteasas extracelulares de los aislados bacterianos en agar-leche descremada al 5%. Del total de cepas aisladas, ocho presentaron un halo de hidrólisis en el medio agar caseína, lo cual indicó actividad proteolítica positiva. Las cepas con actividad proteolítica positiva fueron: Bx1, Bx3, Bx4, Bx6, Bx8, Bx9, Bx10 y Bx12. Por otra parte, las cepas Bx5 y Bx9 presentaron actividad proteolítica parcial y por último las cepas Bx7, Bx11 y Bx13 no presentaron dicho fenotipo (Figura 6).

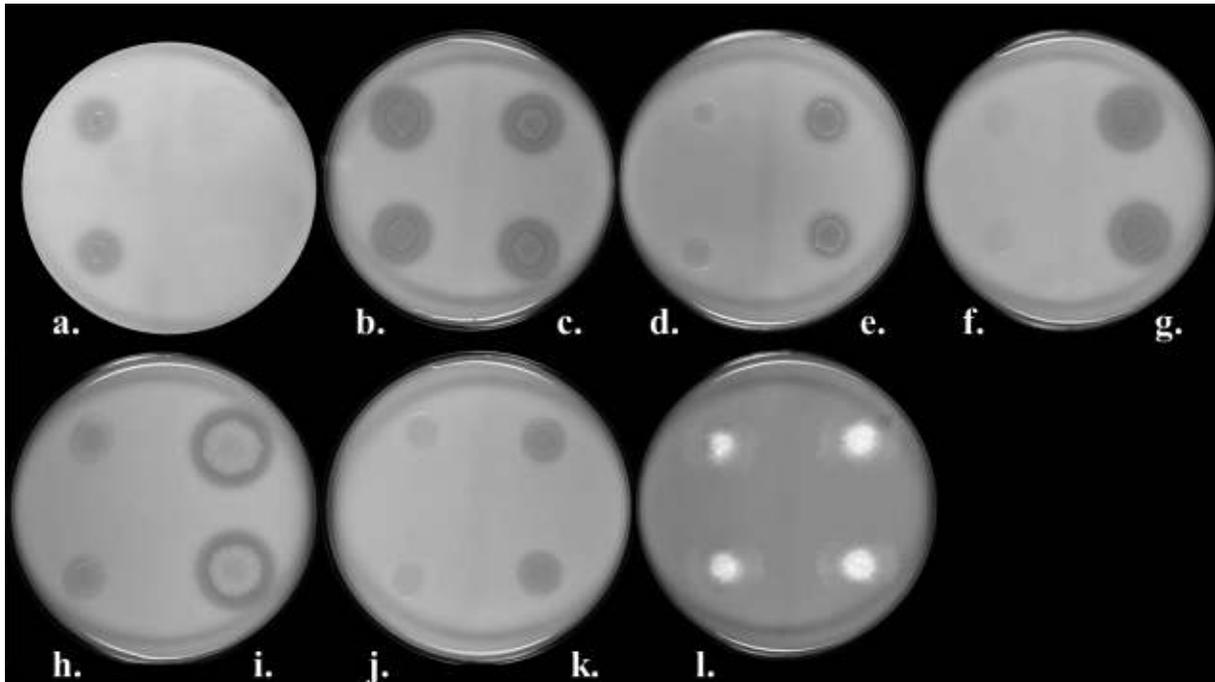


Figura 6. Prueba proteolítica en Agar-leche. a. Cepa Bx1 con actividad proteolítica positiva. b. Cepa Bx3: positiva. c. Cepa Bx4: positiva. d. Cepa Bx5: parcial. e. Cepa Bx6: positiva. f. Cepa Bx7: negativa. g. Cepa Bx8: positiva. h. Cepa Bx9: parcial. i. Cepa Bx10: positiva. j. Cepa Bx11: negativa. k. Cepa Bx12: positiva. l. Cepa Bx13: negativa.

VII. 4. Fenotipo de Movilidad de los Aislados Bacterianos: *Swimming* y *Swarming*

Los ensayos de *swimming* y *swarming* de las cepas bacterianas aisladas fueron realizados en placas Petri con medio de cultivo Luria Bertani (LB) con 0.3% y 0.7% de agar, respectivamente. Las cepas Bx1, Bx3, Bx4, Bx6 y Bx8 presentaron movilidad de *swimming*; mientras que las cepas Bx1, Bx4, Bx3 y Bx6 mostraron movilidad *swarming* (Figura 7 y Figura 8). El fenotipo de *swimming* se presenta debido al movimiento natatorio propio de bacilos flagelados y se realiza sobre la película de agua que queda en los cultivos sólidos. En el caso del *swarming*, este se manifiesta por la presencia de una película fina de crecimiento expansivo a partir de colonias aisladas, constituyendo un mecanismo de virulencia o adaptación a condiciones ambientales. Esta pequeña biopelícula puede obstaculizar el crecimiento de cualquier otro agente y aislarlo (Hernández y Rodríguez, 1993).

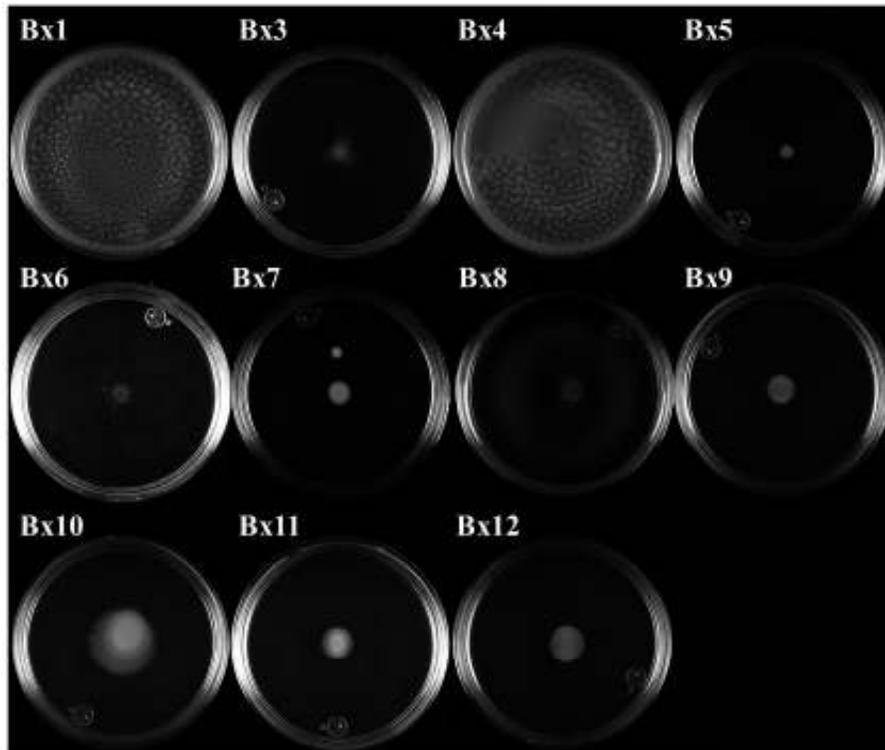


Figura 7. Fenotipo de *swimming* de los aislados bacterianos.

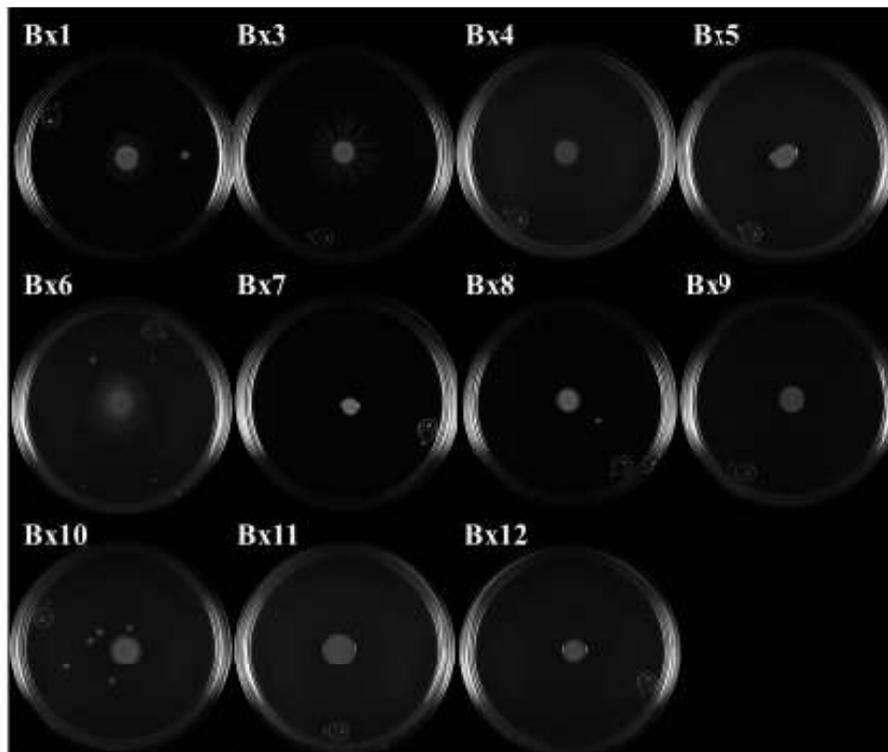


Figura 8. Fenotipo de *swarming* de los aislados bacterianos.

VII. 5. Actividad Antagónica de los Aislados Bacterianos contra *Fusarium* sp.

La cepa de *Fusarium* sp., utilizada en el presente trabajo, fue previamente aislada en el laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos del CIAD a partir de granos de maíz infectados recolectados en campos agrícolas del Mezquital, Hidalgo (Figura 9).

Las características macroscópicas de la cepa de *Fusarium* sp. indica la presencia de micelio de blanco amarillento a violeta o magenta. El hongo presentó un crecimiento acelerado con una tasa de crecimiento de 1 cm por día (Figura 9a). Dichas características coinciden con las reportadas para el crecimiento de *Fusarium* spp. en medio agar papa-dextrosa (PDA, por sus siglas en inglés, Potato Dextrose agar) (Rodríguez-Velásquez, 2013). Por otra parte, las características microscópicas de la cepa de *Fusarium* sp. corresponden a hifas septadas (Figura 9b) con macroconidios en forma de media luna, delgados, curvados de la parte dorsal y septados (Figura 9c). Por otro lado, la identificación molecular con la amplificación del gen 5.8S ARNr de la cepa del hongo fitopatógeno mostró una similitud del 100% con *Fusarium graminearum* con la cepa identificada como LQ122409.

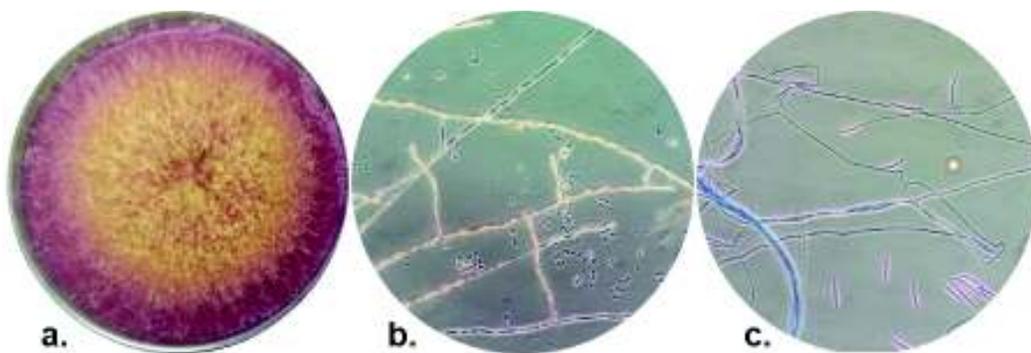


Figura 9. Morfología macroscópica y microscópica de *Fusarium* sp. en medio PDA. a. Crecimiento de *Fusarium* sp. en placa. b. y c. Observación microscópica con colorante azul de algodón.

A partir de ensayos de desafíos en placas con agar PDA, se evaluó la actividad antagonista de las cepas aisladas contra el hongo fitopatógeno *Fusarium*. La actividad de antagonismo de los aislados bacterianos se determinó mediante desafíos contra la cepa de *Fusarium* sp. Esta actividad se clasificó como positiva si la bacteria inhibía el desarrollo del hongo fitopatógeno en agar PDA. Algunas cepas presentaron una actividad parcial, donde el crecimiento se afectó en menor medida, estos resultados se consideraron como positivos; en cambio, se consideró una actividad negativa cuando el crecimiento del hongo no presentaba alteraciones. Con base en estos argumentos, se encontró que ocho cepas presentaron actividad antagonista frente a *Fusarium* sp., siendo las cepas Bx3, Bx4, Bx8, Bx10 y Bx13 las que presentaron mayor actividad de antagonismo contra este hongo fitopatógeno (Figura 10).

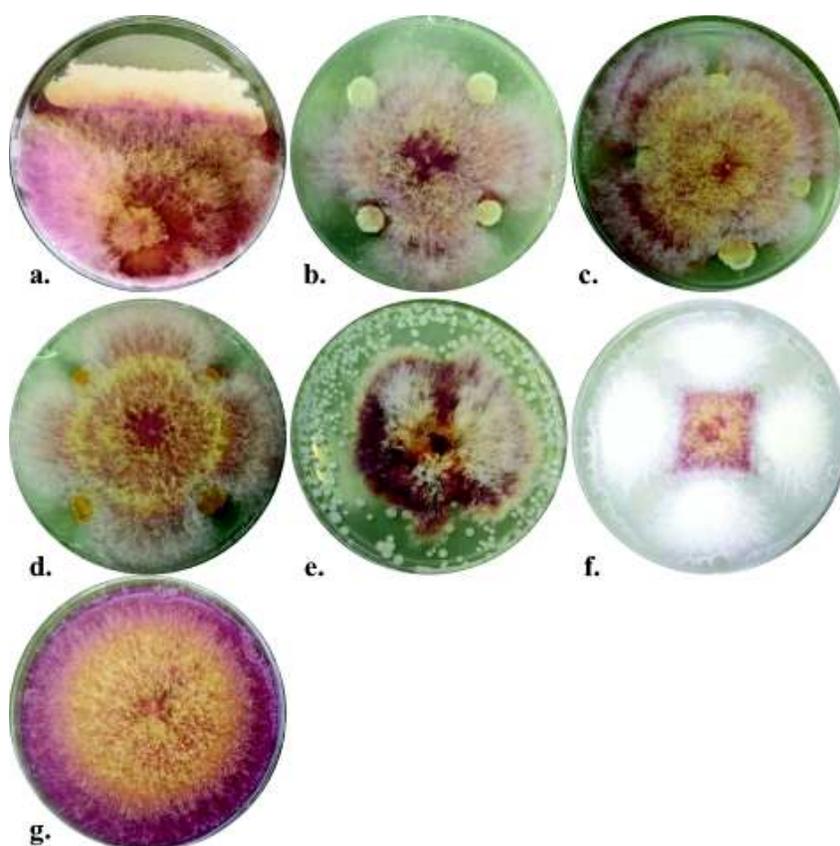


Figura 10. Ensayos de antagonismo en agar PDA entre cepas aisladas y el hongo fitopatógeno de *Fusarium* sp. a. Cepa Bx1. b. Cepa Bx3. c. Cepa Bx4. d. Cepa Bx8. e. Cepa Bx10. f. Cepa Bx13. g. Placa control.

Debido a que en algunas cepas no se observó una clara inhibición del crecimiento del hongo, se realizaron desafíos que consistieron en sembrar primero a la bacteria por extensión en superficie en placa conteniendo PDA y el hongo fue sembrado por picadura. En la figura 11, se observan siete cepas en total que disminuyeron el crecimiento de *Fusarium* sp., además se observó una alteración en el desarrollo fúngico. Las cepas Bx3, Bx4, Bx10 y Bx13 presentaron una mayor actividad evitando el desarrollo de micelio de sustrato y aéreo. Las cepas Bx10 y Bx13 impidieron la germinación del hongo. En cambio, las cepas Bx6, Bx7 y Bx8 presentan extensión de micelio del hongo a través del sustrato. Estos resultados sugieren que la concentración del inóculo de bacteria es un factor determinante para inhibir o afectar el crecimiento de la cepa de *Fusarium* sp. evaluada.

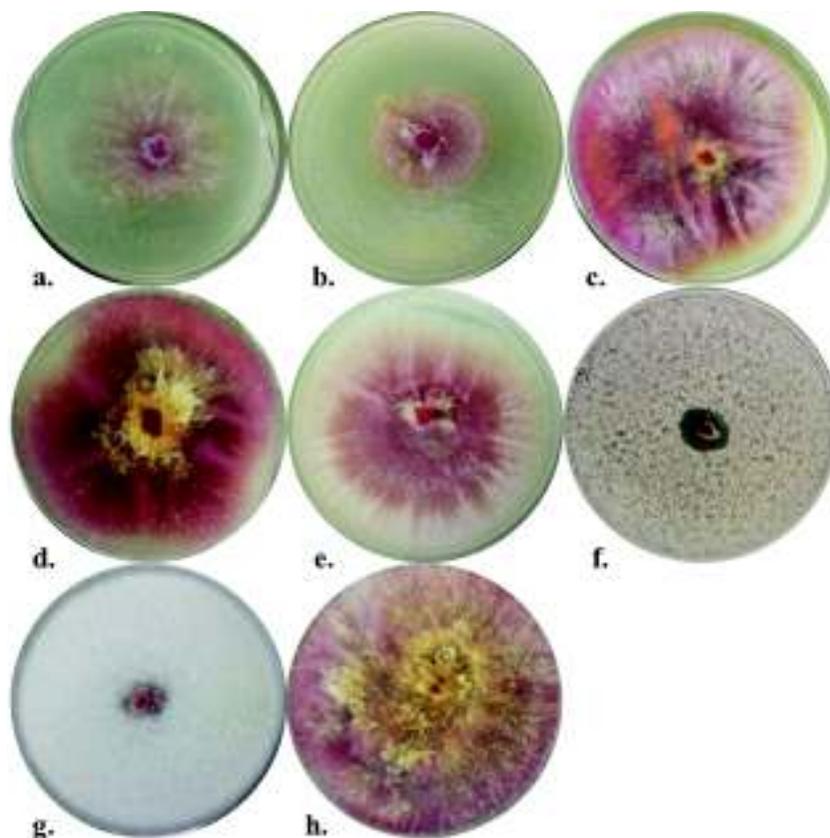


Figura 11. Ensayos de antagonismo en agar PDA entre cepas aisladas y el hongo fitopatígeno de *Fusarium* sp. a. Cepa Bx3. b. Cepa Bx4. c. Cepa Bx6. d. Cepa Bx7. e. Cepa Bx8. f. Cepa Bx10. g. Bx13. h. Placa control.

VII. 6. Identificación Molecular de los Aislados Bacterianos

Mediante la amplificación y secuenciación del gen 16S ARNr, se identificaron 10 cepas bacterianas aisladas del suelo. Para las cepas Bx7 y Bx11 se obtuvo un amplicón de 350 pb (Figura 12), mientras que para las cepas Bx3, Bx4, Bx5, Bx6, Bx8, Bx9, Bx10 (Figura 13) y Bx12 el amplicón fue de 1,500 pb (Figura 14). Por otro lado, el tamaño del amplicón de la cepa Bx13 fue de 180 pb.

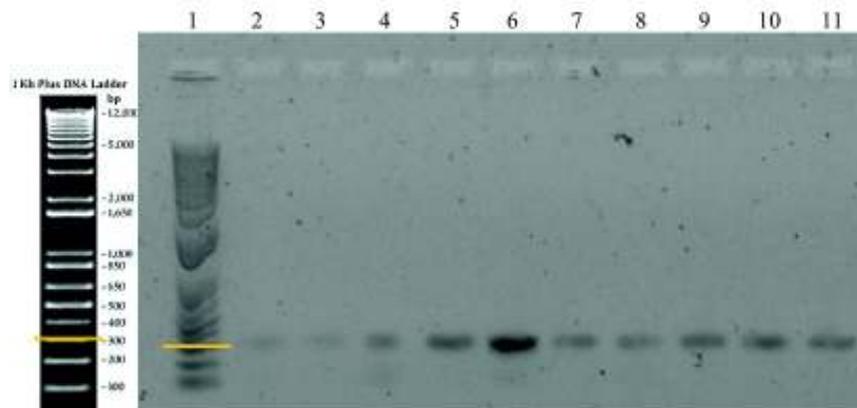


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación del fragmento de 350 pb del gen 16S ARNr. Carril 1: Marcador molecular 1 Kb. Carril 6: Cepa Bx7. Carril 9: Cepa Bx11. Carril 12: Control negativo. Amplificación con los iniciadores universales 515F - 806R.

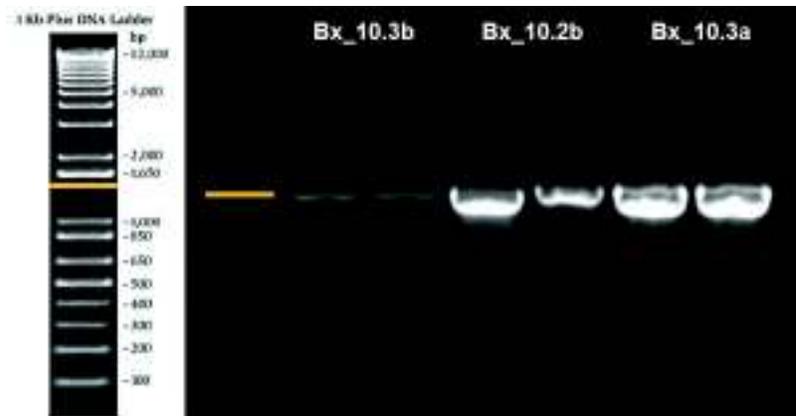


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa al 1% mostrando la amplificación del fragmento de 1500 pb de la cepa Bx10. Amplificación con los iniciadores 27F y 1492R.

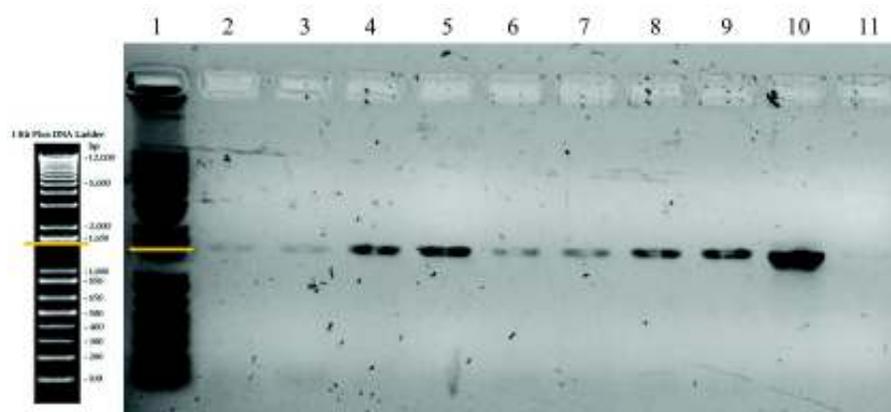


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8% mostrando la amplificación del fragmento de 1.500 pb del gen 16S ARNr. Carril 1: Marcador molecular 1 Kb. Carril 3: Cepa Bx4. Carril 5: Cepa Bx6. Carril 7: Cepa Bx8. Carril 9: Cepa Bx12. Carril 11: Control negativo. Amplificación con los iniciadores 27F y 1492R.

Los productos de PCR fueron secuenciados. Las secuencias obtenidas del gen 16S ARNr fueron limpiadas utilizando el programa Chromas (<https://technelysium.com.au/wp/>) y procesadas mediante análisis *in silico* con el programa BLAST, después fueron comparadas con la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) analizando el porcentaje de similitud con las secuencias del gen depositadas en el GenBank. En la Tabla V se describe la identificación de las cepas analizadas.

Tabla V. Identificación molecular de las cepas bacterianas aisladas mediante la secuenciación del gen 16S ARNr. Fuente: BLAST, GenBank.

CEPA	ID DE SECUENCIAS REFERENCIAS	CEPAS REFERENCIAS	% SIMILITUD
Bx3	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	MCCC 1A08372	98
	<i>Bacillus safensis</i>	NBRC 100820	98
	<i>Bacillus pumilus</i>	NBRC 12092	98
	<i>Bacillus australimaris</i>	MCCC 1A05787	98
Bx4	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	DSM 6963	85
Bx5	<i>Bacillus simplex</i>	LMG 11160	100
	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	DSM 8801	99
Bx6	<i>Bacillus aerius</i>	24K	99
	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a	99
	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	99
	<i>Bacillus xiamenensis</i>	MCCC 1A00008	99
	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	MCCC 1A08372	99
	<i>Bacillus safensis</i>	NBRC 100820	99
	<i>Bacillus pumilus</i>	NBRC 12092	99
	<i>Bacillus australimaris</i>	MCCC 1A05787	99
Bx7	<i>Paenibacillus konkukensis</i>	SK-3146	99
	<i>Paenibacillus yunnanensis</i>	YN2	99
	<i>Paenibacillus vulneris</i>	CCUG 53270	99
Bx8	<i>Bacillus zhangzhouensis</i>	MCCC 1A08372	89
	<i>Bacillus pumilus</i>	NRRL NRS-272	89
	<i>Bacillus safensis</i>	NBRC 100820	89
	<i>Bacillus australimaris</i>	MCCC 1A05787	89
	<i>Bacillus aerius</i>	24K	89
	<i>Bacillus stratosphericus</i>	41KF2a	89
	<i>Bacillus altitudinis</i>	41KF2b	89
Bx9	<i>Bacillus simplex</i>	LMG 11160	99
	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	DSM 8801	99
	<i>Bacillus muralis</i>	LMG 20238	99
	<i>Bacillus butanolivorans</i>	K9	99

Bx10	<i>Bacillus mycooides</i>	NBRC 101228	99
	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	DSM 8801	92
Bx11	<i>Bacillus simplex</i>	LMG 11160	92
	<i>Bacillus coahuilensis</i>	m4-4	92
	<i>Bacillus muralis</i>	LMG 20238	92
	<i>Rhizobium tropici</i>	CIAT 899	100
Bx12	<i>Rhizobium freirei</i>	PRF 81	100
	<i>Rhizobium hainanense</i>	I66	100

Se realizó un análisis filogenético utilizando las secuencias obtenidas del gen 16S ARNr (Figura 15). El análisis filogenético mostró que las cepas Bx3 y Bx6 se encuentran relacionadas a *Bacillus pumilus*, la cepa Bx10 se encuentra asociada a *Bacillus mycooides*, mientras que las cepas Bx5 y Bx9 están relacionadas con *Bacillus simplex*. Por otra parte, la cepa Bx7 se relaciona a *Paenibacillus*. Para la cepa Bx8 no se logró encontrar asociación con el género *Bacillus* ni con *Paenibacillus*.

Cabe destacar que las cepas Bx4 y Bx12 no fueron considerados en el análisis de filogenia, ya que estas pertenecen a los géneros de *Acinetobacter* (agente patógeno de humanos) y a *Rhizobium* (bacteria asociada a la rizosfera de plantas). De la misma manera, la cepa Bx13 tampoco fue incluida en el análisis debido a que no fue posible amplificar el gen 16S ARNr con los iniciadores utilizados.

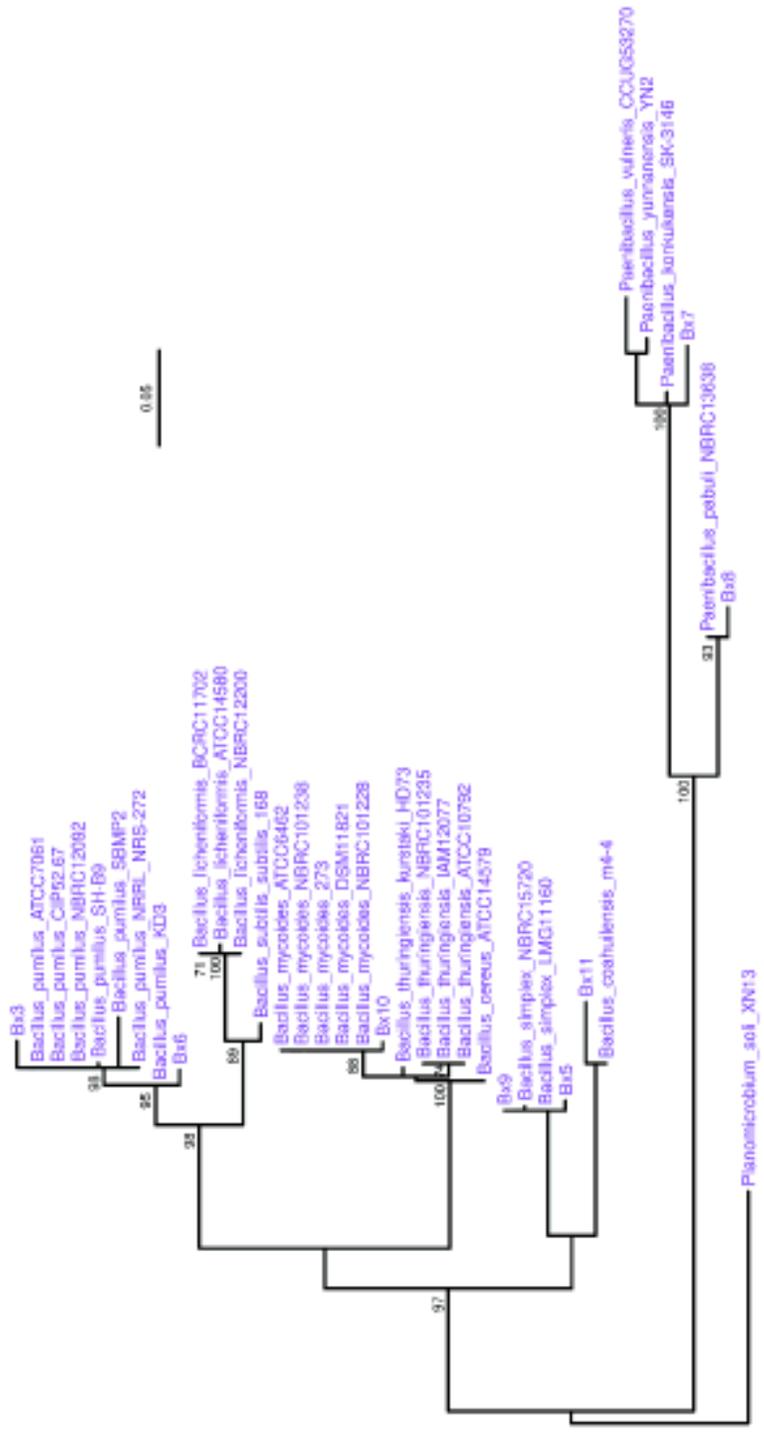


Figura 15. Árbol filogenético del gen 16S ARNr de los aislados de suelos de milpa del Boxo Hidalgo, pertenecientes al género *Bacillus*.

VII. 7. Cinética de Crecimiento de *Bacillus mycooides* Cepa Bx10

Una vez evaluada la capacidad antagónica de los aislados bacterianos, se eligió la cepa Bx10, identificada como *Bacillus mycooides*, para caracterizar su crecimiento en un medio de cultivo líquido, Caldo nutritivo. Además, se evaluó el efecto de las temperaturas de 25, 30 y 40°C sobre el crecimiento de la bacteria para determinar la temperatura óptima de crecimiento en el medio específico de esporulación Schaeffer's (Medio SSM). En la Figura 16 se muestra la cinética de crecimiento de la cepa Bx10 a las temperaturas evaluadas. A 25°C se encontró que la bacteria presentó un crecimiento exponencial hasta la hora 8, alcanzando una biomasa máxima (X_M) de 1.42×10^9 células \cdot mL⁻¹ y una velocidad específica de crecimiento (μ) de 0.613 h⁻¹. A partir de la hora 10, se observó la formación de conglomerados de células vegetativas. En bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, como *Bacillus thuringiensis*, se ha detectado que la presencia de conglomerados celulares en la etapa tardía de la fase exponencial del crecimiento, indicando un cambio en la fisiología de la bacteria para el inicio de la esporulación (Datos no publicados). El inicio de la esporulación de la cepa Bx10 inició a las 49 horas con la presencia de bacilos esporulados.

A la temperatura de 30°C, la bacteria presentó un crecimiento exponencial hasta las 6 horas, alcanzando una $X_M = 1.3 \times 10^9$ células \cdot mL⁻¹ y una $\mu = 0.548$ h⁻¹. Posteriormente, se observaron conglomerados de células vegetativas y a partir de la hora 28 se detectaron bacilos esporulados indicando el inicio de esporulación. Por otra parte, a una temperatura de 40°C no se detectó crecimiento celular, lo que indicó que dicha temperatura fue letal para la bacteria.

Resumiendo, *Bacillus mycooides* cepa Bx10 creció adecuadamente tanto a 25°C como a 30°C alcanzando biomasa máxima similares. Sin embargo, a 30°C el inicio de la esporulación fue más acelerado (28 horas) con respecto a 25°C (49 horas). Estos resultados sugieren que la temperatura de 30°C es adecuada para la producción más acelerada de biomasa de *B. mycooides* cepa Bx10. Los datos de ambas curvas de crecimiento tienen una R^2 de 0.93 y 0.92, indicando una buena correlación de los datos experimentales con el modelo de crecimiento exponencial, al cual fueron ajustados los datos para la determinación de los parámetros cinéticos (Tabla VI).

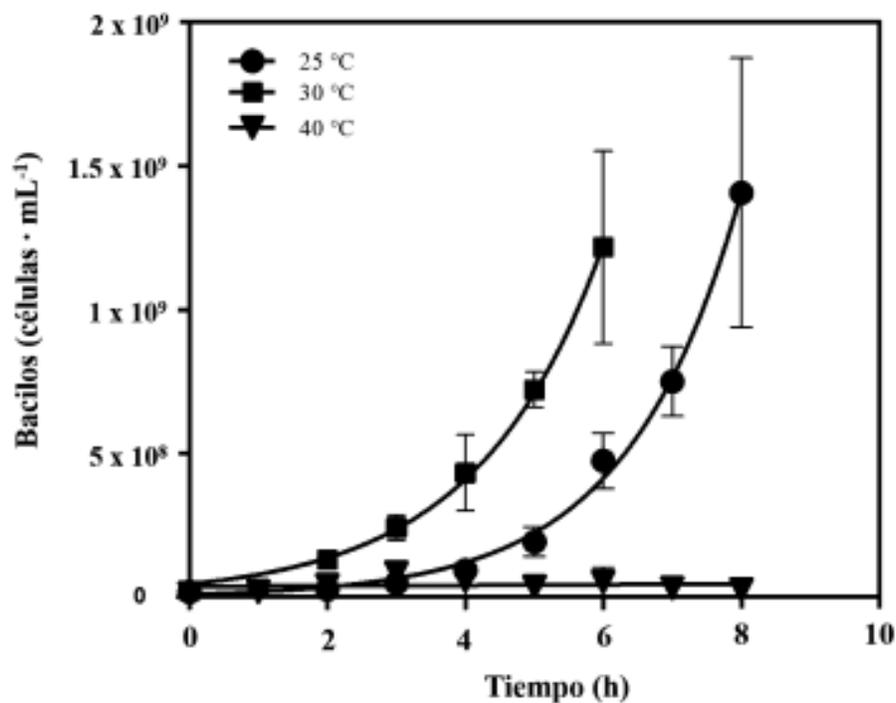


Figura 16. Curvas de crecimiento de *Bacillus mycooides* a diferentes temperaturas ajustado al modelo exponencial.

Tabla VI. Parámetros cinéticos de las curvas de crecimiento de *Bacillus mycooides* cepa Bx10 a diferentes temperaturas. μ = Velocidad específica de crecimiento (h^{-1}), X_M = Biomasa máxima, R^2 = Coeficiente de determinación.

TEMPERATURA	TIEMPO (h)	μ (h^{-1})	X_M (células · mL ⁻¹)	R^2
25°C	8	0.613 ± 0.116	1.42×10^9	0.93
30°C	6	0.548 ± 0.122	1.3×10^9	0.92
40°C	-	-	-	-

VIII. DISCUSIÓN

VIII.1. Fertilidad y Salinidad del Suelo de Milpa de El Boxo Hidalgo

De acuerdo a las características de textura, el suelo de milpa de la comunidad de El Boxo corresponde a un tipo de suelo franco arcilloso (FA), el cual posee características distintivas como el predominio de partículas finas menores a un diámetro de 0.002 mm, posee baja circulación de agua y aire en la matriz del suelo, así como alta retención de minerales. Este tipo de suelo resulta importante para la fertilidad, debido a que retiene minerales al formar agregados con el humus, alta capacidad de retención de agua y almacenamiento de nutrientes. Debido a la poca aireación y permeabilidad, se genera una saturación del suelo, que conlleva al estancamiento superficial del agua al no tener infiltración, provocando un ambiente anóxico, en cambio la presencia de materia orgánica le confiere mayor tamaño de poros, mejorando la permeabilidad y aireación (Douglas et al., 1980). Por la naturaleza coloidal de sus partículas, los suelos arcillosos retienen gran cantidad de minerales. Los suelos arcillosos tienen una tendencia a retener el hierro y en menor medida aluminio; además, la retención de humedad conduce a la generación de procesos de oxidación, lo que le confiere al suelo una coloración rojiza-amarillenta (Porta et al., 2003).

El análisis de suelos agrícolas tipo franco arcilloso destinados al sistema de cultivo tradicional milpa de la comunidad de El Boxo, Hidalgo indicó un porcentaje de materia orgánica (M.O.) del 3.61%, el cual se refiere al contenido de carbono orgánico en el suelo. Según lo descrito en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, se considera que este contenido de M.O. es alta, siendo el rango de 3.6 – 6.0%. Una mayor presencia de materia orgánica aumenta el contenido de nutrientes del suelo, favorece la microestructura y eleva la capacidad de intercambio catiónico, así mismo influye en la retención de agua, estructura y aireación del suelo. En general, el alto contenido de materia orgánica favorece el desarrollo de

microorganismos edáficos (Garrido-Valero, 1993; Porta et al., 1986). Por otro lado, el suelo presentó un pH de 6.70 considerado según la NOM-21 como un pH neutro (6.6 a 7.3). El pH presente en el suelo es importante ya que controla las reacciones químicas y biológicas (NOM-021). Un pH neutro favorece el desarrollo de plantas cultivadas, de acuerdo con Garrido-Valero (1993), el desarrollo óptimo se presenta en valores cercanos a la neutralidad, debido a que los nutrientes se encuentran disponibles (solubles) para su absorción y en un equilibrio constante (Barbaro et al., 2018).

En relación a la conductividad eléctrica (CE), ésta representa la concentración de sales solubles presentes en la solución del sustrato y es medida por la capacidad de conducir la corriente eléctrica, por lo tanto, a mayor salinidad, mayor conductividad (Barbaro et al., 2018). El suelo presentó una CE de 1.75 mmhos, lo cual según la NOM-021, se considera como un sustrato ligeramente salino. Los suelos con una alta concentración de sales impiden el buen desarrollo de las plantas, concentraciones mayores a 16.0 mmhos son consideradas fuertemente salinas (Garrido-Valero, 1993). Según García y Jáuregui (2008), la salinidad es uno de los principales factores abióticos que limitan la productividad agrícola, debido a que la mayoría de las plantas cultivadas resultan sensibles a las altas concentraciones de salinidad, provocando en estas la reducción del desarrollo, pérdida de turgencia y reducción de expansión foliar (Leidi y Pardo, 2002).

La fertilidad del suelo se basa en los elementos con funciones específicas y esenciales del metabolismo de las plantas, y estos se clasifican, según sus concentraciones y requerimiento para el desarrollo en estas, en macro y micronutrientes (Kirkby y Römheld, 2007). El fósforo (P), potasio (K) y el nitrógeno (N) son los macronutrientes requeridos por las plantas para presentar un crecimiento óptimo. El análisis de suelo indicó una concentración de 196.6 ppm de fosfatos, considerado por la NOM-021 como “suelo con alto contenido en fósforo”, además de 289 ppm de potasio disponible, el cual es clasificado como nivel medio con un rendimiento esperado del 85 al 95%, siendo el rango de 131 a 175 ppm considerado el óptimo de concentración de potasio en el suelo (Espinoza et al., 2012). Por último, el nitrógeno del suelo se encuentra formando parte de los residuos de cosecha, abonos orgánicos o en los microorganismos del suelo, por lo tanto, se libera paulatinamente para ser utilizado por las plantas, por lo que la medida analítica de nitrógeno no expresa la cantidad realmente disponible

(Garrido-Valero, 1993). El análisis de suelo indicó 47.4 ppm de nitrógeno en nitratos, el cual según la NOM-021 considera como “suelo con muy alto contenido en nitrógeno” (> 0.25).

Entre los micronutrientes del suelo se encuentran principalmente calcio (Ca), hierro (Fe), magnesio (Mg), manganeso (Mn), cobre (Cu) y Zinc (Zn). Aunque estos elementos se encuentran en bajas concentraciones en el suelo, representan la misma importancia que los macronutrientes para el crecimiento de los cultivos (Kirkby y Römheld, 2007). Las concentraciones de los micronutrientes Ca, Mg, S y Fe del suelo de milpas del Boxo fueron de 7,680 ppm, 570 ppm, 20 ppm y 4.5 ppm, respectivamente, dichos valores lo clasifican como un suelo con alto contenido de dichos micronutrientes de acuerdo con la NOM-02. En lo que respecta a Na, el suelo presentó una concentración de 92 ppm, valor por debajo del límite que resulta tóxico para las plantas (>100 ppm) (Smart Fertilizer Management, 2014; Espinoza et al., 2012). En cuanto al cobre (Cu) concentraciones iguales o similares a 0.2 ppm son consideradas óptimas, sin embargo, el análisis indicó 2.2 ppm de cobre, lo que lo clasifica como un suelo con “nivel medio en concentraciones de Cu” (NOM-021). Para el zinc, lo adecuado son valores entre 4.0 a 8.0 ppm, donde el suelo analizado tuvo 11 ppm resultando por arriba del óptimo establecido. Por último, valores mayores a 1.0 ppm para el manganeso (>1.0) donde el suelo analizado tuvo 5.5 ppm de manganeso el cual se puede considerar como adecuado (NOM-021, Espinoza et al., 2012).

De manera general, los resultados de fertilidad y salinidad del suelo de milpa de Hidalgo, indican que dicho suelo posee un alto contenido de materia orgánica con concentraciones de macro y micronutrientes necesarios para favorecer el crecimiento y desarrollo de los cultivos. Estos resultados coinciden con las características que han sido descritas para suelos de sistemas milpa, en los cuales se llevan a cabo prácticas agrícolas tales como la reincorporación del rastrojo de las plantas, en el que no se utilizan agroquímicos y no se practican actividades agrícolas degradativas de los suelos, por lo que existen condiciones adecuadas de fertilidad y salinidad, lo que favorece la conservación de una amplia diversidad de microorganismos benéficos para las plantas.

VIII.2. Aislamiento y Caracterización Morfológica de los Aislados Bacterianos

La naturaleza del suelo agrícola sin perturbaciones y alto contenido de materia orgánica, que distinguen al sistema milpa tradicional, en el que no se utilizan agroquímicos para el control de plagas y enfermedades, lo que conlleva a que estos tipos de suelos conserven una amplia diversidad de microorganismos benéficos para las plantas (Ebel et al., 2017).

Földes et al. (2000) reportaron que, para el aislamiento de bacterias formadoras de esporas, como *Bacillus*, se consideran adecuadas las técnicas que consideren la termo-resistencia de las endosporas bacterianas. En el presente trabajo de investigación, dicho estrategia permitió el aislamiento de 12 cepas bacterianas con capacidad de producir endosporas y con características morfológicas reportadas para *Bacillus*. El género *Bacillus* es considerado un grupo cosmopolita, ya que las especies que pertenecen a este género se encuentran distribuidas en un amplio número de ecosistemas (Tejera-Hernández et al., 2011). La amplia distribución de las especies del género se debe a la producción de endosporas bacterianas, las cuales son definidas como estructuras refráctiles, de forma redonda, ovalada o cilíndrica formadas dentro de las bacterias y que utilizan como estrategia de supervivencia bajo condiciones ambientales desfavorables. Dicha propiedad, le confiere a la célula bacteriana, resistencia ante agentes químicos y físicos, otorgándole a algunas especies del género, una alta patogenicidad y predominancia en ambientes como en el suelo (Slepecky y Hemphill, 2006).

VIII.3. Fenotipo de Proteasas Extracelulares de los Aislados Bacterianos

En el presente estudio se encontró que, de las 12 cepas aisladas del suelo arcilloso, 10 presentaron actividad proteolítica positiva. Las especies del género *Bacillus* resultan de gran interés biológico como fuente de producción de enzimas extracelulares. Diversos estudios han señalado que este género bacteriano produce enzimas hidrolíticas como proteasas y quitinasas,

las cuales son utilizadas en la industria de los alimentos, farmacéutica y en la producción de detergentes, asimismo en el control biológico de plagas en agricultura (Doi, 1991; Grebeshova et al., 1998; Rodas-Junco et al., 2009). Las proteasas son enzimas que hidrolizan los enlaces peptídicos específicos de las proteínas, llevando a cabo la degradación completa o parcial de estas macromoléculas, provocando su inactivación o pérdida de su función biológica (García-González et al., 2017).

Por otra parte, las proteasas desempeñan un papel importante dentro del proceso antagónico de los microorganismos contra organismos plaga. En este sentido, se ha descrito al fenotipo de producción de proteasas extracelulares como uno de los principales procesos de patogenicidad de organismos antagónicos contra agentes fitopatógenos blanco (López-Llorca et al., 2002). En este mecanismo, las proteasas llevan a cabo la degradación de la pared celular de los hongos fitopatógenos, la cual está constituida principalmente por glicoproteínas, polisacáridos, de entre otros. Esto provoca el deterioro de la pared celular, lo que podría significar el inicio del antagonismo con la entrada de la bacteria al organismo patógeno (Villarreal-Delgado et al., 2017). Además de las proteasas, las quitinasas, lipasas, quitobiasas y lipooxigenasas son las principales enzimas que participan en el proceso de antagonismo de bacterias contra fitopatógenos (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra, 2009).

VIII.4. Fenotipo de Movilidad de los Aislados Bacterianos: *Swimming* y *Swarming*

Las pruebas de movilidad, realizadas en el presente estudio, mostraron que las bacterias aisladas identificadas como Bx1, Bx3, Bx4 y Bx6 son capaces de producir tanto *swarming* como *swimming*, mientras que la cepa Bx8 sólo presentó el mecanismo de *swimming*.

La movilidad de las especies del género *Bacillus*, entre otras características ya mencionadas, le facilita a la bacteria a llevar a cabo la colonización de las plantas (Tejera-Hernández et al., 2011). Dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y las condiciones de la superficie, las bacterias son capaces de colonizar mayores extensiones en el medio natural o artificial, como invadir el tejido del huésped o la preparación de liberación de esporas para esperar un ambiente favorable (Harshey, 2003). Usualmente, en un ambiente controlado, la

bacteria tiene disponibilidad de nutrientes en el medio. Sin embargo, en condiciones naturales, la competencia por nutrientes entre otros organismos es elevada, por lo cual resultan importantes los mecanismos de supervivencia, como la movilidad de la célula, que le permita una ventaja sobre sus competidores (Loredo-Osti et al., 2004). Por ejemplo, en bacterias como *B. subtilis* a concentraciones intermedias de nutrientes en el medio de cultivo, desarrolla patrones dendríticos que aumentan el área de superficie de la colonia para permitir una absorción más eficiente de nutrientes. Dentro de la colonia se desarrollan grupos de células altamente móviles y moderadamente alargadas, envueltas en una estructura de exopolímero, las que avanzan conforme las células del centro empujan dicha estructura, conformando un proceso colectivo llamado *swarming* (Henrichsen, 1972; Shapiro, 1998). Así mismo, la colonización de bacterias benéficas en los cultivos, pueden provocar una respuesta favorable mediante el uso de bacterias antagónicas contra patógenos o promotoras de crecimiento.

Los mecanismos de *swimming* y *swarming* han sido correlacionados con bacterias con presencia de flagelos por Henrichsen (1972). También se describió el mecanismo de *swimming* como un tipo de translocación de superficie producida por la acción de flagelos, pero diferente a *swarming*, debido a que no hay secreción de exopolímeros, por lo que a diferencia necesita una capa de agua en el medio, siendo este un factor importante para la movilidad bacteriana. En este sentido, la capacidad de las bacterias para colonizar plantas no sólo depende de su abundancia, sino también, de su capacidad de proliferar a través de la rizosfera, tallo u hojas mediante los mecanismos mencionados (Loredo-Osti et al., 2004).

VIII.5. Actividad Antagónica de los Aislados Bacterianos contra *Fusarium* sp.

La identificación morfológica y molecular de la cepa de *Fusarium*, utilizada en el presente estudio, indicó que corresponde a *Fusarium graminearum*. Este hongo se ha convertido en el fitopatógeno fúngico más estudiado en plantas, debido a que se distribuye por todo el mundo causando enfermedades, principalmente en cultivos de cebada, maíz y trigo. Las infecciones de los cultivos con *Fusarium* causan pérdidas en los rendimientos de cultivos agrícolas, pérdidas económicas y produce micotoxinas como deoxinivalenol, nivalenol, zearalenona, entre otras,

que son metabolitos secundarios producidos por los hongos que pueden causar enfermedades en humanos y animales. Cabe destacar, que *F. graminearum* es la especie del género mayor productora de micotoxinas (Goswami y Kistler, 2004; Fernández-Pinto et al., 2008; Babadoost, 2018).

De las 12 cepas bacterianas aisladas, se encontró que 8 presentaron actividad antagonica contra *Fusarium graminearum*. Las cepas Bx3, Bx4, Bx8, Bx10 y Bx13 presentaron mayor actividad antagonica *in vitro*, mientras que las cepas Bx1, Bx6, Bx7 tuvieron una actividad parcial causando alguna alteración en el crecimiento del hongo. Se ha reportado que algunas especies del género *Bacillus* inhiben el crecimiento de organismos fitopatógenos, controlando enfermedades de cultivos agrícolas, siendo una de las principales aplicaciones de estos microorganismos (Villarreal-Delgado et al., 2017; Fira et al., 2018).

Existen pocas especies bacterianas que han sido descritas como antagonistas de *Fusarium* y capaces de reducir su población (McSpadden, 2004; Popiel et al., 2008). Dentro de éstas, se han definido a los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* como grupos de bacterias capaces de promover la salud de los cultivos suprimiendo fitopatógenos y plagas; algunas especies documentadas son: *B. amyloliquefaciens*, *B. cereus*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. mycoides* y *B. pumilus*. Los mecanismos de control biológico, utilizados por estas especies, incluyen el desarrollo de competencia por alimento y espacio, estimulación de la planta huésped mediante la inducción de tolerancia o resistencia, la producción de compuestos o enzimas antifúngicas, o bien, antibiosis. Siendo este último, un mecanismo altamente efectivo para la prevención y control de patógenos en la rizosfera (Matar et al., 2009). Algunas bacterias también pueden estimular las defensas de la planta antes de que la infección suceda, facilitando la absorción de nutrientes, fijando directamente el nitrógeno y promoviendo la simbiosis de la rizosfera y micorrizas (McSpadden, 2004). Debido a que las bacterias del género *Bacillus* habitan de manera natural en el suelo, como estrategias de control biológico se recomienda el uso de aislados bacterianos obtenidos directamente de los nichos donde habita el fitopatógeno que se desea controlar. De esta manera, se pretende incrementar las poblaciones del microorganismo benéfico y controlar más efectivamente al agente fitopatógeno mediante mecanismos de antagonismo.

VIII.6. Identificación Molecular de los Aislados Bacterianos

La identificación molecular de los aislados bacterianos obtenidos en el presente trabajo, así como el análisis filogenético, indicaron que las cepas Bx3 y Bx6 corresponden a *Bacillus pumilus*, mientras que la cepa Bx10 corresponde a *Bacillus mycooides*. Por lo que respecta a las cepas Bx5 y Bx9 corresponden a *Bacillus simplex* y la cepa Bx7 se relaciona con *Paenibacillus*. Las especies de *Bacillus* y el género *Paenibacillus* son bacterias de importancia en agricultura, ya que se ha reportado que algunas participan promoviendo el crecimiento vegetal o antagonizando a agentes fitopatógenos.

La especie de *B. pumilus* se encuentra normalmente en el suelo y es utilizada en la agricultura como ingrediente activo en fungicidas (E.P.A, 2003). Dicha especie se ha identificado como rizobacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPR) favoreciendo la elongación del tallo y como productora de metabolitos secundarios antifúngicos inhibiendo el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Munimbazi y Bullerman, 1998; Gutiérrez-Mañero et al., 2001).

En el caso de *B. mycooides*, esta bacteria se encuentra principalmente en el suelo y es fenotípicamente similar a los miembros del grupo de *B. cereus* (De Vos et al., 2009). Se conoce, que dicha especie ha sido reportada como agente de biocontrol contra hongos fitopatógenos, como *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* y *Sclerotium rolfsii*, agentes causantes de pudrición de la raíz del frijol. De igual manera, se reportó el uso de esta bacteria para la inducción de resistencia sistémica en plantas de betabel contra la enfermedad de macha foliar producida por *Cercospora beticola* (Bargabus et al., 2002; Ghazal et al., 2013). Cabe destacar que en el presente estudio, la cepa Bx10 de *B. mycooides* fue una de las cepas con mayor actividad antagónica frente al hongo de *F. graminearum*. Por otro lado, *B. mycooides* también ha sido utilizada en procesos de optimización de crecimiento, acumulación de polímeros y como agente eficiente para la biodegradación de trinitrotolueno (TNT) en aguas residuales (Borah et al., 2002; Lin et al., 2013).

Por otro lado, se describe a *B. simplex* como una bacteria incapaz de fijar nitrógeno, por lo tanto, no es considerada como bacteria promotora de crecimiento; sin embargo, en el estudio realizado por Schwartz et al. (2013), se encontró que las plantas de guisantes inoculadas con esta bacteria desarrollaron una promoción en el crecimiento y desarrollo de las raíces. Además, en el mismo estudio, se demostró la actividad antifúngica de la cepa contra los hongos *F. oxysporum* y *F. verticillioides*.

El género *Paenibacillus*, comprende bacterias anaerobias facultativas formadoras de endosporas, la mayoría de las cepas del género han sido aisladas del suelo, usualmente asociadas a las raíces de las plantas. *Paenibacillus* es capaz de promover el crecimiento de cultivos mediante diferentes mecanismos como la solubilización de fosfato, la capacidad de fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas y sideróforos. Las especies de este género desarrollan una actividad de biocontrol debido a su producción de antimicrobianos y a la activación de la resistencia inducida en las plantas (Grady et al., 2016). Es importante destacar que anteriormente las especies de este género se encontraban incluidas dentro del género *Bacillus*, pero debido a la introducción de la secuenciación del gen 16S ARNr, *Paenibacillus* fue reclasificado como un género distinto en 1993 (Ash et al., 1993; Zeigler, 2013).

Las cepas Bx3 y Bx6 identificadas como *B. pumilus* presentaron ambos tipos de movilidad *swimming* y *swarming*, a diferencia de la cepa Bx8 que sólo presentó *swimming*. Por otro lado, todas las cepas identificadas, a excepción de *Paenibacillus* Bx7 mostraron actividad proteolítica positiva, de las cuales *B. pumilus* (cepas Bx3 y Bx6), *Paenibacillus* (Bx7) y *B. mycoides* (Bx10) presentaron actividad antagónica contra *F. graminearum* provocando alguna alteración en el crecimiento y desarrollo del hongo fitopatógeno.

Por otro lado, las cepas Bx5 y Bx9 identificadas como *B. simplex*, no presentaron actividad antagónica, sin embargo, podrían estar relacionadas con la promoción de crecimiento y desarrollo de las plantas, siendo un factor importante en el desarrollo del cultivo. En este mismo contexto, la cepa Bx7 de *Paenibacillus*, no presentó los fenotipos de proteasas extracelulares y movilidad, pero sí presentó actividad antagónica, lo que sugiere que esta cepa utiliza otro método de control biológico diferente de los aquí probados, posiblemente la secreción de metabolitos fungicidas.

Las cepas de *Bacillus pumilus* Bx3 y Bx6 presentaron movilidad y actividad proteolítica positiva, así como actividad antagónica, lo que podría indicar una producción de enzimas

hidrolíticas que pueden estar implicadas en procesos de patogenicidad de organismos antagonicos contra agentes fitopatogénos; asimismo la producción de enzimas le podría proporcionar a la bacteria una alternativa para la obtención de nutrientes. Por otro lado, la capacidad de movilidad de la bacteria le podría facilitar la circulación a través del medio natural o la planta, siendo un factor decisivo en la supervivencia de ésta, facilitando la obtención de nutrientes en un ambiente de competencia con otros organismos.

VIII.7. Cinética de Crecimiento de *Bacillus mycoides* cepa Bx10

La cepa Bx10 de *B. mycoides* presentó una importante actividad antagonica *in vitro* en contra del hongo fitopatogénico *F. graminearum*, por lo que representa ser una cepa potencial para ser utilizada en evaluaciones en campo que permitan comprobar la efectividad de su actividad antifúngica. En el presente trabajo, se realizó la evaluación del crecimiento de la cepa Bx10 en un cultivo sumergido utilizando un medio específico de esporulación. De acuerdo a los resultados obtenidos, la cepa Bx10 presentó un crecimiento más acelerado óptimo a 30°C y una producción de endosporas a partir de las 28 h de cultivo, en las condiciones evaluadas. Estos resultados serán la base para el establecimiento de un sistema para la producción para la elaboración de un biopreparado que pueda utilizarse en el sector agrícola.

IX. CONCLUSIONES

Las actividades agrícolas tradicionales desarrolladas en el sistema milpa de El Boxo, Hidalgo, fomentan el contenido de materia orgánica presente en el suelo, lo que se traduce en suelos con alto contenido de materia orgánica y nutrientes que favorecen el desarrollo de los cultivos, a la vez que propician la conservación de la diversidad de microorganismos benéficos para las plantas, como las especies del género *Bacillus*.

A partir de esta investigación en este tipo de suelo, se logró el aislamiento de 12 cepas bacterianas capaces de producir endosporas y que, de acuerdo a su caracterización biológica, presentaron características morfológicas correspondientes a las descritas para el género de *Bacillus*.

Del total de los aislamientos bacterianos obtenidos, se identificaron ocho cepas con posible actividad proteolítica, cinco con movilidad de *swarming* y cuatro con movilidad *swimming*, dichos fenotipos podrían estar involucrados en procesos de interacción bacteria-planta y en la actividad antagónica de los aislados hacia agentes fitopatógenos presentes en el suelo.

El presente trabajo permitió aislar seis cepas bacterianas del género *Bacillus* con actividad antagónica *in vitro* y potencial para ser utilizadas en estrategias de biocontrol contra el hongo fitopatógeno identificado como *Fusarium graminearum*; causante de importantes problemas agrícolas en cultivos de maíz en Hidalgo.

Los aislamientos bacterianos que se identificaron de forma molecular mediante el análisis filogenético en esta investigación corresponden a *Bacillus pumilus* (Cepas Bx3 y Bx6), *Bacillus simplex* (Cepas Bx5 y Bx9), *Bacillus mycoides* (Cepa Bx10) y *Paenibacillus* (Cepa Bx7). Dichas cepas resultan de importancia en la agricultura, ya que algunas podrían estar implicadas en la promoción de crecimiento vegetal o antagonismo de fitopatógenos.

La cepa Bx10 identificada como *Bacillus mycoides* fue uno de los aislados que presentó mayor actividad antagónica contra *F. graminearum*, por lo que fue seleccionada para la caracterización de su crecimiento en cultivo líquido a diferentes temperaturas. *B. mycoides*

presentó una temperatura óptima de crecimiento a 30°C y una producción de endosporas a partir de las 28 h de cultivo. Estos resultados serán la base para el establecimiento de las condiciones de producción de *B. mycooides* Bx10 para la elaboración de un biopreparado.

De manera general, el presente trabajo permitió obtener cepas del género *Bacillus* con capacidad antagónica contra *F. graminearum*, uno de los principales hongos fitopatógenos a nivel mundial.

Algunas cepas aisladas y caracterizadas de *Bacillus* podrían estar relacionadas con la promoción de crecimiento y desarrollo de las plantas de la milpa. Dicha información podrá ser utilizada en un mediano plazo para el diseño de biofertilizantes y biopesticidas, así como generar estrategias de aplicación en los sistemas agrícolas, como maíz, en Hidalgo.

X. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente trabajo, se hacen las siguientes recomendaciones que permitirán continuar con la misma línea de investigación:

1. Caracterizar taxonómicamente las cepas bacterianas que no pudieron ser identificadas por 16S ARNr; por ejemplo, utilizando tipificación multilocus de secuencias.
2. Evaluar la capacidad de las cepas bacterianas aisladas obtenidas para el desarrollo de actividades biológicas como producción de sideróforos, fijación de nitrógeno y producción de quitinasas.
3. Evaluar la efectividad de las cepas de *Bacillus*, principalmente la cepa Bx10, *Bacillus mycoides* que presentaron actividad antagónica *in vitro* contra el hongo *Fusarium graminearum*, mediante experimentos con plantas de maíz infectadas a nivel piloto en el laboratorio o en evaluaciones directamente en el campo.

XI. LITERATURA CITADA

- Arbeláez, G. 2000. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. *Agronomía colombiana*, 17: 11-16.
- Ash, C., F. Priest y M.D. Collins. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 64: 253-260.
- Babadoost, M. 2018. *Fusarium*: Historical and Continued Importance. *IntechOpen*, 2: 13-22.
- Barbaro, A.L., M.A. Karlanian y D.A. Mata. 2018. Importancia del pH y la conductividad eléctrica (CE) en los sustratos para plantas. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Bargabus, R., N., Zidack, J. Sherwood, y B. Jacobsen. 2002. Characterization of systemic resistance in sugar beet elicited by a non-pathogenic, phyllosphere-colonizing *Bacillus mycooides*, biological control agent. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 61(5): 289-298.
- Borah, B., P.S. Thakur y J.N. Nigam. 2002. The influence of nutritional and environmental conditions on the accumulation of poly-b-hydroxybutyrate in *Bacillus mycooides* RLJ B-017. *Journal of Applied Microbiology*, 92(4): 776-83.
- Brussaard, L. 1997. Biodiversity and Ecosystem Functioning in Soil. *SpringerAMBIO*, (26): 563-570.
- Buenrostro, M. 2009. Las bondades de la milpa. *Ciencias*, 92: 30-32.
- Cabrera, R., J. Rocha, V. Flores, L. Vázquez-Moreno, G. Guarneros, G. Olmedo, A. Rodríguez-Romero y M. de la Torre. 2014. Regulation of sporulation initiation by NprR and its signaling peptide NprRB: molecular recognition and conformational changes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(22): 9399-9412.
- Carrillo-Rayas, M.T. y A. Blanco-Labra. 2009. Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. *Acta Universitaria*, 19(2): 40-49.
- Chenu, C. y G. Stotzky. 2002. Interactions between Microorganisms and Soil Particles: An Overview. *John Wiley & Sons, Ltd.*, 1: 3-40.

- Clegg, C. y P. Murray. 2002. Soil microbial ecology and plant root interactions. *Iger Innovations*, 6: 36-39.
- De Vos, P., G.M. Garrity, D. Jones, N.R. Krieg, W. Ludwig, F.A. Rainey, K.H. Schleifer y W.B. Whitman. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. The Firmicutes*. Springer. New York, USA.
- Doi, R.H. 1991. Proteolytic activities in *Bacillus*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2(5): 682-4.
- Douglas, J.T., M.J. Goss y D. Hill. 1980. Measurements of pore characteristics in a clay soil under ploughing and direct drilling, including use of a radioactive tracer (^{144}Ce) technique. *Soil Tillage Res*, 1: 11-18.
- Eart Microbiome Project. 2016. Illumina 16S Primer Constructs (shorter: 515FB–806RB). EARTmicrobiome.org. Reporte subido octubre, 2016. (<http://www.earthmicrobiome.org/protocols-and-standards/16s/>).
- Ebel, R., J.G. Pozas-Cárdenas, F. Soria-Miranda y J. Cruz-González. 2017. Manejo orgánico de la milpa: rendimiento de maíz, frijol y calabaza en monocultivo y policultivo. *Terra Latinoamericana*, 35(2): 149-160.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5): 1792-1797.
- Espinoza, L., N. Slaton y M. Mozaddari. 2012. *Cómo Interpretar los Resultados de los Análisis de Suelos*. Division of Agriculture. Research and Extension. University of Arkansas System.
- Fernández-Pinto, V.E., L.A. Terminiello, J.C. Basilico, y A. Ritieni. 2008. Natural occurrence of nivalenol and mycotoxigenic potential of *Fusarium graminearum* strains in wheat affected by head blight in Argentina. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1): 157-162.
- Fester, K.R. 2005. *Microbiology the easy way*. Ed. Barron's. Estados Unidos.
- Figueroa-Rivera, M.G., R. Rodríguez-Guerra, B.Z. Guerrero-Aguilar, M.M. González-Chavira, J.L. Pons-Hernández, J.F. Jiménez-Bremont, J.G. Ramírez-Pimentel, E. Andrio-Enríquez y M. Mendoza-Elos. 2010. Characterization of *Fusarium* Species Associated with Rotting of Corn Root in Guanajuato, Mexico. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2): 124-134.
- Fira, D., I. Dimkić, T. Berić, J. Lozo y S. Stanković. 2018. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285: 44-55.

- Földes, T., I. Bánhegyi, Z. Herpai, L. Varga y J. Szigeti. 2000. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage microorganisms. *Journal of Applied Microbiology*, 89: 840-846.
- Frioni, L. 2005. Microbiología: Básica, ambiental y agrícola. Facultad de Agronomía. Universidad de la República Uruguay.
- García, I. 2018. Hidalgo, noveno lugar en producción de maíz. [Hidalgo.quadratin.com.mx](https://hidalgo.quadratin.com.mx/principal/hidalgo-noveno-lugar-en-produccion-de-maiz/). Reporte subido 23 de julio, 2018. (<https://hidalgo.quadratin.com.mx/principal/hidalgo-noveno-lugar-en-produccion-de-maiz/>).
- García, M. y D. Jáuregui. 2008. Efecto de la salinización con NaCl o Na₂SO₄ sobre la anatomía foliar en dos genotipos de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) con tolerancia salina diferencial. *ERNSTIA*, 18(1): 89-105.
- García-Aguirre, G. y R. Martínez-Flores. 2010. Especies de *Fusarium* en granos de maíz recién cosechado y desgranado en el campo en la región de Ciudad Serdán, Puebla. *Revista mexicana de biodiversidad*, 81(1): 15-20.
- García-González, F., G.M. Gutiérrez-Benicio, G. Iturriaga, J.C. Raya-Pérez, A. Blanco-Labra, J.G. Ramírez-Pimientel, T. García-Gasca y C.L. Aguirre-Mancilla. 2017. Biocontrol de insectos plaga: Origen de las estrategias y tendencias actuales. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria* (5)2: 1-10.
- García-López, H. 2017. Actinomicetos del Alto Mezquital con potencial biotecnológico: Aislamiento, caracterización e identificación. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Texcoco, México.
- Garrido-Valero, M.S. 1993. Interpretación de análisis de suelos. Guía práctica para muestrear los suelos e interpretar sus análisis. Instituto Nacional de Reforma y Desarrollo Agrario. Madrid.
- Ghazal, M.F., L.A. Moussa, S.A. Fayed y A.A. Mostfa. 2013. The use of *Bacillus mycoides* and *Bacillus subtilis* as biocontrol agents for the fungi causing root rot disease in common bean. *Egypt Journal of Biotechnology*, 44: 37-50.
- Gibbons, N.E. y R.G.E. Murray. 1978. Proposals concerning the higher taxa of bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 28: 1-6.
- Gil-Ribes, J.A., R. Ordóñez-Fernández, E.J. González Sánchez, Ó. Veroz-González, M. Gómez-Ariza y F. Sánchez-Ruiz. 2017. Los beneficios de la Agricultura de Conservación en un entorno de cambio climático. Asociación Española de Agricultura de Conservación Suelos Vivos.

- González, H.A., Vázquez, G.L.M., Sahagún, C.J., Rodríguez, P.J.E., y Pérez, L.D.J. 2007. Rendimiento del maíz de temporal y su relación con la pudrición de mazorca. *Agricultura Técnica en México*, 33: 33-42.
- Goswami, R.S. y H.C. Kistler. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Molecular Plant Pathology*, 5: 515-525.
- Gouy, M., S. Guidon y O. Gascuel. 2010. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and Evolution*, 27(2): 221-224.
- Grady, E.N., J. MacDonald, L. Liu, A. Richman y Z.C. Yuan. 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial Cell Factories*, 15(1): 203-215.
- Grebeshova, R., O. Castellanos y L. Salcedo. 1998. Estudio de las propiedades catalíticas de las proteasas *Bacillus subtilis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1(1): 57-62.
- Gutiérrez-Mañero, F.J., B. Ramos-Solano, A. Probanza, J. Mehouchi, F.R. Tadeo y M. Talon. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum*, 111: 206-211.
- Harshey, R.M. 2003. Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Review of Microbiology*, 57: 249-73.
- Henrichsen, J. 1972. Bacterial surface translocation: Survey and a Classification, 36(4): 478-503.
- Hernández, F. y E. Rodríguez. 1993. El fenómeno de swarming y otros tipos de desplazamiento bacteriano. *Revista Costarricense De Ciencias Médicas*, 14: 39-45.
- Hernández-Montiel, L.G. y M.A. Escalona-Aguilar. 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*. Volumen XVI. No. 1. Xalapa, Veracruz.
- Horikoshi, K., G. Antranikian, A.T. Bull, F.T. Robb y K.O. Stetter. 2011. *Extremophiles Handbook*. Editorial Springer. New York, USA.
- Jacas-Miret, J.A. 2005. *El control biológico de plagas y enfermedades*. Universidad Pública de Navarra. Editorial Universidad de Jaume I. Servicio de Comunicación y Publicaciones, Castellón de la Plana, España.
- Juárez-Becerra, G.P., M.E. Sosa-Morales y A. López-Malo. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: Descripción de métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(3): 14-23.

- Kirkby, E.A. y V. Römheld. 2007. Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility. *Proceedings*, 543: 1-51.
- Kumar, A., A. Prakash y B.N. Johri. 2011. *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. 37-59 p. En: Maheshwari D. (eds) *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Leidi, E. O. y J.M. Pardo. 2002. Tolerancia de los cultivos al estrés salino. *Revista de Investigaciones de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 2(22): 2-10.
- Leslie J.F y B.A. Summerell. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Blackwell Publishing Professional. Iowa, Estados Unidos.
- Lezcano, J.C, B. Martínez y O. Alonso. 2012. Caracterización cultural y morfológica e identificación de diez aislamientos de *Fusarium* procedentes de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas. *Pastos y Forrajes*, 35(2): 187-196.
- Lin, H., C.P. Yu, y Z. Chen. 2013. Aerobic and anaerobic biodegradation of TNT by newly isolated *Bacillus mycoides*. *Ecological Engineering*, 52: 270–277.
- López-Llorca, L.V., T. Carbonell y S. Goómez-Vidal. 2002. Degradation of insect cuticle by *Paecilomyces farinosus* proteases. *Mycological Progress*, 1(3): 249–256.
- López-Rivera, R. 2011. Biodiversidad de la microbiota rizosférica de dos especies solanáceas: *Solanum lycopersicon*, L. y *Datura* spp. (tomate y toloache). Instituto Politécnico Nacional. Sinaloa, México.
- Loredo-Osti, C., L. López-Reyes y D. Espinosa-Victoria. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *Terra Latinoamericana*, 22(2): 225-239.
- Lyngwi, N.A. y S.R. Joshi. 2015. Traditional Sacred Groves, an ethnic strategy for conservation of microbial diversity. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 14(3): 474-480.
- Márquez-Torres, F.J. 2007. Aislamiento y taxonomía de bacterias del género *Bacillus* recolectadas en suelos de un bosque de *Pinus radiata* y una pradera permanente en distintas épocas de muestreo. Tesis de Licenciatura. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. Chile.
- Matar, S.M, S.A. El-Kazzaz, E.E. Wagih, A.I. El-Diwany, H.E. Mostafa, G.A. Abo-Zaid, H.E. Abd-Elsalam, y E.E. Hafez. 2009. Antagonistic and Inhibitory Effect of *Bacillus subtilis* Against Certain Plant Pathogenic Fungi, I. *Biotechnology*, 8(1): 53-61.
- McSpadden, GBB. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* sp. in agricultural systems. *Phytopathol*, 94(11): 1252-1258.

- Mishra, J. y N.K. Arora. 2016. Bioformulations for Plant Growth Promotion and Combating Phytopathogens: A Sustainable Approach. 3-33 p. Bioformulations: for Sustainable Agriculture. En: Arora N., Mehnaz S., Balestrini R. (eds). Springer, New Delhi.
- Montiel-González, L., F. González-Flores, B.M. Sánchez-García, S. Guzmán-Rivera, F.P. Gámez-Vázquez, J.A. Acosta-Gallegos, R. Rodríguez-Guerra, W.J. Simpson, M. Cabral-Enciso y M. Mendoza-Elos. 2005. Especies de *Fusarium* (Link) presentes en raíces de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) con daños de pudriciones, en cinco estados del centro de México. Revista Mexicana de Fitopatología, 23: 1-10.
- Munimbazi, C. y L.B. Bullerman. 1998. Isolation and partial characterization of antifungal metabolites of *Bacillus pumilus*. Journal of Applied Microbiology, 84: 959-968.
- Nannipieri, P., J. Ascher, M.T. Ceccherini, L. Landi, G. Pietramellara y G. Renella. 2002. Microbial diversity and soil functions. European Journal of Soil Science, 68: 12-26.
- Nelson, P.E. 1990. Taxonomy of fungi in the genus *Fusarium* with emphasis on *Fusarium oxysporum*. p. 27-35. En: R. Ploetz (ed.). *Fusarium* wilt of banana. American Phytopathological Society Press. St. Paul.
- Nicholls-Estrada, C.I. 2008. Control biológico de insectos: un enfoque agroecológico. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
- Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis.
- Nortcliff, S., H. Hulpke, C.G. Bannick, K. Terytze, G. Knoop, M. Bredemeier y H. Schulte-Bisping. 2011. Soil, definition, function, and utilization of soil. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- O'May, C. y N. Tufenkji. 2011. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. Applied and Environmental Microbiology, 77(9): 3061–3067.
- Park, D.H., Chuvochina, M., Waite, D.W., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P.A., Hugenholtz, P. 2018. A standardized bacterial taxonomic based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. Nature Biotechnology, 36: 996–1004.
- Pérez-Camarillo, J.P., P. Rivas-Valencia, E. Martínez-Ruiz, A. Cano-Salgado y K. Olvera-Olvera. 2018. Identificación y distribución espacial de *Fusarium* spp. en maíz del Valle de Mezquital,

- Hidalgo. INIFAP.gob.mx. Reporte subido el 23 de Julio, 2018. (<http://inifapcirne.gob.mx/Congreso/RESUMENES%20EN%20PDF/170.pdf>)
- Popiel D., H. Kwaśna, J. Chełkowski, Ł. Stępień y M. Laskowska. 2008. Impact of selected antagonistic fungi on *Fusarium* species – toxigenic cereal pathogens. *Acta Mycologica.*, 43(1): 29-40.
- Porta, J., M. López-Acevedo y C. Roquero. 2003. *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Porta, J., M. López-Acevedo y R. Rodríguez-Ochoa. 1986. *Técnicas y experimentos en edafología*. Colegio Oficial de Ingenieros Agrónomos de Cataluña. Barcelona, España.
- Porta-Casanellas, J. y M. López-Acevedo. 2005. *Agenda de campo de suelos: información de suelos para la agricultura y el medio ambiente*. Universidad de Lleida. Cataluña, España.
- R Core Team. 2018. *A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. (<http://www.R-project.org>).
- Reader, U. y P. Broda. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17-20.
- Reinoso-Pozo, Y., L. Casadesús-Romero, A. García-Suárez, J. Gutiérrez-Pérez y V. Álvarez-Rivera. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*, 10(3): 187-191.
- Rodas-Junco, B., M. Quero-Bautista, H. Magaña-Sevilla y A. Reyes-Ramírez. 2009. Selección de cepas nativas con actividad Quitino-Proteolítica de *Bacillus* sp. aisladas de suelos tropicales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1): 107-113.
- Rodríguez-Velásquez, E.A. 2013. Caracterización de aislamientos de *Fusarium* spp. obtenidos de zonas productoras de uchuva (*Physalis peruviana*) en Cundinamarca y Boyacá. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.
- Roesch, L.F.W., R.R. Fulthorpe, A. Riva, G. Casella, A.K.M. Hadwin, A.D. Kent, S.H. Daroub, F.A.O. Camargo, W.G. Farmerie y E.W. Triplett. 2007. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *The ISME Journal*, 1: 283–290.
- Sánchez-Morales, P. y O. Romero-Arenas. 2016. Evaluación de la sustentabilidad del sistema milpa en el estado de Tlaxcala, México. Centro de Agroecología del Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

- Schaeffer, P., J. Millet, J.P. Aubert. 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. Proceedings of the National Academy of Sciences, 54: 704-711.
- Schwartz, A., I. Ortiz, M. Maymon, C. Herbold, N. Fujishige, J. Vijanderan y A. Hirsch. 2013. *Bacillus simplex*—A Little Known PGPB with Anti-Fungal Activity—Alters Pea Legume Root Architecture and Nodule Morphology When Coinoculated with *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Agronomy*, 3(4): 595–620.
- SEDAGROH. 2016. Secretaría de Desarrollo Agropecuario. Sedagro.hidalgo.gob.mx. Reporte subido marzo, 2016. (<http://sedagro.hidalgo.gob.mx/pag/transparencia.html>).
- Shankar, J. 2015. Microbes: The chief ecological engineers in reinstating equilibrium in degraded ecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 203: 80-82.
- Shapiro, J.A. 1998. Thinking about bacterial populations as multicellular organisms. *Annual Review of Microbiology*, 52: 81-104.
- Slepecky, R.A. y H.E. Hemphill. 2006. The Genus *Bacillus*—Nonmedical. 530-562 p. En: M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.H. Schleifer y E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes*. Nueva York, Estados Unidos.
- Smart Fertilizer Management. 2014. Programa para Fertilización de Cultivos. Disponible en: (<http://www.smart-fertilizer.com/es>).
- Stein, T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4): 845-857.
- Strobel, G., S.K. Singh, S. Riyaz-Ul-Hassan, A.M. Mitchell, B. Geary y J. Sears. 2011. An endophytic/pathogenic *Phoma* sp. from creosote bush producing biologically active volatile compounds having fuel potential. *FEMS Microbiology Letters*, 320(2): 87-94.
- Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences, in *Some Mathematical Questions in Biology: DNA Sequence Analysis. Lectures on Mathematics in the Life Sciences*, 17: 57-86.
- Tejera-Hernández, B., M.M. Rojas-Badía y M. Heydrich-Pérez. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 42(3): 131-138.
- Torsvik, V.L., J. Goksoyr y F.L. Daae. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 56: 782–787.

- U.S. Environmental Protection Agency. 2003. *Bacillus pumilus* strain GB 34 (006493) Fact Sheet. Web.archive.org. Reporte subido 13 de marzo, 2003. (https://web.archive.org/web/20120108044256/http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/factsheets/factsheet_006493.htm).
- UNAN. 2011. Componentes y propiedades del suelo. Edafología 1. Coordinadores Locales del Proyecto Universidad en el Campo.
- Villarreal-Delgado, M.F., E.D. Villa-Rodríguez, L.A. Cira-Chávez., M.I. Estrada-Alvarado, F.I. Parra-Cota y S. De los Santos-Villalobos. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1): 95-130.
- Wang, R., H. Zhang, L. Sun, G. Qi, S. Chen, X. Zhao. 2017. Microbial community composition is related to soil biological and chemical properties and bacterial wilt outbreak. Huazhong Agricultural University, 343(7): 1-10.
- Whipps, J.M. 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. Journal of Experimental Botany, 52: 487-511.
- Yu, G., D.K. Smith, H. Zhu y T.T. Lam. 2017. Ggtree: an r package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. Methods in Ecology and Evolution, 8(1): 28-36.
- Zeigler, D.R. 2013. The family *Paenibacillacea*. *Bacillus* Genetic Stock Center. Ohio, Estados Unidos.
- Zhao, Y., J.N. Selvaraj, F. Xing, L. Zhou, Y. Wang y H. Song. 2014. Antagonistic Action of *Bacillus subtilis* Strain SG6 on *Fusarium graminearum*. PLoS ONE, 9(3): 1-11.