



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE  
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

---

---

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE LICENCIATURA EN  
BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA  
DE BACTERIAS AISLADAS DE SUELOS  
AFECTADOS POR INCENDIOS SUBTERRÁNEOS E  
INFERENCIAS GENÓMICAS DE LA CEPA  
TERMOTOLERANTE *Bacillus* sp. AF12**

**PROYECTO DE TESIS**

Que como requisito parcial para obtener  
El título profesional de

**LICENCIADO EN BIOTECNOLOGÍA**

Presenta

**Salvador Chávez Avila**

Director de tesis:  
D.C. Gustavo Santoyo Pizano



Morelia, Michoacán, agosto 2021

## DEDICATORIA

*A mi familia: Padres y hermanas.*

*A Fernanda: mi incondicional amor.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al D.C. Gustavo Santoyo Pizano, por darme la oportunidad de formar parte de un increíble equipo de trabajo, por ser un guía en mi formación, por la confianza depositada y por ser un gran ejemplo a seguir.

A la D.C. Ma. del Carmen Orozco Mosqueda y al D.C. Eduardo Valencia Cantero por el tiempo dedicado en revisión, sugerencias y correcciones en el presente trabajo.

Al grupo de trabajo del laboratorio de Diversidad Genómica, por su buen recibimiento, amistad y consejos.

A Fernanda, por su incondicional amor y soporte en los años de estudio, así como también durante los últimos meses de trabajo y esfuerzo. Por motivarme día a día a alcanzar la mejor versión de mi. Gracias por tanto.

A mis padres, quienes son mi mayor ejemplo a seguir, gracias por su amor, cariño, comprensión, motivación y confianza. Por darme todo y más. Anhele seguir aprendiendo muchos años más de ustedes.

A mis hermanas, por su cariño y comprensión durante estos años a la distancia.

A mi difunto cuñado Gerardo, por todo el amor y cariño durante más de 18 años. Por siempre cuidar a nuestra familia. Te agradezco infinitamente desde el fondo de mi corazón.

A Neftalí y Quetzalcóatl, por su amistad durante los años de la carrera.

## CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	3
2.1 Factor económico por infecciones de hongos fitopatógenos .....	3
2.2 <i>Botrytis</i> sp. como hongo fitopatógeno .....	3
2.3 <i>Fusarium brachygibbosum</i> como hongo fitopatógeno .....	3
2.4 Técnica de control actual de hongos fitopatógenos: Fungicidas.....	4
2.5 Alternativa al uso de fungicidas: PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria).....	4
2.6 Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal .....	5
2.6.1 Fijación de nitrógeno atmosférico.....	5
2.6.2 Solubilización de fosfatos .....	6
2.6.3 Solubilización de potasio .....	7
2.6.4 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa .....	7
2.6.5 Auxinas - Ácido indol-3-acético (AIA) .....	8
2.6.6 Citocininas (CKs).....	9
2.6.7 Giberelinas (GAs) .....	9
2.6.8 Ácido abscísico (ABA) .....	10
2.6.9 Ácido salicílico (AS).....	10
2.6.10 Sideróforos .....	11
2.7 Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal .....	12
2.7.1 Exopolisacáridos (EPS) y formación de biopelículas .....	12
2.7.2 Estimulación de resistencia sistémica inducida (RSI) .....	13
2.7.3 Antibióticos .....	13
2.7.4 Lipopéptidos. ....	14
2.7.5 Enzimas líticas.....	14
2.7.6 Cianuro de hidrógeno (HCN).....	15

2.7.7 Compuestos orgánicos volátiles: VOCs (Volatile Organic Compounds) ...	16
2.7.8 Competencia por espacio y nutrientes .....	16
2.8 Mecanismos duales.....	16
2.9 Género <i>Bacillus</i> como agentes de biocontrol.....	17
2.10 Estrés por calor en plantas.....	18
2.11 Bacterias termotolerantes .....	18
2.12 Cepas termotolerantes del género <i>Bacillus</i> .....	19
2.13 Cepas PGPB termotolerantes ante el estrés por calor en plantas.....	21
2.14 Cepas PGPB termotolerantes como agentes de biocontrol.....	21
2.15 Incendios subterráneos como fuente de bacterias termotolerantes.....	22
3. JUSTIFICACIÓN .....	23
4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	24
5. HIPÓTESIS .....	25
6. OBJETIVOS .....	26
6.1 Objetivo general .....	26
6.2 Objetivos específicos .....	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
7.1 Material biológico .....	27
7.1.1 Aislados bacterianos.....	27
7.1.2 Cepas fúngicas .....	28

7.2	Identificación taxonómica de los aislados AF18-AF40 .....	28
7.2.1	Extracción de ADN genómico .....	28
7.2.2	Amplificación por PCR del gen ribosomal ARN 16S .....	29
7.2.3	Secuenciación e identificación taxonómica de los amplicones .....	29
7.3	Evaluación de la actividad antagónica <i>in vitro</i> de los aislados termotolerantes contra <i>Botrytis</i> sp. 62c y <i>F. brachygibbosum</i> 4BF .....	30
7.3.1	Antagonismo contra <i>Botrytis</i> sp. 62c y <i>F. brachygibbosum</i> 4BF por compuestos difusibles .....	30
7.3.2	Antagonismo contra <i>Botrytis</i> sp. 62c y <i>F. brachygibbosum</i> 4BF por compuestos volátiles .....	31
7.3.3	Diseño experimental .....	31
7.4	Caracterización <i>in silico</i> de genoma de <i>B. velezensis</i> AF12 .....	32
7.4.1	Secuenciación de genoma completo de AF12 .....	32
7.4.2	Ensamble de secuencias sin procesar y anotación de genoma .....	33
7.4.3	Análisis filogenético de AF12 .....	33
7.4.4	Índice general de relación del genoma (OGRI) .....	33
7.4.5	Análisis funcional: Subsistemas y metabolitos secundarios .....	34
8.	RESULTADOS .....	35
8.1	Identificación taxonómica de los aislados AF18-AF40 a través de la secuenciación de sus genes ribosomales ARN 16S .....	35
8.1.1	Extracción de ADN genómico .....	35
8.1.2	Amplificación por PCR del gen ribosomal ARN 16S .....	36
8.1.3	Secuenciación e identificación taxonómica .....	37
8.2	Evaluación de la actividad antagónica <i>in vitro</i> de los aislados termotolerantes contra <i>Botrytis</i> sp. 62c y <i>F. brachygibbosum</i> 4BF .....	42
8.2.1	Antagonismo contra <i>Botrytis</i> sp. 62c por compuestos difusibles .....	42
8.2.2	Antagonismo contra <i>Botrytis</i> sp. 62c por compuestos volátiles .....	44
8.2.3	Antagonismo contra <i>F. brachygibbosum</i> 4BF por compuestos difusibles .....	46

8.2.4 Antagonismo contra <i>F. brachygibbosum</i> 4BF por compuestos volátiles ...	48
8.3 Caracterización <i>in silico</i> de genoma de <i>B. velezensis</i> AF12.....	49
8.3.1 Secuenciación de genoma completo de <i>B. velezensis</i> AF12.....	49
8.3.2 Ensamble de secuencias sin procesar y anotación de genoma.....	50
8.3.3 Análisis filogenético de AF12.....	52
8.3.4 Índice general de relación del genoma (OGRI) .....	53
8.3.5 Análisis funcional: Subsistemas y metabolitos secundarios.....	54
9. DISCUSIÓN .....	56
10. RESUMEN DE RESULTADOS .....	61
11. CONCLUSIÓN .....	62
12. BIBLIGRAFÍA .....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Electroforesis de los productos de PCR del gen ribosomal ARN 16S ... 36
- Figura 2.** Comparación de las secuencias de los genes ribosomales 16S de los aislados AF18-AF40 con la base de datos del NCBI ..... 41
- Figura 3.** Crecimiento micelial de *Botrytis* sp. 62c con los tratamientos AF01-AF20 a través de ensayos de compuestos difusibles..... 42
- Figura 4.** Crecimiento micelial de *Botrytis* sp. 62c con los tratamientos AF21-AF40 a través de ensayos de compuestos difusibles..... 43
- Figura 5.** Ensayos de antagonismo por compuestos difusibles *in vitro* contra *Botrytis* sp. 62c..... 44
- Figura 6.** Crecimiento micelial de *Botrytis* sp. 62c con los tratamientos AF01-AF20 a través de ensayos de compuestos volátiles..... 45
- Figura 7.** Crecimiento micelial de *Botrytis* sp. 62c con los tratamientos AF21-AF40 a través de ensayos de compuestos volátiles..... 45
- Figura 8.** Crecimiento micelial de *F. brachygibbosum* 4BF con los tratamientos AF01-AF20 a través de ensayos de compuestos difusibles ..... 46
- Figura 9.** Crecimiento micelial de *F. brachygibbosum* 4BF con los tratamientos AF21-AF40 a través de ensayos de compuestos difusibles ..... 47
- Figura 10.** Ensayos de antagonismo por compuestos difusibles *in vitro* contra *F. brachygibbosum* 4BF ..... 48
- Figura 11.** Crecimiento micelial de *F. brachygibbosum* 4BF con los tratamientos AF01-AF20 a través de ensayos de compuestos volátiles ..... 48

<b>Figura 12.</b> Crecimiento micelial de <i>F. brachygibbosum</i> 4BF con los tratamientos AF21-AF40 a través de ensayos de compuestos volátiles .....	49
<b>Figura 13.</b> Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de <i>B. velezensis</i> AF12 .....	50
<b>Figura 14.</b> Mapa genómico de <i>Bacillus velezensis</i> AF12 .....	51
<b>Figura 15.</b> Árbol filogenético del gen ribosomal ARN 16S de AF12.....	52
<b>Figura 16.</b> Subsistemas presentes en el genoma de <i>Bacillus velezensis</i> AF12. ..	54

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Reportes de bacterias termotolerantes del genero <i>Bacillus</i> .....	20
<b>Tabla 2.</b> Concentración y calidad de los ADN genómicos de AF18-AF40 para uso en PCR.....	35
<b>Tabla 3.</b> Concentración y calidad de los productos de PCR de los genes ribosomales ARN 16S de AF18-AF40 .....	37
<b>Tabla 4.</b> Identificación taxonómica a través de la comparación de las secuencias de los genes ribosomales 16S con la base de datos NCBI .....	41
<b>Tabla 5.</b> Inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis</i> sp. 62c expresada en porcentaje y milímetros .....	43
<b>Tabla 6.</b> Inhibición del crecimiento micelial de <i>F. brachygibbosum</i> 4BF expresada en porcentaje y milímetros .....	47
<b>Tabla 7.</b> Características generales del genoma de <i>Bacillus velezensis</i> AF12.....	51
<b>Tabla 8.</b> Análisis OGRI del genoma de <i>B. velezensis</i> AF12.....	53
<b>Tabla 9.</b> Análisis antiSMASH: Predicción de los metabolitos secundarios.....	55

## RESUMEN

Las plantas se ven expuestas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico a lo largo de su vida. El estrés biótico, como el causado por agentes patógenos, es un efecto no deseable en cultivos de interés económico, ya puede provocar desde una disminución en su producción hasta la pérdida total. La infección por hongos patógenos es uno de los principales y más frecuentes problemas en la agricultura, ya que especies como *Botrytis* spp. y *Fusarium* spp. son de interés mundial, debido a que se encuentran presentes en diversas partes del mundo infectando una gran variedad de cultivos. La técnica más común para controlar estas infecciones es a través de la aplicación de combinaciones de fungicidas químicos, las cuales, pueden inducir resistencia a estos a corto plazo y además tienen repercusiones en el ambiente, al contaminar suelo y agua. Una alternativa potencial al uso de fungicidas químicos es la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB por sus siglas en inglés) que son capaces de controlar las infecciones fúngicas. En el presente trabajo se evaluó el antagonismo por compuestos difusibles y volátiles *in vitro* de 40 cepas bacterianas seleccionadas como termotolerantes, de las cuales, 18 cepas se identificaron a través de la secuencia del gen ribosomal ARN 16S, siendo dominante el género *Bacillus*. En los ensayos de antagonismo por compuestos difusibles, se encontraron 8 cepas con actividad antagónica hacia *Botrytis* sp. 62c, mientras que para la especie *Fusarium brachygibbosum* 4BF, solamente 2 aislados presentaron antagonismo. Por otro lado, ningún aislado mostró antagonismo hacia *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF por compuestos volátiles. Así mismo, se seleccionó a *Bacillus velezensis* cepa AF12 para la caracterización *in silico* de su genoma, y los análisis de predicción de metabolitos secundarios mostraron genes que codifican para diversas sustancias con acción antimicrobiana, antifúngica, como los sideróforos. Estos compuestos predichos podrían tener un rol importante en el biocontrol de patógenos fúngicos, así como en la promoción indirecta del crecimiento vegetal. En conclusión, *Bacillus velezensis* AF12 puede ser usado como un innovador antagonista en el biocontrol de los patógenos fúngicos.

**Palabras clave:** Estrés biótico, patógeno fúngico, antagonismo, PGPB, *Bacillus velezensis*.

## ABSTRACT

Plants are exposed to different types of biotic and abiotic stress throughout their lives. Biotic stress, such as that caused by pathogens, is an undesirable effect in crops of economic interest, it can cause from a decrease in their production to total loss. Infection by pathogenic fungi is one of the main and most frequent problems in agriculture, since species such as *Botrytis* spp. and *Fusarium* spp. They are of global interest, because they are present in various parts of the world, infecting a wide variety of crops. The most common technique to control these infections is through the application of combinations of chemical fungicides, which can induce resistance to these in the short term and also have repercussions on the environment, by contaminating soil and water. A potential alternative to the use of chemical fungicides is the application of plant growth promoting bacteria (PGPB) that they are able to control fungal infections. In the present work, the antagonism by diffusible and volatile compounds *in vitro* of 40 bacterial strains selected as thermotolerant was evaluated, of which 18 strains were identified through the sequence of the 16S RNA ribosomal gene, the *Bacillus* genus being dominant. In the antagonism tests by diffusible compounds, 8 strains with antagonistic activity towards *Botrytis* sp. 62c were found, while for the *F. brachygibbosum* 4BF species, only 2 isolates presented antagonism. On the other hand, no isolate showed antagonism towards *Botrytis* sp. 62c and *F. brachygibbosum* 4BF for volatile compounds. Likewise, *Bacillus velezensis* strain AF12 was selected for the *in silico* characterization of its genome, and the prediction analyzes of secondary metabolites showed genes that code for various substances with antimicrobial and antifungal action, such as siderophores. These predicted compounds could play an important role in the biocontrol of fungal pathogens, as well as in the indirect promotion of plant growth. In conclusion, *Bacillus velezensis* AF12 can be used as an innovative antagonist in the biocontrol of fungal pathogens.

**Keywords:** Biotic stress, fungal pathogen, antagonism, PGPB, *Bacillus velezensis*.

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas, principalmente por su naturaleza sésil, están expuestas a diversos factores, tanto abióticos como bióticos. En los factores abióticos se encuentran diversos parámetros como temperatura, pH, luz, humedad, entre otros. Por otro lado, en los factores bióticos se encuentran diversos organismos y microorganismos como insectos, bacterias y hongos, siendo estos últimos la plaga más difícil de controlar (Chávez *et al.*, 2014), siendo los hongos fitopatógenos los agentes causales de la mayoría de las enfermedades en plantas de interés económico (Shuping y Eloff, 2017).

Es importante mencionar que un determinado hongo fitopatógeno no infecta de forma generalizada a todos los cultivos, es decir, en cada cultivo existe un hongo fitopatógeno con mayor afinidad, por ejemplo, al tomate lo infecta principalmente *Geotrichum candidum*, mientras que el limón se ve principalmente afectado por hongos del género *Fusarium*. Sin embargo, más de un hongo fitopatógeno podría de igual manera infectar a un determinado cultivo (Chávez *et al.*, 2014). Por otra parte, especies como *Botrytis* son capaces de infectar más de 200 especies de plantas, siendo gran parte de éstas de interés agronómico (Dean *et al.*, 2012).

La técnica más efectiva hasta la fecha para hacer frente a las infecciones por fitopatógenos fúngicos de los cultivos es la aplicación de fungicidas químicos (Alburqueque y Gusqui, 2018). El uso de estos fungicidas produce contaminación ambiental y alta toxicidad residual, además de la generación de cepas resistentes a estos compuestos (Son *et al.*, 2008). Es por eso es necesario encontrar nuevas fuentes orgánicas y amigables con el medio ambiente que permitan controlar a los hongos fitopatógenos de los cultivos de interés económico (Santos *et al.*, 2020). Una alternativa prometedora es el uso de PGPB (por sus siglas en inglés: *Plant Growth Promoting Bacteria*), que, a través de sus mecanismos directos, indirectos o una combinación de ambos, puedan controlar este tipo de infecciones (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

Las altas temperaturas en el ambiente derivadas del cambio climático provocan estrés por calor en muchas plantas. El estrés por calor es perjudicial para los cultivos ya que conduce a alteraciones en crecimiento y desarrollo, así como a una baja producción (Kang *et al.*, 2019). El uso de PGPB termotolerantes puede actuar como una herramienta de doble propósito, ya que además de ser una potencial alternativa para el biocontrol de patógenos fúngicos, puede ser utilizado como herramienta para contrarrestar los efectos del estrés por calor en plantas de interés económico (Khan *et al.*, 2020).

Para hacer frente a los retos mencionados, los ambientes extremos pueden ser sitios ideales para el aislamiento de PGPB termotolerantes con actividad antagónica contra hongos fitopatógenos (Santos *et al.*, 2020), así como beneficiar a la planta bajo estrés por calor. En el presente proyecto de investigación, se evaluará la actividad antagónica de bacterias termotolerantes aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos (Flores-Piña, 2021), contra los hongos fitopatógenos *F. brachygibbosum* 4BF y *Botrytis* sp. 62c. Aquellas bacterias que presenten esta actividad, serán seleccionadas en futuras investigaciones para analizar la actividad como PGPB, principalmente en plantas infectadas con *F. brachygibbosum* y *Botrytis* sp., así como también el efecto bajo estrés por calor en plantas en condiciones de cámara de crecimiento e invernadero.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Factor económico por infecciones de hongos fitopatógenos**

Dentro de los factores bióticos y abióticos a los que una planta puede verse expuesta, los fitopatógenos fúngicos causan la mayoría de las enfermedades. Las industrias agrícola y hortícola han sido afectadas por infecciones fúngicas, obteniendo pérdidas económicas anuales que superan los 200 mil millones de dólares estadounidenses (Shuping y Eloff, 2017).

### **2.2 *Botrytis* sp. como hongo fitopatógeno**

*Botrytis* sp. es de importancia económica mundial, provoca la enfermedad de moho gris y afecta diferentes órganos de la planta como lo son hojas, tallos, flores y frutos de una amplia variedad de cultivos, incluyendo tomate, zarzamora, arándano, grosella, frambuesas, fresa y uvas. La infección por este fitopatógeno puede darse en campo, así como también en los frutos en la etapa de poscosecha que incluye el transporte y la comercialización. La etapa de poscosecha es donde se alcanza la mayor severidad de la enfermedad provocada por este fitopatógeno, debido a que en campo la infección permanece quiescente, siendo esta última etapa donde se activa (Terrones-Salgado *et al.*, 2019).

La infección por *Botrytis* sp. en el tomate genera la defoliación, el aborto de flores y frutos, y la alteración en el rendimiento y calidad del fruto. El porcentaje de pérdidas derivadas de la infección por *Botrytis* sp. en cultivos de tomate son en promedio del 20-30%, sin embargo, en brotes severos puede aumentar hasta el 50% (Li *et al.*, 2020). En plantas de zarzamora, en las flores se observa como pudrición suave, en el fruto se observan zonas blandas de color marrón claro las cuales aumentan en tamaño hasta abarcar la totalidad de este. Generalmente, la infección por *Botrytis* sp. se ve reflejada en una reducida vida de anaquel (Terrones-Salgado *et al.*, 2019).

### **2.3 *Fusarium brachygibbosum* como hongo fitopatógeno**

El género *Fusarium* es de importancia económica mundial debido a las pérdidas económicas a causa de su infección (Cutuli *et al.*, 2015). La infección de *F. brachygibbosum* altera el rendimiento de los cultivos, ya que puede interferir con la absorción y translocación de agua y nutrientes. Por otra parte, en infecciones

severas, la enfermedad causada por *F. brachygibbosum* puede provocar la muerte prematura de la planta. La sintomatología principal se basa en la observación de zonas necróticas internas de color marrón oscuro en la planta (Shan *et al.*, 2017). *F. brachygibbosum* se ha identificado en diversas plantas, entre las cuales se encuentra el maíz y trigo (Shan *et al.*, 2017; Ali *et al.*, 2020).

#### **2.4 Técnica de control actual de hongos fitopatógenos: Fungicidas**

Existen diferentes compuestos químicos que han sido utilizados para controlar a los fitopatógenos fúngicos, sin embargo, dependiendo del fungicida y del hongo a tratar, se obtendrá un cierto porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos. Por ejemplo, *Fusarium* sp. se ve inhibido en 100% con el uso de tiabendazol, sin embargo, este mismo compuesto no inhibe con la misma efectividad a *Botrytis cinerea*, lo mismo sucede con diferentes hongos (Alburqueque y Gusqui, 2018). Debido a lo anterior, los fungicidas presentan una reducida eficacia en el control de distintos fitopatógenos en una misma aplicación, por lo que para un control de un cultivo afectado por diferentes patógenos fúngicos se requiere hacer uso indiscriminado y excesivo de fungicidas, lo cual provoca contaminación ambiental y alta toxicidad residual, además de la generación de cepas resistentes a estos compuestos (Son *et al.*, 2008). Tal es el caso de los fungicidas procimidona y carbendazim, cuya aplicación para el control de *Botrytis* sp. se ha interrumpido en algunas zonas de China debido a que el hongo generó resistencia a estos dos compuestos químicos (Li *et al.*, 2020). Por lo anterior es sumamente importante encontrar nuevas fuentes orgánicas y amigables con el medio ambiente que ayuden a controlar los hongos fitopatógenos de los cultivos de interés económico y lograr preservar la sostenibilidad de la agricultura (Santos *et al.*, 2020; Zouari *et al.*, 2020).

#### **2.5 Alternativa al uso de fungicidas: PGPB (Plant Growth-Promoting Bacteria)**

Una alternativa biotecnológica potencial al uso de fungicidas es la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal que, por medio de mecanismos de acción propios de estas bacterias, directos, indirectos o una combinación de ellos, permiten controlar a los hongos fitopatógenos, y por consecuencia, disminuir la

incidencia de enfermedades en la planta (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020). Las PGPB se caracterizan por (i) ser un colonizador de raíces, (ii) promover el crecimiento de las plantas y (iii) adaptarse, sobrevivir, multiplicarse y competir con otros microorganismos del entorno, hasta manifestar su promoción del crecimiento y/o actividades de protección (Manoj *et al.*, 2019). Los géneros de bacterias antagonistas frecuentemente utilizados como agentes de biocontrol incluyen *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Streptomyces*, entre otros (Sánchez *et al.*, 2018; Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

## **2.6 Mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal**

Los mecanismos directos de las PGPB, benefician directamente el desarrollo de las plantas. Dentro de éstos, se incluyen la fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN), solubilización de fosfatos, solubilización de potasio, la actividad de la enzima ACC desaminasa, la producción de fitohormonas como auxinas, citocininas (CK), giberelinas (GAs), ácido abscísico (ABA), ácido salicílico, la producción de exopolisacáridos, biopelículas, y la síntesis de sideróforos (Santoyo *et al.*, 2019; Esquivel-Cote *et al.*, 2013; Manoj *et al.*, 2019).

### **2.6.1 Fijación de nitrógeno atmosférico**

El nitrógeno (N) es un elemento indispensable en las proteínas, las cuales son necesarias para el metabolismo adecuado en plantas debido a que todos los procesos esenciales están asociados con estas. El N también forma parte de la clorofila, un componente esencial para la fotosíntesis. El suministro óptimo de N aumenta los procesos fotosintéticos, la producción de área foliar y la tasa neta de asimilación, lo cual se ve reflejado en un aumento en la producción de los cultivos. Es por eso que es común la aplicación de fertilizantes ricos en N en los huertos. El N se encuentra disponible en un 78-79% en la atmósfera (Leghari *et al.*, 2016), sin embargo, su naturaleza es inerte, por lo que es imposible que sea asimilado ya que, solo puede ser utilizado por las plantas en formas como nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ). Varias cepas bacterianas pueden convertir el N atmosférico en las formas asimilables para la planta. Esto es debido a que estas PGPB cuentan

con un complejo sistema de enzimas llamado nitrogenasa (Manoj *et al.*, 2019). Estas PGPB fijadoras de N se clasifican como bacterias fijadoras de N simbióticas y bacterias fijadoras de N no simbióticas. Las primeras se definen por infectar y establecer una relación con las raíces de las plantas que resulta en la formación de nódulos donde habitan estas bacterias y se lleva a cabo el proceso de fijación de N. En leguminosas, esta interacción es común e importante, ya que la mayor parte de N que requiere la planta se proporciona por este mecanismo. Por otra parte, las bacterias fijadoras de N no simbióticas, proporcionan sólo una pequeña parte de N que la planta pueda requerir. (Nazir *et al.*, 2018). Ejemplos de bacterias simbióticas fijadoras de N incluyen a *Rhizobium*, así como no simbióticas a *Cyanobacteria* y *Azotobacter* respectivamente (Mehmood *et al.*, 2018).

### **2.6.2 Solubilización de fosfatos**

El fósforo (P) es un componente indispensable en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN), piezas clave en la síntesis de proteínas. Forma parte de los fosfolípidos los cuales desempeñan funciones fundamentales en las membranas celulares (Kahsay, 2019), así como también interviene en los procesos metabólicos de las plantas, como la fotosíntesis, la transferencia de energía, la transducción de señales y la respiración (Jeyanthi y Kanimozhi, 2018). Un buen suministro de P se ve reflejado en un óptimo desarrollo de raíces, aumento de la fuerza del tallo, mejora de la formación de flores, madurez del cultivo más uniforme y más temprana, por mencionar algunos beneficios (Kahsay, 2019). El P es uno de los dos elementos más limitantes en el suelo, ya que se encuentra de forma insoluble y las plantas no pueden utilizarlo directamente. Uno de los principales factores abióticos que limitan la disponibilidad del fósforo es el pH. Algunas cepas PGPB pueden solubilizar y mineralizar directamente el fósforo inorgánico o facilitar la movilidad del fósforo orgánico. Estas bacterias hacen esto posible a través de la secreción de enzimas (fosfonatos, fosfatasa y C-P liasas) y ácidos orgánicos (ácido cítrico, ácido láctico, ácido glucónico), los cuales, modifican el pH de la rizósfera, y así, este elemento pasa a formar el ion fosfato inorgánico (Pi), una forma aprovechable para las plantas (Manoj *et al.*, 2019).

Algunos géneros reportados como altamente eficientes solubilizadores de fosfato son *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Jeyanthi y Kanimozhi, 2018).

### **2.6.3 Solubilización de potasio**

El potasio (K) es el tercer macronutriente esencial más importante en el crecimiento de las plantas, sin embargo, la mayor parte de este se encuentra de forma insoluble en el suelo en forma de rocas y minerales de silicato (Gouda *et al.*, 2018). El K es importante debido a que está involucrado en diversos aspectos entre los cuales se encuentra la fotosíntesis y la regulación de la apertura y cierre estomático (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020). También es pieza clave en el transporte y la absorción de otros nutrientes, en la síntesis de células, enzimas, proteínas, almidón, celulosa y vitaminas, así como en conferir resistencia al estrés abiótico y biótico (Meena *et al.*, 2015). Debido a lo anterior, el potasio es un elemento importante para un óptimo desarrollo de las plantas. Se han encontrado bacterias PGPB con la capacidad de solubilizar el potasio insoluble de la rizósfera por medio de la producción de ácidos orgánicos y de esta forma aumentar su disponibilidad para la planta (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020). Se ha demostrado la capacidad de solubilizar el K por las cepas bacterianas *Pseudomonas* spp., *Acidithiobacillus ferrooxidans*, *Bacillus mucilaginosus*, *B. edaphicus* y *B. megaterium* (Meena *et al.*, 2015).

### **2.6.4 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa**

El ACC es un componente derivado de la acción enzimática de la ACC sintasa (precursor S-adenosilmetionina) y es el precursor del etileno (Esquivel-Cote *et al.*, 2013). El etileno es la única fitohormona de naturaleza fisicoquímica gaseosa que, en concentraciones mínimas, promueve el crecimiento de las plantas y varios procesos metabólicos. Por otro lado, cuando existen altas concentraciones de etileno en las plantas, se ve afectado el crecimiento de las raíces y el metabolismo de la planta en general, lo cual se refleja en un rendimiento de cultivo bajo. La concentración de etileno incrementa cuando la planta se ve expuesta a estrés de

tipo biótico y abiótico, como estrés por metales pesados, salinidad, sequía, inundaciones y unión de patógenos (Nazir *et al.*, 2018). El ACC puede ser catalizado por dos enzimas, la primera la enzima ACC oxidasa que convierte al ACC en etileno. Por otra parte, la enzima ACC desaminasa, la cual convierte el ACC en  $\alpha$ -cetobutirato y amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Esquivel-Cote *et al.*, 2013). La regulación del etileno por parte de la ACC desaminasa es muy importante. Se sabe que diversas cepas PGPB tienen la capacidad de sintetizar esta enzima y evitar que el ACC se convierta en etileno, convirtiéndolo en  $\alpha$ -cetobutirato y  $\text{NH}_4^+$ , componentes que las plantas pueden utilizar como fuente de carbono y nitrógeno, siendo este último importante por su participación en la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y otros compuestos nitrogenados. Las PGPB con esta capacidad desempeñan un papel importante en la regulación del nivel de etileno, ya que disminuyen su concentración en los tejidos vegetales, proveen  $\text{NH}_4^+$  y promueven el crecimiento de las plantas (Manoj *et al.*, 2019).

### **2.6.5 Auxinas - Ácido indol-3-acético (AIA)**

Las auxinas son importantes en la inducción y proliferación del sistema radicular de la planta. Existen diferentes formas de auxinas, algunas de ellas son el ácido indol-3-acético (AIA), el ácido indol-3-butírico (IBA), el ácido indol-3-propiónico (IPA), el ácido fenilacético, las cuales son sintetizadas por cepas PGPB. La auxina más importante es el AIA (Manoj *et al.*, 2019) ya que es la que se produce en mayor abundancia y casi siempre representa la forma más activa de esta fitohormona (Goswami *et al.*, 2016). Algunos géneros PGPB con la capacidad de sintetizar auxinas son *Azospirillum*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* que utilizan L-triptófano que es secretado en la rizósfera para sintetizar el AIA (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

El AIA es una auxina esencial debido a que tiene un rol indispensable en el desarrollo de los órganos, las respuestas celulares como la diferenciación, expansión, división y regulación de genes y la germinación de semillas, ya que, a una baja concentración, se estimula el crecimiento, mientras que a una alta concentración, el crecimiento se ve inhibido (Singh, 2018). También desempeña un papel fundamental en la formación de raíces laterales y adventicias, funciona como

mediador en procesos de respuesta a la luz y la gravedad, influencia a la fotosíntesis, la producción de metabolitos, controla los procesos de crecimiento vegetativo y la resistencia a diferentes tipos de estrés. Algunas cepas PGPB productoras de AIA son *Aeromonas*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Pseudomonas* y *Rhizobium* (Santoyo *et al.* 2019).

#### **2.6.6 Citocininas (CKs)**

Las CKs son la segunda fitohormona más importante que participan en procesos fisiológicos de plantas como la división celular, la movilización de nutrientes por diferenciación vascular, la biogénesis del cloroplasto, la diferenciación de los brotes, la senescencia de las hojas, la dominancia apical, la producción de antocianinas y el desarrollo fotomorfogénico, la sensibilidad del cambium vascular, la proliferación de pelos radiculares, así como también en la inhibición de la formación de raíces laterales y elongación de la raíz primaria (Odoh, 2017). Se sabe que la inoculación de cepas PGPB con la capacidad de sintetizar citoquininas en plantas, puede estimular el crecimiento, tal es el caso de la cepa *Bacillus megaterium* que indujo significativamente en la morfogénesis de la raíz de *Arabidopsis thaliana* (Wang *et al.*, 2017). Cepas PGPB de igual forma pueden conferir resistencia contra estrés ambiental, esto fue demostrado inoculando plantas con *Bacillus subtilis* productora de citoquinina (Odoh, 2017).

#### **2.6.7 Giberelinas (GAs)**

Las giberelinas son un gran grupo de fitohormonas, la más estudiada es la A3, nombrada ácido giberélico (Salazar-Cerezo *et al.*, 2018). El ácido giberélico tiene un rol importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Dentro estos se encuentra la germinación de semillas, el crecimiento de plántulas, tallos y hojas, formación de flores y crecimiento de flores y frutos. Así como también el desarrollo de raíces (pilosas) y la inhibición y diferenciación de los botones florales en las angiospermas (Mustari *et al.*, 2019). Además, se ha demostrado que estimula el crecimiento y desarrollo de las plantas bajo condiciones de estrés abiótico, por ejemplo, bajo estrés por salinidad. Esto fue demostrado en plantas de tomate

cultivadas en condiciones salinas las cuales fueron tratadas con ácido giberélico, en las cuales se reportó una mayor absorción de agua, así como una menor transpiración en las plantas tratadas. Otra acción del ácido giberélico es mejorar la actividad de las enzimas antioxidantes al reducir los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), siendo un factor clave en el mejoramiento del crecimiento de una planta bajo condiciones de estrés (Egamberdieva *et al.*, 2017).

Diversas cepas PGPB tienen la capacidad de sintetizar giberelinas, se han reportado a los géneros *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Rhizobium* y *Burkholderia* con esta capacidad (Jeyanthi y Kanimozhi, 2018).

#### **2.6.8 Ácido abscísico (ABA)**

El ácido abscísico (ABA) es una hormona que se asocia en las plantas con respuestas a estrés abiótico como estrés por metales pesados, sequía, temperatura o calor, alto nivel de salinidad y por radiación (Vishwakarma *et al.*, 2017).

Además, participa en diversos procesos en las plantas entre los cuales se encuentran: inhibición del crecimiento en las plantas (puede inhibir el crecimiento inducido por el AIA), germinación de semillas, cierre estomático y mantenimiento de latencia de las yemas, abscisión de frutos y hojas (Chen *et al.*, 2020-a).

El ácido abscísico juega un rol importante en el desarrollo y rendimiento de cualquier cultivo, ya que tiene una participación importante en amortiguar los efectos adversos derivados de los tipos de estrés antes mencionados (Vishwakarma *et al.*, 2017).

Se ha reportado la capacidad por PGPB de producir ABA, algunas de ellas son *Rhizobium* sp., *B. japonicum*, *Azospirillum* sp., *Azospirillum brasilense*, *Arthrobacter koreensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, y *B. licheniformis* (Jeyanthi y Kanimozhi, 2018; Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

#### **2.6.9 Ácido salicílico (AS)**

El ácido salicílico es un compuesto fenólico, se le conoce como una sustancia hormonal presente en las plantas. Tiene un rol importante en la regulación del desarrollo y crecimiento de la planta, entre los cuales se encuentra la fotosíntesis,

síntesis de etileno y cierre estomático, además forma parte de los mecanismos contra estrés biótico y abiótico. Una de sus características es llevar a cabo procesos bajo estrés salino y sequía (Sharifi, 2017).

Se ha reportado la capacidad de síntesis de ácido salicílico en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PF23EPS, además de la capacidad de antagonizar al fitopatógeno *M. phaseolina*. Debido a lo anterior, PF123EPS es estudiada con un enfoque novedoso para mejorar el crecimiento de las plantas tanto en condiciones salinas como en cultivos infestados con fitopatógenos o una combinación de ellos (Tewari y Arora, 2018).

### **2.6.10 Sideróforos**

Los sideróforos son moléculas de bajo peso molecular de naturaleza proteica, que se caracterizan por tener una fuerte afinidad al hierro (Fe). Estos compuestos quelantes convierten la forma insoluble del hierro,  $Fe^{3+}$ , en una forma soluble y absorbible para la planta,  $Fe^{2+}$ . La captación de Fe en la planta es importante ya que es un componente importante involucrado en su crecimiento y desarrollo, debido a que este se requiere para diversas actividades metabólicas como el ciclo del ácido tricarboxílico, la cadena transportadora de electrones, la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis (Manoj *et al.*, 2019). Entre los micronutrientes esenciales, el hierro juega un papel clave como importante elemento de crecimiento de todo tipo de organismos. La escasez de hierro en los suelos genera competencia entre las raíces de las plantas. Sin embargo, a pesar de que el hierro es abundante en la superficie de la tierra, la forma predominante es la insoluble y por lo tanto no se encuentra disponible. Se ha reportado la capacidad por parte de PGPB de sintetizar sideróforos que quelan la forma insoluble  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , de esta forma mejorando el desarrollo de las plantas. Además, también pueden formar complejos con otros metales como son Al, Cd, Cu, Ga, In, Pb y Zn (Nazir *et al.*, 2018).

*P. aeruginosa* tiene la capacidad de producir el sideróforo llamado pioquelina, compuesto quelante de una variedad de metales que les permite mejorar su biodisponibilidad (Braud *et al.*, 2009).

Las bacterias excretoras de sideróforos al formar complejos con el hierro tienen la capacidad de controlar diversas enfermedades derivadas de microorganismos patógenos al limitarlos de este nutriente (Nazir *et al.*, 2018).

## **2.7 Mecanismos indirectos de promoción del crecimiento vegetal**

Por otro lado, los mecanismos indirectos de las PGPB benefician indirectamente el crecimiento de las plantas, estos mecanismos principalmente se basan en suprimir o amortiguar los efectos negativos hacia las plantas ocasionados por estrés de tipo biótico y abiótico, como lo son altas temperaturas, frío, sequía, salinidad, alcalinidad, radiación UV e infección por patógenos respectivamente (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020). Los mecanismos abarcan la síntesis de exopolisacáridos y formación de biopelículas, estimulación de resistencia sistémica inducida (RSI) y algunos mecanismos de biocontrol como son la producción de metabolitos supresores de fitopatógenos, entre los que destacan antibióticos, lipopéptidos, enzimas líticas, cianuro de hidrógeno (HCN) y compuestos orgánicos volátiles (COV), así como la competencia por nutrientes y espacio (Rehman *et al.*, 2020).

### **2.7.1 Exopolisacáridos (EPS) y formación de biopelículas**

Los exopolisacáridos son moléculas de alto peso molecular, consisten principalmente en polisacáridos, proteínas, ácidos urónicos y lípidos. Los EPS son secretados como subproducto de microorganismos como mecanismo de autodefensa ante estrés biótico y abiótico. Los EPS desempeñan funciones biológicas tanto en las bacterias como en la planta (Han *et al.*, 2017). En planta, se ha reportado que los EPS tienen un papel importante en la simbiosis con bacterias fijadoras de nitrógeno, ya que los exopolisacáridos son importantes para la formación de los nódulos (Costa *et al.*, 2018). También presentan otros beneficios como biocontrol contra fitopatógenos y agregación del suelo (Manoj *et al.*, 2019). Además, se sabe que los EPS tienen la capacidad de amortiguar los efectos por sequía en la planta, ya que, estas estructuras pueden retener agua (Costa *et al.*, 2018). También se ha reportado la capacidad de estos compuestos para unirse a cationes como el Na<sup>+</sup>, y por consecuencia reducir el estrés por salinidad. (Velasco-

Jiménez *et al.*, 2020). Además, los expolisacáridos tienen función como molécula señal, activando la respuesta de defensa durante el proceso de infección ante fitopatógenos (Jeyanthi y Kanimozhi, 2018; Odoh, 2017), *Rhizobium leguminosarum*, *Azotobacter vinelandii*, *Bacillus drentensis*, *Enterobacter cloacae*, *Agrobacterium* sp., *Xanthomonas* sp. y *Rhizobium* sp. tienen la capacidad de secretar exopolisacáridos (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020).

### **2.7.2 Estimulación de resistencia sistémica inducida (RSI)**

La RSI se manifiesta en las plantas debido a que induce la resistencia de tejidos sistémicos de la planta ante el ataque por fitopatógenos (Esquivel-Cote *et al.*, 2013). Se basa en vías reguladas por las fitohormonas jasmonato y etileno, y a su vez estas hormonas estimulan las respuestas de defensa de la planta huésped contra diversos patógenos como hongos, bacterias, virus, nematodos y plagas (Jeyanthi y Kanimozhi, 2018). La RSI es provocada por PGPB que tienen la capacidad de sintetizar algún metabolito secundario como lipopolisacáridos (LPS), sideróforos, lipopéptidos cíclicos, 2,4-diacetilfloroglucinol, lactonas de homoserina y volátiles como acetoína y 2,3-butanodiol (Nazir *et al.*, 2018). La respuesta al RSI se manifiesta con un aumento de la fuerza física y mecánica de la pared celular, así como por el ajuste de su reacción física y bioquímica al estrés ambiental. Se han reportado a *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas* sp. y enterobacterias con la capacidad de estimular la RSI (Odoh, 2017).

### **2.7.3 Antibióticos**

Las PGPB tienen un rol importante como biocontroladoras ante las enfermedades de las plantas. Uno de los principales mecanismos indirectos es el antagonismo directo contra patógenos a través de la síntesis y excreción de antibióticos (Fernando *et al.*, 2005). Diversas PGPR a través de la síntesis de antibióticos peptídicos limitan la síntesis de la pared celular de los patógenos, influyendo en las estructuras de la membrana de las células. Se destaca a *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus* sp. como supresores de microorganismos patógenos a través de este mecanismo.

Algunos antibióticos producidos por PGPR incluyen 2,4 diacetil floroglucinol, ácido fenazina-1-carboxílico, fenazina-1-carboxamida, pioluteorina, pirrolnitrina, oomicina A, viscosinamida, butirolactonas, etc. (Fernando *et al.*, 2005; Verma *et al.*, 2019). Se ha reportado en *B. subtilis* la capacidad de sintetizar más de 12 antibióticos entre los cuales se encuentran bacilomicina, micobacilina, fungistatina, iturina, fengicina, plipastatina, surfactina, bacilizina, entre otros. Antibióticos de amplio espectro como polimixina, circulina y colistina. También compuestos antifúngicos contra hongos patógenos como *Alternaria solani*, *Aspergillus flavus*, *Botryosphaeria ribis*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *Helminthosporium maydis* y *Phomopsis gossypii* (Kumar *et al.*, 2018). Además, la síntesis de antibióticos puede desencadenar la RSI de la planta, provocando que la correlación entre antibióticos-RSI le confiera mayor ventaja competitiva frente al patógeno. (Fernando *et al.*, 2005).

#### **2.7.4 Lipopéptidos**

Especies pertenecientes al género *Bacillus* tienen la capacidad de producir lipopéptidos, los cuales son conocidos por su actividad antifúngica y antibiótica (Desoignies *et al.*, 2013). Los lipopéptidos que se han identificado en *Bacillus* spp. se pueden clasificar en tres grupos: iturina, surfactina y fengicina. El grupo de iturina incluye iturina A, bacilomicina L, bacilomicina D, bacilomicina F y micosubtilinas. Iturina A producida por *B. subtilis* RB14 mostró efecto antagónico contra los hongos *P. ultimum*, *F. oxysporum*, *S. sclerotiorum*, *M. phaseolina* y *Podosphaera fusca*. El grupo de las surfactinas incluye surfactina, esperina, liquenisina y pumilacidina. Es producida por varias cepas de *B. subtilis*. Surfactina pudo reducir la infección de *Arabidopsis* con la bacteria *P. syringae*. Finalmente, el grupo de fengicina incluye fengicina A, fengicina B, plipastatin A y plipastatin B. Las fengicinas tienen efecto antagónico contra el hongo *P. fusca* (Sayyed, 2019).

#### **2.7.5 Enzimas líticas**

Diversas PGPB exhiben actividad lítica a través de enzimas, limitando el crecimiento de fitopatógenos como virus, insectos y helmintos (Santoyo *et al.*, 2019). Las

enzimas líticas son importantes en el biocontrol de hongos y en el reciclaje de nutrientes a través de la descomposición de materia orgánica, aumentando la disponibilidad de nutrientes en la rizósfera. Diversas especies bacterianas son capaces de sintetizar quitinasas, proteasa, lipasa, celulasas, glucanasas y esterases, las cuales tienen un papel importante en los procesos antes mencionados. Las paredes celulares de los hongos están compuestas principalmente por polisacáridos como  $\beta$ -1,3-glucano, quitina y materiales fibrilares unidos por azúcar, proteínas y lípidos (Manoj *et al.*, 2019). Las principales enzimas secretadas por PGPB con efecto lítico hacia las paredes celulares de los hongos son la celulosa, quitinasa, proteasas y  $\beta$ -1,3-glucanasa. La cepa *Bacillus cepacia* productora de  $\beta$ -1,3-glucanasa muestra efecto antagónico sobre diversos patógenos como *R. solani*, *Sclerotium rolfsii* y *P. ultimum* (Singh, 2018).

#### **2.7.6 Cianuro de hidrógeno (HCN)**

El cianuro de hidrógeno es un compuesto volátil derivado del metabolismo secundario bacteriano, puede ser producido por varias especies entre las cuales destacan las del género *Pseudomonas*, tal es el caso de *P. fluorescens* CHA0, que por la sinergia de la eficiente colonización de las raíces que caracteriza a esta especie y la producción de HCN, suprime la pudrición de la raíz negra del tabaco causada por *Thielaviopsis basicola* (Fernando *et al.*, 2005; Odoh, 2017). Por lo anterior, el HCN tiene un papel importante en el biocontrol de fitopatógenos. Existen reportes de la inhibición del crecimiento de micelios de hongos patógenos y nematodos por *P. putida* y *P. chlororaphis* O6 respectivamente (Sayyed, 2019).

El HCN no solamente tiene acción de biocontrol, también puede movilizar metales pesados, mejorando el crecimiento de las plantas que se encuentran bajo estas condiciones. La cepa productora de HCN, *Brevibacterium casei* MH8a, tiene la capacidad de mejorar el crecimiento de *Sinapis alba* L. bajo condiciones de estrés por metales pesados (Manoj *et al.* 2018).

### **2.7.7 Compuestos orgánicos volátiles: VOCs (Volatile Organic Compounds)**

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son moléculas de bajo peso molecular, podemos encontrar aldehídos, alcoholes, cetonas, hidrocarburos, indoles, derivados de ácidos grasos, terpenos y jasmonatos. Se han reportado cerca de 350 especies bacterianas con la capacidad de sintetizar más de 846 VOCs, dentro de estas especies encontramos a *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Stenotrophomonas* y *Serratia* (Velasco-Jiménez *et al.*, 2020). Los VOCs, promueven el crecimiento vegetal de forma indirecta o directa. Ejemplos de la promoción del crecimiento vegetal indirecto tenemos a *Bacillus megaterium* que es capaz de producir amoníaco, con el cual, puede inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Verma *et al.*, 2019), otros VOCs bacterianos con destacada actividad antifúngica son el ácido cianhídrico (HCN), dimetil disulfuro (DMSD) y *N, N*-dimetil hexadecilamina (DMHDA). Los VOCS actuando como mecanismo indirecto desempeñan roles en la comunicación con la planta, fungiendo como iniciadores de respuestas de defensa (Santoyo *et al.*, 2019).

### **2.7.8 Competencia por espacio y nutrientes**

La competencia por los nutrientes y el espacio es un mecanismo indirecto de las PGPB, se basa en los requerimientos nutricionales tanto del antagonista como del patógeno (Di Francesco *et al.*, 2017). Este mecanismo tiene un papel importante en el biocontrol de patógenos de plantas, cuando las bacterias no patógenas compiten con patógenos por los nutrientes orgánicos para proliferar y sobrevivir (Verma *et al.*, 2019; Srivastava *et al.*, 2021). Frecuentemente, la competencia por nutrientes y por espacio se consideran como uno mismo, esto no es así, ya que existe una diferencia clave entre ellas. En la competencia por nutrientes no se requiere contacto directo entre el antagonista y el agente patógeno, mientras que si es requerido en la competencia por espacio (Di Francesco *et al.*, 2017).

### **2.8 Mecanismos duales**

Cuando una bacteria PGPB por medio de un mecanismo tiene doble efecto benéfico en la planta, se le denomina mecanismo dual, por ejemplo, la síntesis de sideróforos

por bacterias del género *Pseudomonas* tienen dos efectos, la transformación del ión férrico a una forma asimilable para la planta y la quelación del Fe, lo cual restringe la disponibilidad de este nutriente para los patógenos, limitando su crecimiento. Otro ejemplo de mecanismo dual es la síntesis de compuestos orgánicos volátiles (COV) como son el ácido cianhídrico (HCN), el dimetil disulfuro (DMDS) y la DMHDA, los cuales se ha demostrado su capacidad de inhibir el crecimiento micelial de hongos patógenos, así como también iniciar la respuesta de defensa de las plantas, lo cual se ve reflejado en una promoción del crecimiento vegetal (Santoyo *et al.*, 2019).

## **2.9 Género *Bacillus* como agentes de biocontrol**

Se sabe que especies pertenecientes al género *Bacillus* tienen la capacidad de sintetizar fuertes metabolitos antifúngicos. Esta capacidad tiene un rol importante en la limitación de infecciones fúngicas, así como en la amortiguación de las enfermedades en plantas (Vágvölgyi *et al.*, 2012). Existen reportes del género *Bacillus* como agente de biocontrol contra diversos fitopatógenos y como PGPB. *Bacillus subtilis* 30VD-1, demostró tener antagonismo contra *Fusarium* spp. en condiciones *in vitro*, además de promover el crecimiento de planta de chícharo. Lo anterior se observó al inocular semillas de chícharo con la cepa de *Bacillus* 30VD-1. Los resultados mostraron una reducción considerable en la severidad del marchitamiento en las plantas con un aumento de aproximadamente un 35% en la biomasa de la planta seca sobre las plantas no inoculadas que crecen en suelos infestados por *Fusarium* spp (Khan *et al.*, 2018). De manera similar, *Bacillus* sp. B44 presentó mecanismos de control frente a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* inhibiendo su crecimiento micelial en un 79.37%. Se detectó la capacidad de B44 de producir enzimas hidrolíticas como  $\beta$ -1,3-glucanasa, proteasa y quitinasa, metabolitos volátiles y no volátiles. El aislado mostró en promedio una reducción del 36% en la incidencia de enfermedades en plantas de tomate en condiciones de invernadero, demostrando su efectividad como promotor de crecimiento vegetal (Jangir *et al.*, 2018). *Bacillus licheniformis* X-1 inhibió en un 75.7% el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. Esto puede ser debido a la capacidad de sintetizar antibióticos lipopéptidos, ya que se detectó el gen *bamB*

involucrado en la biosíntesis de bacilomicina, un grupo de antibióticos polipéptidos antimicóticos (Chen *et al.*, 2020-c). Rojas-Solís y colaboradores (2018) reportaron el antagonismo de *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 hacia *Botrytis cinerea*. CR71 logró inhibir en un 24% el crecimiento micelial del hongo fitopatógeno mediante ensayos de antagonismo por compuestos difusibles; sin embargo, el antagonismo fue mayor al tratarse de compuestos orgánicos volátiles (VOC por sus siglas en inglés), ya que el crecimiento micelial se inhibió un 52%. Se determinó que la producción de dimetildisulfuro (DMDS) era el principal compuesto con efecto inhibitorio. Más tarde, la cepa CR71, fue identificada como *Bacillus thuringiensis* (Flores *et al.*, 2020).

### **2.10 Estrés por calor en plantas**

El cambio climático puede afectar a los cultivos sensibles al calor al experimentar estrés por altas temperaturas, este tipo de estrés conduce a alteraciones en la germinación, crecimiento y desarrollo, así como a una baja producción (Kang *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2020). Por ejemplo, el aumento de 3 a 4°C en la temperatura puede provocar una disminución de la productividad de los cultivos agrícolas de hasta un 15–35%, lo cual atentaría contra el suministro mundial de alimentos (Khan *et al.*, 2020). Los registros meteorológicos muestran que las temperaturas medias anuales en las áreas donde se cultivan trigo, arroz, maíz y soja (cultivos importantes debido a que proporcionan dos tercios de la ingesta calórica humana) han aumentado en aproximadamente 1°C durante el último siglo y la proyección para el próximo siglo es que continúe aumentando (Coffel *et al.*, 2017).

### **2.11 Bacterias termotolerantes**

Las bacterias presentes en el suelo, de igual forma que las plantas, sufren estrés biótico y abiótico, los cuales son factores limitantes para su supervivencia, dentro de los factores abióticos se encuentra la temperatura. La mayoría de bacterias son capaces de proliferar en el rango mesófilo (30-37°C), aquellas bacterias capaces de crecer a temperaturas altas se les conoce como bacterias termófilas, estas bacterias tienen temperatura óptima de crecimiento a los 60°C. Por otro lado, aquellas

bacterias que pueden crecer en ambientes con temperaturas del rango termófilo, así como también presentar crecimiento dentro del rango mesófilo son clasificadas como termotolerantes (Aabed *et al.*, 2021).

### **2.12 Cepas termotolerantes del género *Bacillus***

Se han reportado bacterias pertenecientes al género *Bacillus* aisladas de diversos ambientes con la capacidad de tolerar temperaturas por encima del rango mesófilo (**Tabla 1**).

El uso de PGPB termotolerantes para contrarrestar o amortiguar los efectos del estrés por calor en plantas es una herramienta potencial para hacer frente al inminente aumento de la temperatura global. Para de esta forma aumentar el crecimiento y productividad bajo situaciones de estrés por calor, traduciéndose en beneficio hacia la planta (Khan *et al.*, 2020).

**Tabla 1.** Reportes de bacterias termotolerantes del género *Bacillus*.

<b>Aislado bacteriano</b>	<b>Temp. Máxima Reportada</b>	<b>Fuente de aislamiento</b>	<b>Referencia</b>
<i>Bacillus cereus</i> SA1	45°C	Suelo rizosférico de <i>E. crus-galli</i> .	Khan <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus licheniformis</i> ICHB5	55°C	Agua, Termas de Chancos, Ancash, Perú.	Tamariz-Angeles <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus licheniformis</i> LH(X-9)	60°C	Agua residual del campo petrolífero Liao-He, China.	Huang <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus licheniformis</i> NC(X-6)	60°C	Agua residual del campo petrolífero del Norte, China.	Huang <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus paralicheniformis</i> SO-1	60°C	Sedimento marino, Costa del mar Mediterráneo, Egipto.	Makled <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus pumilus</i> 10104	55°C	Agua, Termas, Laguna, Filipinas.	Hedreyda y Monsalud, 2017
<i>Bacillus pumilus</i> SL3	42°C	Agua, Lago salino Aran-Bidgol, Irán	Safary <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus sonorensis</i> SL5	42°C	Agua, Lago salino Aran-Bidgol, Irán	Safary <i>et al.</i> , 2013
<i>Bacillus</i> sp. 1262	65°C	Suelo, raíces de <i>Ficus ulmifolia</i> isla volcán Taal, Filipinas.	Hedreyda y Monsalud, 2017
<i>Bacillus</i> sp. SWU60	45°C	Suelo, Tailandia.	Seesom <i>et al.</i> , 2017
<i>Bacillus</i> sp. WF67	60°C	Composta, Beni-Suef, Egipto.	Ahmad <i>et al.</i> , 2018
<i>Bacillus subtilis</i> CM1	<50°C	Estiércol de vaca, Orissa, India.	Swain <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus subtilis</i> ICHB1	55°C	Agua, Termas de Chancos, Ancash, Perú.	Tamariz-Angeles <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus tequilensis</i> A	60°C	Destilado residual, al sur de Tamil Nadu, India.	Rameshkumar <i>et al.</i> , 2017
<i>Bacillus circulans</i> PK3-109	42°C	Región del desierto de Thar, Pakistán.	Bokhari <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus cereus</i> TCR17	50°C	Suelo, Trichy, Tamilnadu, India.	Bruno <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus</i> sp. BHU 08	55°C	Suelo, Uttar Pradesh, India.	Ram y Singh, 2018
<i>Bacillus altitudinis</i> KP-14	50°C	Suelo contaminado por metales, Ústí nad Labem, República Checa.	Pranaw <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus licheniformis</i> B3-15	60°C	Fluido térmico obtenido de respiradero hidrotermal, Islas Eolian, Italia.	Caccamo <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus cereus</i> PK6-16	42°C	Región del desierto de Thar, Pakistán.	Bokhari <i>et al.</i> , 2019

### **2.13 Cepas PGPB termotolerantes ante el estrés por calor en plantas**

Se ha reportado la capacidad de favorecer la salud de plantas bajo estrés por calor por parte de bacterias termotolerantes del género *Bacillus*. Esto lo comprobaron Khan y colaboradores en 2020, en plantas sometidas a estrés por calor, expusieron plantas de soja inoculadas con *Bacillus cereus* SA1 a este tipo de estrés, encontraron una mejora significativa en la ultraestructura de la hoja y la biomasa de la soja (peso fresco / seco, longitud de raíz / brote) después de 5 y 10 días bajo estrés en la planta con SA1 comparada con la control, esto puede deberse a la capacidad de *Bacillus cereus* SA1 de secretar AIA y GA, así como también a la capacidad de reducir hasta en un 67% la AS endógena.

### **2.14 Cepas PGPB termotolerantes como agentes de biocontrol**

Se ha reportado cepas PGPB termotolerantes de *Bacillus* con actividad antagónica contra patógenos fúngicos, tal es el caso de *Bacillus cereus* PK6-15 y *Bacillus circulans* PK3-109, capaces de crecer a una temperatura de hasta 42°C, que exhibieron antagonismo hacia *Botrytis cinerea*. En la identificación de características de PGPB se encontró que PK6-15 puede solubilizar el zinc y producir amonio, mientras que PK3-109 puede sintetizar AIA (Bokhari *et al.*, 2019). *Bacillus cereus* TCR17, promovió el crecimiento de *Sorghum bicolor*. En el tratamiento con TCR17 se observó un aumento la longitud del brote y la raíz en 149% y 73% respectivamente comparado contra el control. Esto puede deberse a la capacidad de sintetizar sideróforos, AIA y solubilización de fosfato. La temperatura de crecimiento más alta reportada para TCR17 fue de 50°C (Bruno *et al.*, 2020). *Bacillus* sp. BHU 08, mostró antagonismo contra *Rhizoctonia bataticola* y una gran tolerancia a las altas temperaturas, logrando crecer hasta 55°C. Además, al inocular plantas de garbanzo con BHU 08, se reportó un aumento del peso fresco y seco, así como la longitud del brote y raíz (Ram y Singh, 2018). *Bacillus altitudinis* KP-14, mostró antagonismo contra *Fusarium culmorum* y *Botrytis cinerea*, así como también mostró rasgos característicos de PGPB, como lo son, solubilización de fosfato, síntesis de AIA, amonio, sideróforos, HCN y actividad ACC desaminasa. La temperatura de crecimiento más alta de KP-14 fue de 50°C (Pranaw *et al.*, 2020).

### **2.15 Incendios subterráneos como fuente de bacterias termotolerantes**

Los incendios subterráneos son un tipo de incendios que se caracterizan por quemar la materia orgánica subterránea y las raíces de las plantas. Se forman cuando la materia orgánica subterránea hace combustión debido al calor y oxígeno proveniente del exterior. Además, pueden estar activos durante varios meses o años (Song *et al.*, 2019). En la etapa inicial son difíciles de detectar, mientras que, una vez encontrados, los incendios son extremadamente difíciles de extinguir por completo (Li *et al.*, 2018). Se detectan por la observación de grietas, fisuras, hundimientos, anomalías térmicas y degradación de la vegetación de la superficie (Song *et al.*, 2014).

El suelo que se encuentra entre el incendio subterráneo y el exterior tiene un gradiente de temperatura derivado del incendio, siendo mayor la temperatura en el suelo cercano al incendio e inferior el suelo cercano al exterior (Flores-Piña, 2021). Las bacterias que puedan estar habitando en este ambiente termófilo, pueden haber adoptado peculiares estrategias de supervivencia para lograr ventajas competitivas, lo que podría representar una fuente inexplorada de compuestos antifúngicos para el biocontrol de hongos fitopatógenos (Santos *et al.*, 2020).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los hongos fitopatógenos representan la principal causa de las pérdidas económicas en diversos cultivos de la industria agrícola y hortícola en todo el mundo. Actualmente, el control de estos fitopatógenos es a través de la aplicación indiscriminada y excesiva de compuestos químicos, los cuales provocan contaminación ambiental y alta toxicidad residual, además de que inducen la resistencia de cepas fitopatógenas a estos compuestos. Es por eso que se deben buscar alternativas amigables con el medio ambiente para el control de hongos fitopatógenos. El uso de bacterias con actividad antagónica es una alternativa potencial al uso de compuestos químicos. Las bacterias que habitan en ambientes extremos, como aquellas aisladas en zonas de incendios subterráneos, pueden haber adoptado importantes estrategias de supervivencia para lograr ventajas competitivas contra otros microorganismos, lo que podría representar una fuente inexplorada de compuestos antifúngicos para el control biológico de hongos fitopatógenos, particularmente en zonas agrícolas donde los suelos presentan elevadas temperaturas.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Las bacterias termófilas aisladas de suelos afectados por incendios presentan actividad antifúngica contra los hongos fitopatógenos *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF?

## 5. HIPÓTESIS

Las bacterias aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos presentan actividad antagónica *in vitro* contra los hongos fitopatógenos *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general:

Evaluar la actividad antagónica de cepas termotolerantes aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos contra los hongos fitopatógenos *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF.

### 6.2 Objetivos específicos:

- a) Identificar taxonómicamente los aislados bacterianos AF18-AF40.
- b) Evaluar el antagonismo de los aislados contra los hongos fitopatógenos *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF a través de compuestos difusibles y volátiles.
- c) Caracterizar el genoma de la cepa antagonista *Bacillus velezensis* AF12, e inferir funciones genéticas involucradas en la producción de compuestos antimicrobianos.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los experimentos se llevaron a cabo en Laboratorio de Diversidad Genómica del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

### 7.1 Material biológico

#### 7.1.1 Aislados bacterianos

*Muestreo previo:* El muestreo se realizó en suelos afectados por incendios subterráneos en la comunidad de Pueblo Viejo, municipio de Venustiano Carranza, Mich. Las muestras fueron colectadas en diferentes profundidades:

A una profundidad de 10cm y una temperatura de 42°C: AF03, AF04, AF05, AF06, AF07, AF08, AF09, AF16, AF17, AF20, AF21, AF23, AF24, AF25, AF26, AF27, AF28, AF29, AF30, AF31 y AF34. A 20cm de profundidad y una temperatura de 50°C: AF01 y AF02. A una profundidad de 30cm y una temperatura de 54°C: AF15 y AF38. A una profundidad de 40cm y una temperatura de 58°C: AF18, AF19, AF22 y AF40. Los aislados AF10, AF11, AF12, AF13, AF14, AF32, AF33, AF35, AF36, AF37 y AF39 fueron obtenidos de un mix de muestras de suelo de 10, 20 y 30cm de profundidad.

Finalmente, de las 40 cepas a trabajar en el presente proyecto de investigación, 15 están identificadas como miembros del género *Bacillus* y 2 como Actinobacterias (Flores-Piña, 2021).

El mantenimiento de los 40 aislados se realizó cada 21 días a través de resiembras con estriado simple en agar nutritivo (AN), las placas se incubaron a 30°C durante 24-48 horas en una incubadora Benchmark modelo SureTemp 70. Una vez que se mostraron colonias aisladas se resguardaron a 4°C.

Para la preservación de los 40 aislados se realizó un stock en glicerol. El cultivo líquido se realizó tomando una colonia aislada con un palillo de madera estéril y colocándolo dentro de un tubo de ensayo con 3mL de caldo nutritivo estéril, los tubos se incubaron a 37°C por 24 horas a 150rpm. Posteriormente, de los cultivos

se transfirieron 500  $\mu$ L hacia tubos eppendorf de 1.5 mL con 500  $\mu$ L de glicerol estéril y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **7.1.2 Cepas fúngicas**

Se utilizaron 2 cepas de hongos fitopatógenos aislados de fresa. Estas cepas están identificadas como *F. brachigybosum* 4BF y *Botrytis* sp. 62c (Morales-Zedeño, 2019).

El mantenimiento de las 2 cepas fúngicas fue cada 21 días realizando resiembras en agar papa dextrosa (APD). Se transfirió un fragmento circular de hongo a una nueva placa Petri con APD. El fragmento se obtuvo usando una pipeta Pasteur estéril y la transferencia hacia la nueva placa Petri fue con el uso de un palillo de madera estéril. Finalmente se incubó en obscuridad a temperatura ambiente. Todas las cepas bacterianas y fúngicas pertenecen al cepario microbiológico del Laboratorio de Diversidad Genómica.

## **7.2 Identificación taxonómica de los aislados AF18-AF40**

La identificación taxonómica de los aislados bacterianos AF18-AF40, se realizó a través de la secuenciación del gen ribosomal ARN 16S (Mr. DNA, Texas, USA).

### **7.2.1 Extracción de ADN genómico**

Se realizó la extracción de ADN genómico (ADNg) a partir de cultivos frescos de AF18-AF40 empleando el protocolo de extracción de ADN de Mahuku, 2004; una vez obtenido el ADN genómico, se verificó su integridad y calidad por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% disuelta en buffer TAE 1x con colorante Dimond (1mL/100mL de TAE 1x) y con lecturas en un microespectrofotómetro NanoDrop constatando una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1.8.

Para la electroforesis se cargaron 3 $\mu$ L de ADNg con 1 $\mu$ L de colorante Blue/Orange (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Las condiciones de corrida fueron de 100 V por 20 minutos. El gel fue observado a través de un Transiluminador Bio-Rad modelo Universal Hood II. Finalmente, las muestras se almacenaron a  $-4^{\circ}\text{C}$ .

### **7.2.2 Amplificación por PCR del gen ribosomal ARN 16S**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue realizada a los ADNg de AF18-AF40 para amplificar el gen ribosomal ARN 16S empleado los oligonucleótidos FD1 (5' – CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG – 3') y RD1 (5' – AAG GAG GTG ATC CAG CC – 3') (Rojas-Solís, *et al.*, 2018). Las condiciones de la reacción fueron 5' – 95°C, **1' – 95°C**, **1' – 55°C**, **2' – 72°C**, 10' – 72°C, X – 4°C (En negrita las condiciones que se repetirán 30 ciclos) (X = tiempo hasta que se sacará la muestra) y el proceso de realizó en una Termocicladora Benchmark modelo TC-32. Los 50µL del volumen final de la reacción se compusieron de 1µL de agua desionizada estéril con 50ng de ADN genómico, 1µL de FD1, 1µL de RD1, 22µL de agua desionizada estéril y 25µL de Green Master Mix (Promega, Madison, WI, EE. UU.).

La integridad y calidad de los productos de PCR se verificó por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 2% disuelta en buffer TAE 1x con colorante Dimond (1 mL/100mL de TAE 1x) y con lecturas en un microespectrofotómetro NanoDrop constatando una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1.8.

Para la electroforesis se cargaron 3µL del producto de PCR con 1µL de colorante Blue/Orange (Promega, Madison, WI, EE. UU.). Las condiciones de la electroforesis fueron de 80 V por 60 minutos. El gel fue observado a través de un Transiluminador Bio-Rad modelo Universal Hood II.

Finalmente, los productos de PCR fueron almacenados a -4°C

### **7.2.3 Secuenciación e identificación taxonómica de los amplicones**

Las muestras de los productos de PCR fueron enviadas a la empresa biotecnológica Macrogen, ubicada en Corea para su secuenciación.

Una vez recibidos los resultados de la secuenciación, se observó cada cromatograma para verificar la correcta secuenciación empleando el programa Mega versión 7.9. Finalmente se realizó la identificación de los aislados por medio de análisis bioinformáticos, realizando comparaciones de cada una de las secuencias de sus genes ribosomales 16S con la base de datos NCBI a través de

la herramienta Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **7.3 Evaluación de la actividad antagónica *in vitro* de los aislados termotolerantes contra *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF**

#### **7.3.1 Antagonismo contra *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF por compuestos difusibles**

La evaluación de la actividad antagónica de AF01-AF40 contra los hongos fitopatógenos *F. brachygibbosum* 4BF y *Botrytis* sp. 62c por compuestos difusibles se realizó a través de ensayos de antagonismo directo 1 contra 1 a partir de cultivos frescos tanto de las cepas fúngicas como de los tratamientos bacterianos.

Los ensayos se realizaron tomando con un asa bacteriológica estéril una colonia aislada la bacteria e inoculándola en forma de estriado en cruz en una nueva placa Petri con PDA generando 4 cuadrantes.

En el centro de cada cuadrante se inoculó un fragmento circular de hongo, el cual se obtuvo con el uso de una pipeta Pasteur estéril y fue transferido hacia la placa con cuadrantes a través de un palillo de madera estéril.

Finalmente, las unidades experimentales se incubaron en obscuridad a temperatura hasta que la medición del crecimiento micelial la totalidad de la superficie en la placa control.

La inhibición de las cepas que antagonizaron el crecimiento micelial de los dos hongos estudiados de forma estadísticamente significativa fue representada en porcentaje (%) y milímetros (mm) de inhibición con respecto al control. Este cálculo fue realizado con las siguientes fórmulas:

Para % de inhibición

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{R \text{ control} - R \text{ tratamiento}}{R \text{ tratamiento}} \times 100$$

Para mm de inhibición

$$\text{mm de inhibición} = R \text{ control} - R \text{ tratamiento}$$

Donde R es el crecimiento radial del hongo expresado en mm (Guevara-Avenida *et al.*, 2020). Finalmente, la desviación estándar se obtuvo mediante Minitab versión 19.1.

### **7.3.2 Antagonismo contra *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF por compuestos volátiles**

La evaluación de la actividad antagónica de AF01-AF40 contra los hongos fitopatógenos *F. brachygibbosum* 4BF y *Botrytis* sp. 62c por compuestos volátiles se realizó a través de ensayos de antagonismo en placa dividida partiendo cultivos bacterianos y fúngicos frescos. Los cultivos bacterianos frescos se realizaron en medio líquido siguiendo el mismo método que en la sección 7.1.1.

Los ensayos de antagonismo por compuestos volátiles se realizaron en placas con APD con una división. De un extremo se inocularon 50µL del cultivo bacteriano, mientras que, en el extremo contrario se inoculó un fragmento de hongo.

Al ser medio líquido en el cual se cultivó la bacteria para el presente ensayo, primero se inoculó la bacteria para permitir un correcto secado de la gota inoculada con carga bacteriana. Después se realizó la inoculación del fragmento del hongo en el centro del extremo contrario a donde se encontraba inculcada la bacteria. La obtención y transferencia del fragmento fúngico fue el mismo que el empleado en la sección 7.1.2. Finalmente, las unidades experimentales se incubaron en obscuridad a temperatura ambiente. La medición final del crecimiento micelial en los tratamientos se realizó midiendo el diámetro del hongo. Esta medición se realizó cuando el hongo en la placa control abarcó la totalidad de la superficie de su extremo en la placa dividida.

### **7.3.3 Diseño experimental**

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar (DCA), el cual se constituyó de 40 tratamientos (con bacteria) y 1 testigo (sin bacteria). La placa testigo y cada tratamiento se hicieron por duplicado (n=8).

Se utilizó el programa estadístico Minitab versión 19.1 para analizar los datos mediante un ANOVA y comparación de medias a través de la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ).

#### **7.4 Caracterización *in silico* de genoma de *B. velezensis* AF12**

La cepa seleccionada para su caracterización genómica fue *B. velezensis* AF12 por su buena actividad antagónica contra los hongos *F. brachygibbosum* 4BF y *Botrytis* sp. 62c en los ensayos de antagonismo por compuestos difusibles.

##### **7.4.1 Secuenciación de genoma completo de AF12**

Previo a la extracción de ADNg, para obtener un cultivo fresco se realizó una resiembra en medio líquido siguiendo el mismo método que en la sección 7.1.1.

El ADNg de AF12 se extrajo con el kit de extracción de ADN “Wizard Genomic DNA Purification (Promega)”. Se realizó una modificación en el proceso de extracción, precisamente en el lavado del ADN con etanol de grado molecular, realizándose dos lavados en lugar de uno para obtener una mayor pureza de la muestra. Una vez obtenido el ADN genómico, se verificó la integridad y calidad por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1% disuelta en buffer TAE 1x con colorante Dimond (1mL/100mL de TAE 1x) y con lecturas en un microespectrofotómetro NanoDrop constatando una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1.8.

Las condiciones de la electroforesis, así como los pasos a seguir se realizaron de igual forma que en la sección 7.2.1.

El gel fue observado a través de un Transiluminador Bio-Rad modelo Universal Hood II.

La muestra de ADNg de AF12 fue enviada a la empresa estadounidense Mr. DNA, ubicada en Texas para secuenciación del genoma a través de la tecnología de secuenciación Illumina HiSeq.

Los datos sin procesar que se obtuvieron fueron cargados al portal de datos Sequence Read Archive (SRA) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) del NCBI.

Posteriormente, se eliminaron bases secuenciadas de baja calidad a través de Trimmomatic versión 0.39 y se verificó la calidad de estas lecturas a través de FastQC 0.11.9.

#### **7.4.2 Ensamble de secuencias sin procesar y anotación de genoma**

El ensamble de genoma a partir de los datos crudos obtenidos de Trimmomatic se realizó a través de SPAdes versión 3.15.2.

Se realizó la anotación de genoma en los servidores PATRIC (<https://patricbrc.org/app/Annotation>) y RAST (<https://rast.nmpdr.org>) a partir de los contigs obtenidos del ensamble.

#### **7.4.3 Análisis filogenético de AF12**

El análisis filogenético se realizó con las secuencias de: los genes ribosomales ARN 16S de AF12, 46 cepas con mayor similitud al gen de AF12 extraídas de la base de la herramienta BLASTn de NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y de *Listeria innocua* Clp11262 que fue usado como grupo externo.

La secuencia y longitud del gen ribosomal ARN 16S de AF12 fueron obtenidas a partir de su genoma a través de la herramienta ContEst16S (<https://www.ezbiocloud.net/tools/contest16s>) del servidor EZBioCloud.

Con las 48 secuencias de los genes ribosomales 16S anteriormente mencionadas se realizó un árbol filogenético con máxima verosimilitud a 1,000 bootstraps usando el programa Mega versión 7.9.

#### **7.4.4 Índice general de relación del genoma (OGRI)**

Para el análisis OGRI (por sus siglas en inglés: Overall Genome Related Index) se seleccionaron cepas bacterianas con similitud  $\geq 98.7\%$  del gen ribosomal 16S con respecto a AF12.

Se empleó la secuencia del gen 16S ARNr obtenida con la herramienta ContEst16S (<https://www.ezbiocloud.net/tools/contest16s>) de EZBioCloud. Esta secuencia se insertó en la aplicación 16S-based ID de EZBioCloud

(<https://www.ezbiocloud.net/identify>) y se descargaron los genomas que cumplieron con la característica antes mencionadas.

Los análisis comparativos realizados entre el genoma de AF12 y los genomas recopilados fueron: identidad promedio de nucleótidos y comparación genoma-genoma a través la herramienta ANI Calculator de EZBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) y Genome-to-Genome Distance Calculator 2.1 (<https://ggdc.dsmz.de>), respectivamente.

#### **7.4.5 Análisis funcional: Subsistemas y metabolitos secundarios**

Para predecir las categorías funcionales y los metabolitos secundarios que presenta AF12, se realizaron análisis de subsistemas o categorías funcionales a través del servidor RAST (<https://rast.nmpdr.org>) y el análisis de predicción de metabolitos secundarios en antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org>).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Identificación taxonómica de los aislados AF18-AF40 a través de la secuenciación de sus genes ribosomales ARN 16S

#### 8.1.1 Extracción de ADN genómico

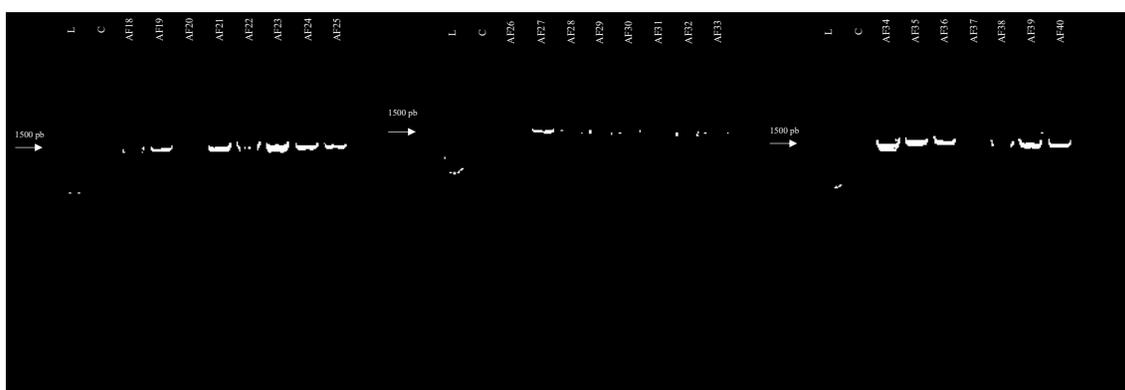
El ADN genómico de los 23 aislados se obtuvo a través del protocolo de extracción de ADN de Mahuku (2004). Se evaluó la concentración y calidad de los ADN extraídos a través de un microespectrofotómetro NanoDrop (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Concentración y calidad de los ADN genómicos de AF18-AF40 para uso en PCR

Cepa	Concentración de ácidos nucleicos	260/280
AF18	404.4 ng/μL	1.85
AF19	274.2 ng/μL	1.80
AF20	17.7 ng/μL	2.01
AF21	376.9 ng/μL	2.05
AF22	456.3 ng/μL	1.99
AF23	114.3 ng/μL	1.89
AF24	16.0 ng/μL	1.86
AF25	222.4 ng/μL	2.05
AF26	178.3 ng/μL	2.05
AF27	141.2 ng/μL	2.02
AF28	12.7 ng/μL	1.91
AF29	177.8 ng/μL	1.91
AF30	49.4 ng/μL	2.05
AF31	249.0 ng/μL	2.00
AF32	159.3 ng/μL	2.00
AF33	744.4 ng/μL	2.01
AF34	1033.7 ng/μL	2.04
AF35	160.9 ng/μL	2.01
AF36	255.8 ng/μL	1.97
AF37	236.5 ng/μL	1.97
AF38	397.7 ng/μL	2.02
AF39	169.3 ng/μL	1.98
AF40	223.5 ng/μL	2.01

### 8.1.2 Amplificación por PCR del gen ribosomal ARN 16S

La reacción en cadena de la polimerasa de los ADN de los aislados fue exitosa para 18 de 23 de ellos, esto se verificó en una electroforesis en gel de agarosa a 2%. Se pudo observar una banda de tamaño esperado (~1,600pb) para la mayoría de los aislados, aquellos en los cuales la amplificación no fue exitosa son AF20, AF26, AF31 y AF37 (**Figura 1**). La calidad y cantidad de las muestras con los productos de PCR fueron evaluadas por medio de un microespectrofotómetro NanoDrop (**Tabla 3**).



**Figura 1.** Electroforesis de los productos de PCR del gen ribosomal ARN 16S. Primer carril (L): marcador de peso molecular. Segundo carril (C): control negativo.

**Tabla 3.** Concentración y calidad de los productos de PCR de los genes ribosomales ARN 16S de AF18-AF40.

<b>Aislado</b>	<b>Concentración de ácidos nucleicos</b>	<b>260/280</b>
AF18	933.5 ng/μL	2.03
AF19	919.3 ng/μL	2.01
AF20	963.6 ng/μL	2.02
AF21	888.9 ng/μL	2.03
AF22	971.0 ng/μL	2.03
AF23	877.3 ng/μL	2.05
AF24	963.7 ng/μL	2.02
AF25	964.1 ng/μL	1.99
AF26	960.6 ng/μL	2.01
AF27	948.9 ng/μL	2.01
AF28	936.6 ng/μL	2.01
AF29	897.7 ng/μL	2.05
AF30	956.0 ng/μL	2.01
AF31	249.0 ng/μL	2.10
AF32	911.8 ng/μL	2.02
AF33	947.0 ng/μL	2.02
AF34	1083.0 ng/μL	2.00
AF35	970.9 ng/μL	2.02
AF36	909.4 ng/μL	2.00
AF37	988.7 ng/μL	2.02
AF38	888.6 ng/μL	2.02
AF39	886.4 ng/μL	2.02
AF40	884.0 ng/μL	2.02

### 8.1.3 Secuenciación e identificación taxonómica

La secuenciación de los productos de PCR se realizó a cargo de la empresa biotecnológica Macrogen ubicada en Corea. Se mandaron secuenciar aquellas muestras de las cuales se pudo observar en la electroforesis bandas con el tamaño esperado.

Se verificó la calidad de la secuenciación a través de la observación de sus cromatogramas con el programa MEGA versión 7.9 y se compararon con la base de datos pública NCBI a través de la herramienta Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn) (**Figura 2**). En la **Tabla 4** se puede observar los resultados

del GenBank donde se muestran las especies bacterianas con mayor similitud en la secuencia del gen ribosomal 16S comparadas con los genes ribosomales 16S de cada aislado empleado en el presente proyecto. De las 18 cepas identificadas, se puede observar que la mayoría son del género *Bacillus*.

a)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodococcus pyridinivorans strain PDB9 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Rhodococcus pyridinivorans</a>	1906	1906	99%	0.0	97.50%	1477	<a href="#">NR_025033.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodococcus pyridinivorans strain DSM 44555 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Rhodococcus pyridinivorans</a>	1903	1903	97%	0.0	98.08%	1363	<a href="#">NR_118620.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodococcus biphenylivorans strain TG9 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Rhodococcus biphenylivorans</a>	1879	1879	99%	0.0	97.05%	1515	<a href="#">NR_134798.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodococcus gordoniae strain W4937 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Rhodococcus gordoniae</a>	1829	1829	94%	0.0	97.83%	1403	<a href="#">NR_025730.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodococcus rhodochrous strain 372 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Rhodococcus rhodochrous</a>	1823	1823	99%	0.0	96.16%	1474	<a href="#">NR_037023.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodococcus lactis strain DW151B 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Rhodococcus lactis</a>	1821	1821	98%	0.0	96.56%	1426	<a href="#">NR_145622.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodococcus rhodochrous strain DSM 43241 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Rhodococcus rhodochrous</a>	1820	1820	99%	0.0	96.07%	1444	<a href="#">NR_116689.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Rhodococcus rhodochrous strain DSM 43241 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Rhodococcus rhodochrous</a>	1818	1818	98%	0.0	96.47%	1375	<a href="#">NR_118621.1</a>

b)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus zanthoxyli strain 1433 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus zanthoxyli</a>	1917	1917	99%	0.0	98.02%	1438	<a href="#">NR_164882.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium NBRC 15308 = ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus megaterium NBRC 1...</a>	1916	1916	98%	0.0	98.10%	1477	<a href="#">NR_112636.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus aryabhatai B8W22 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus aryabhatai B8W22</a>	1916	1916	98%	0.0	98.10%	1533	<a href="#">NR_115953.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1916	1916	98%	0.0	98.10%	1394	<a href="#">NR_116873.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1914	1914	96%	0.0	98.71%	1495	<a href="#">NR_117473.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain IAM 13418 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1905	1905	98%	0.0	97.92%	1486	<a href="#">NR_043401.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus flexus strain SBMP3 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia flexa</a>	1855	1855	98%	0.0	97.11%	1499	<a href="#">NR_118382.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus flexus strain IFO15715 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia flexa</a>	1855	1855	98%	0.0	97.10%	1529	<a href="#">NR_024691.1</a>

c)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus niacini strain NBRC 15566 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus niacini</a>	1550	1550	99%	0.0	97.38%	1475	<a href="#">NR_113777.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus niacini strain IFO15566 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus niacini</a>	1548	1548	99%	0.0	97.38%	1526	<a href="#">NR_024695.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus bataviensis strain NBRC 102449 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus bataviensis</a>	1548	1548	99%	0.0	97.38%	1475	<a href="#">NR_114093.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus bataviensis strain IDA1115 16S ribosomal RNA gene, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus bataviensis</a>	1548	1548	99%	0.0	97.38%	1502	<a href="#">NR_036766.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus soli strain R-16300 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus soli</a>	1546	1546	99%	0.0	97.27%	1441	<a href="#">NR_025591.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus ginsengisoli strain DCY53 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus ginsengisoli</a>	1544	1544	98%	0.0	97.68%	1437	<a href="#">NR_109068.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus pocheonensis strain Gsoil 420 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus pocheonensis</a>	1543	1543	99%	0.0	97.27%	1490	<a href="#">NR_041377.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus vireti strain R-15447 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus vireti</a>	1543	1543	99%	0.0	97.16%	1435	<a href="#">NR_025590.1</a>

d)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus halotolerans strain LMG 22477 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus halotolerans</a>	1818	1818	99%	0.0	97.65%	1468	<a href="#">NR_115931.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus halotolerans strain CECT 5687 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus halotolerans</a>	1818	1818	99%	0.0	97.65%	1468	<a href="#">NR_115930.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus halotolerans strain LMG 22476 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus halotolerans</a>	1818	1818	99%	0.0	97.65%	1468	<a href="#">NR_115929.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus halotolerans strain DSM 8802 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus halotolerans</a>	1818	1818	99%	0.0	97.65%	1545	<a href="#">NR_115063.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain NRRL B-23049 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus spizizenii</a>	1812	1812	99%	0.0	97.55%	1409	<a href="#">NR_024931.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus mojavensis strain IFO15718 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus mojavensis</a>	1812	1812	99%	0.0	97.55%	1526	<a href="#">NR_024693.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus halotolerans strain CR-95 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus halotolerans</a>	1812	1812	99%	0.0	97.55%	1420	<a href="#">NR_115282.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus mojavensis strain NBRC 15718 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus mojavensis</a>	1812	1812	99%	0.0	97.55%	1475	<a href="#">NR_112725.1</a>

e)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus shackletonii strain LMG 18435 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus shackletonii</a>	1173	1173	98%	0.0	98.07%	1503	<a href="#">NR_025373.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans strain M215 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans</a>	1110	1110	98%	0.0	96.45%	1496	<a href="#">NR_118832.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus vini strain LAM0415 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus vini</a>	1101	1101	98%	0.0	96.17%	1460	<a href="#">NR_146819.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus acidicola strain 105-2 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus acidicola</a>	1096	1096	98%	0.0	96.01%	1548	<a href="#">NR_041942.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus camelliae strain 7578-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus camelliae</a>	1096	1096	91%	0.0	98.25%	1549	<a href="#">NR_159341.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans strain M215 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans</a>	1096	1096	98%	0.0	96.01%	1497	<a href="#">NR_026010.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans strain M215 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans</a>	1085	1085	98%	0.0	95.72%	1497	<a href="#">NR_118833.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus pakistanensis strain NCCP-168 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus pakistanensis</a>	1064	1064	97%	0.0	95.52%	1411	<a href="#">NR_125453.1</a>

f)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1783	1783	99%	0.0	98.15%	1495	<a href="#">NR_117473.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium NBRC 15308 = ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus megaterium NBRC 1...</a>	1783	1783	99%	0.0	98.15%	1477	<a href="#">NR_112636.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus aryabhattai B8W22 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus aryabhattai B8W22</a>	1783	1783	99%	0.0	98.15%	1533	<a href="#">NR_115953.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1783	1783	99%	0.0	98.15%	1394	<a href="#">NR_116873.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus zanthoxyli strain 1433 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus zanthoxyli</a>	1777	1777	99%	0.0	98.14%	1438	<a href="#">NR_164882.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain IAM 13418 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1772	1772	99%	0.0	97.95%	1486	<a href="#">NR_043401.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus flexus strain IFO15715 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia flexa</a>	1722	1722	99%	0.0	97.08%	1529	<a href="#">NR_024691.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus flexus strain NBRC 15715 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia flexa</a>	1722	1722	99%	0.0	97.08%	1478	<a href="#">NR_113800.1</a>

g)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus aryabhattai B8W22 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus aryabhattai B8W22</a>	1888	1888	99%	0.0	98.24%	1533	<a href="#">NR_115953.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus zanthoxyli strain 1433 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus zanthoxyli</a>	1886	1886	100%	0.0	98.15%	1438	<a href="#">NR_164882.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1877	1877	99%	0.0	98.06%	1495	<a href="#">NR_117473.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium NBRC 15308 = ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus megaterium NBRC 1...</a>	1877	1877	99%	0.0	98.06%	1477	<a href="#">NR_112636.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1877	1877	99%	0.0	98.06%	1394	<a href="#">NR_116873.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain IAM 13418 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1866	1866	99%	0.0	97.87%	1486	<a href="#">NR_043401.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus flexus strain SBMP3 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia flexa</a>	1827	1827	99%	0.0	97.23%	1499	<a href="#">NR_118382.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus qingshengii strain G19 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia qingshengii</a>	1816	1816	99%	0.0	97.21%	1455	<a href="#">NR_133978.1</a>

h)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Streptomyces afghaniensis strain ISP 5228 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Streptomyces afghaniensis</a>	1842	1842	96%	0.0	98.38%	1449	<a href="#">NR_114833.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Streptomyces afghaniensis strain NBRC 12831 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Streptomyces afghaniensis</a>	1842	1842	96%	0.0	98.38%	1475	<a href="#">NR_041221.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Streptomyces africanus strain NBRC 101005 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Streptomyces africanus</a>	1836	1836	96%	0.0	98.29%	1456	<a href="#">NR_112600.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Streptomyces africanus strain CPJVR-H 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Streptomyces africanus</a>	1836	1836	96%	0.0	98.29%	1488	<a href="#">NR_025722.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Streptomyces levis strain NRRL B-16370 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Streptomyces levis</a>	1796	1796	96%	0.0	97.62%	1569	<a href="#">NR_115778.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Streptomyces levis strain NBRC 15423 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Streptomyces levis</a>	1796	1796	96%	0.0	97.62%	1455	<a href="#">NR_041184.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Streptomyces brasiliensis strain NBRC 101283 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Streptomyces brasiliensis</a>	1792	1792	96%	0.0	97.52%	1458	<a href="#">NR_041435.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Streptomyces asenjonii strain KNN 35.1b 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Streptomyces asenjonii</a>	1790	1790	96%	0.0	97.53%	1382	<a href="#">NR_152642.1</a>

i)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus halotolerans strain LMG 22477 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus halotolerans</a>	1642	1642	99%	0.0	97.90%	1468	<a href="#">NR_115931.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus halotolerans strain CECT 5687 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus halotolerans</a>	1642	1642	99%	0.0	97.90%	1468	<a href="#">NR_115930.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus halotolerans strain LMG 22476 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus halotolerans</a>	1642	1642	99%	0.0	97.90%	1468	<a href="#">NR_115929.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus halotolerans strain DSM 8802 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus halotolerans</a>	1642	1642	99%	0.0	97.90%	1545	<a href="#">NR_115063.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus halotolerans strain CR-95 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus halotolerans</a>	1639	1639	99%	0.0	97.80%	1420	<a href="#">NR_115282.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus mojavensis strain ifo 15718 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus mojavensis</a>	1637	1637	99%	0.0	97.99%	1409	<a href="#">NR_118290.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus subtilis subsp. spizizenii strain NRRL B-23049 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus spizizenii</a>	1637	1637	99%	0.0	97.79%	1409	<a href="#">NR_024931.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus mojavensis strain IFO15718 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus mojavensis</a>	1637	1637	99%	0.0	97.79%	1526	<a href="#">NR_024693.1</a>

j)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus shackletonii strain LMG 18435 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus shackletonii</a>	1890	1890	99%	0.0	97.98%	1503	<a href="#">NR_025373.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus camelliae strain 7578-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus camelliae</a>	1799	1799	95%	0.0	97.80%	1549	<a href="#">NR_159341.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus acidicola strain 105-2 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus acidicola</a>	1796	1796	95%	0.0	97.70%	1548	<a href="#">NR_041942.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans strain M215 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans</a>	1749	1749	99%	0.0	95.70%	1496	<a href="#">NR_118832.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus vini strain LAM0415 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus vini</a>	1742	1742	95%	0.0	96.84%	1460	<a href="#">NR_146819.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus qingshengii strain Gsoil 114 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Weizmannia qingshengii</a>	1738	1738	99%	0.0	95.52%	1499	<a href="#">NR_041378.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans strain M215 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans</a>	1735	1735	99%	0.0	95.43%	1497	<a href="#">NR_026010.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans strain M215 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans</a>	1724	1724	99%	0.0	95.25%	1497	<a href="#">NR_118833.1</a>

k)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1864	1864	99%	0.0	97.96%	1495	<a href="#">NR_117473.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium NBRC 15308 = ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus megaterium NBRC 1...</a>	1864	1864	99%	0.0	97.96%	1477	<a href="#">NR_112636.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus aryabhattai B8W22 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus aryabhattai B8W22</a>	1864	1864	99%	0.0	97.96%	1533	<a href="#">NR_115953.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1864	1864	99%	0.0	97.96%	1394	<a href="#">NR_116873.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus zanthoxyli strain 1433 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus zanthoxyli</a>	1858	1858	99%	0.0	97.96%	1438	<a href="#">NR_164882.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain IAM 13418 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1853	1853	99%	0.0	97.77%	1486	<a href="#">NR_043401.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus flexus strain IFO15715 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia flexa</a>	1803	1803	99%	0.0	96.94%	1529	<a href="#">NR_024691.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus flexus strain NBRC 15715 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia flexa</a>	1803	1803	99%	0.0	96.94%	1478	<a href="#">NR_113800.1</a>

l)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus wiedmannii strain FSL W8-0169 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus wiedmannii</a>	1325	1325	92%	0.0	97.67%	1540	<a href="#">NR_152692.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus proteolyticus strain MCCC 1A00365 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus proteolyticus</a>	1325	1325	92%	0.0	97.67%	1509	<a href="#">NR_157735.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus fungorum strain 17-SMS-01 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus fungorum</a>	1325	1325	92%	0.0	97.67%	1576	<a href="#">NR_170494.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus cereus strain IAM 12605 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus cereus</a>	1319	1319	92%	0.0	97.55%	1486	<a href="#">NR_115526.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus tropicus strain MCCC 1A01406 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus tropicus</a>	1319	1319	92%	0.0	97.55%	1509	<a href="#">NR_157736.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus paramycoides strain MCCC 1A04098 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus paramycoides</a>	1319	1319	92%	0.0	97.55%	1509	<a href="#">NR_157734.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus nitratireducens strain MCCC 1A00732 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus nitratireducens</a>	1319	1319	92%	0.0	97.55%	1509	<a href="#">NR_157732.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus luti strain MCCC 1A00359 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus luti</a>	1319	1319	92%	0.0	97.55%	1509	<a href="#">NR_157730.1</a>

m)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus shackletonii strain LMG 18435 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus shackletonii</a>	1941	1941	99%	0.0	98.99%	1503	<a href="#">NR_025373.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus camelliae strain 7578-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus camelliae</a>	1827	1827	95%	0.0	98.37%	1549	<a href="#">NR_159341.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus acidicola strain 105-2 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus acidicola</a>	1823	1823	95%	0.0	98.27%	1548	<a href="#">NR_041942.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans strain M215 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans</a>	1779	1779	99%	0.0	96.33%	1496	<a href="#">NR_118832.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus ginsengihumi strain Gsoil 114 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Weizmannia ginsengihumi</a>	1779	1779	99%	0.0	96.32%	1499	<a href="#">NR_041378.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus vini strain LAM0415 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus vini</a>	1773	1773	99%	0.0	96.15%	1460	<a href="#">NR_146819.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans strain M215 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus sporothermodurans</a>	1764	1764	99%	0.0	96.06%	1497	<a href="#">NR_026010.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus dakarensis strain Marseille-P3515 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus dakarensis</a>	1753	1753	99%	0.0	95.86%	1472	<a href="#">NR_147382.1</a>

n)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1404	1404	100%	0.0	97.36%	1495	<a href="#">NR_117473.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium NBRC 15308 = ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus megaterium NBRC 1...</a>	1404	1404	100%	0.0	97.36%	1477	<a href="#">NR_112636.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus aryabhatai B8W22 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus aryabhatai B8W22</a>	1404	1404	100%	0.0	97.36%	1533	<a href="#">NR_115953.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain ATCC 14581 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1404	1404	100%	0.0	97.36%	1394	<a href="#">NR_116873.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus zanthoxyli strain 1433 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus zanthoxyli</a>	1399	1399	99%	0.0	97.35%	1438	<a href="#">NR_164882.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus megaterium strain IAM 13418 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia megaterium</a>	1393	1393	100%	0.0	97.12%	1486	<a href="#">NR_043401.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus qingshengii strain G19 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia qingshengii</a>	1371	1371	99%	0.0	96.86%	1455	<a href="#">NR_133978.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus flexus strain IFO15715 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Priestia flexa</a>	1343	1343	100%	0.0	96.04%	1529	<a href="#">NR_024691.1</a>

ñ)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Micromonospora aurantiaca strain ATCC 27029 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Micromonospora aura...</a>	1585	1585	72%	0.0	97.24%	1503	<a href="#">NR_074415.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Micromonospora aurantiaca strain DSM 43813 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Micromonospora aura...</a>	1580	1580	72%	0.0	97.14%	1476	<a href="#">NR_026279.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Micromonospora sediminicola strain SH2-13 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Micromonospora sedi...</a>	1574	1574	72%	0.0	97.03%	1416	<a href="#">NR_113304.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Micromonospora maritima strain D10-9-5 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Micromonospora marit...</a>	1574	1574	72%	0.0	97.03%	1495	<a href="#">NR_109311.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Micromonospora chalcea strain ATCC 12452 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Micromonospora chalc...</a>	1568	1568	72%	0.0	96.93%	1409	<a href="#">NR_118842.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Micromonospora marina strain JSM1-1 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Micromonospora marina</a>	1568	1568	72%	0.0	96.92%	1437	<a href="#">NR_112537.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Micromonospora purpureochromogenes strain Antibioticos S.A. 2CG-315 16S ribosomal RNA, partial sequ...</a>	<a href="#">Micromonospora purp...</a>	1563	1563	72%	0.0	96.82%	1472	<a href="#">NR_037080.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Micromonospora chalcea strain 1464-217L 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Micromonospora chalc...</a>	1563	1563	72%	0.0	96.82%	1477	<a href="#">NR_036795.1</a>

o)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus niacini strain NBRC 15566 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus niacini</a>	1650	1650	99%	0.0	98.01%	1475	<a href="#">NR_113777.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus niacini strain IFO15566 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus niacini</a>	1648	1648	99%	0.0	98.01%	1526	<a href="#">NR_024695.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus cucumis strain AP-6 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus cucumis</a>	1594	1594	99%	0.0	96.96%	1474	<a href="#">NR_148626.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus soli strain NBRC 102451 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus soli</a>	1581	1581	99%	0.0	96.54%	1454	<a href="#">NR_114095.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus soli strain R-16300 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus soli</a>	1580	1580	99%	0.0	96.64%	1441	<a href="#">NR_025591.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus jeddahensis strain JCE 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus jeddahensis</a>	1578	1578	99%	0.0	96.65%	1517	<a href="#">NR_144699.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus ginsengisoli strain DCY53 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Bacillus ginsengisoli</a>	1578	1578	99%	0.0	96.65%	1437	<a href="#">NR_109068.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus bataviensis strain NBRC 102449 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Neobacillus bataviensis</a>	1576	1576	99%	0.0	96.64%	1475	<a href="#">NR_114093.1</a>

p)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">[Brevibacterium] frigiditolerans strain DSM 8801 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">[Brevibacterium] frigiditolerans</a>	1840	1840	99%	0.0	99.22%	1540	<a href="#">NR_115064.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">[Brevibacterium] frigiditolerans strain DSM 8801 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">[Brevibacterium] frigiditolerans</a>	1836	1836	99%	0.0	99.12%	1503	<a href="#">NR_117474.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus simplex NBRC 15720 = DSM 1321 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Peribacillus simplex NBRC 15720...</a>	1834	1834	99%	0.0	99.12%	1476	<a href="#">NR_112726.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus simplex strain LMG 11160 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Peribacillus simplex</a>	1834	1834	99%	0.0	99.12%	1503	<a href="#">NR_114919.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus simplex NBRC 15720 = DSM 1321 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Peribacillus simplex NBRC 15720...</a>	1827	1827	99%	0.0	99.02%	1522	<a href="#">NR_042136.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus muralis strain LMG 20238 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Peribacillus muralis</a>	1807	1807	99%	0.0	98.63%	1504	<a href="#">NR_104284.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus muralis strain LMG 20238 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Peribacillus muralis</a>	1807	1807	99%	0.0	98.63%	1504	<a href="#">NR_042083.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Bacillus butanolivorans strain K9 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Peribacillus butanolivorans</a>	1796	1796	99%	0.0	98.43%	1471	<a href="#">NR_044170.1</a>

q)	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3 16S ribosomal RNA, complete sequence</a>	<a href="#">Pseudarthrobacter phenanthrenivorans ...</a>	1947	1947	96%	0.0	99.08%	1530	<a href="#">NR_074770.2</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudarthrobacter phenanthrenivorans Sphe3 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Pseudarthrobacter phenanthrenivorans ...</a>	1941	1941	96%	0.0	98.99%	1520	<a href="#">NR_042469.2</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudarthrobacter siccitolerans strain 4J27 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Pseudarthrobacter siccitolerans</a>	1903	1903	96%	0.0	98.34%	1420	<a href="#">NR_108849.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudarthrobacter oxydans strain DSM 20119 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Pseudarthrobacter oxydans</a>	1899	1899	96%	0.0	97.99%	1486	<a href="#">NR_026236.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudarthrobacter polychromogenes strain DSM 20136 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Pseudarthrobacter polychromogenes</a>	1897	1897	96%	0.0	97.99%	1472	<a href="#">NR_026192.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudarthrobacter equi strain IMMIB L-1606 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Pseudarthrobacter equi</a>	1890	1890	96%	0.0	98.16%	1487	<a href="#">NR_117032.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudarthrobacter defluvii strain 4C1-a 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Pseudarthrobacter defluvii</a>	1879	1879	96%	0.0	97.97%	1463	<a href="#">NR_042573.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Pseudarthrobacter scleromae strain YH-2001 16S ribosomal RNA, partial sequence</a>	<a href="#">Pseudarthrobacter scleromae</a>	1877	1877	96%	0.0	97.72%	1415	<a href="#">NR_041824.1</a>

**Figura 2.** Comparación de las secuencias de los genes ribosomales 16S de los aislados AF18-AF40 con la base de datos del NCBI. La comparación de las secuencias de a) AF18, b) AF21, c) AF22, d) AF23, e) AF24, f) AF25, g) AF27, h) AF28, i) AF29, j) AF30, k) AF32, l) AF33, m) AF34, n) AF35, ñ) AF36, o) AF38, p) AF39 y q) AF40. Se realizó en la base de datos pública NCBI a través de la herramienta BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

**Tabla 4.** Identificación taxonómica a través de la comparación de las secuencias de los genes ribosomales 16S con la base de datos NCBI. La cepa seleccionada fue aquella con el mayor porcentaje de identidad y que este fuese  $\geq 97\%$ .

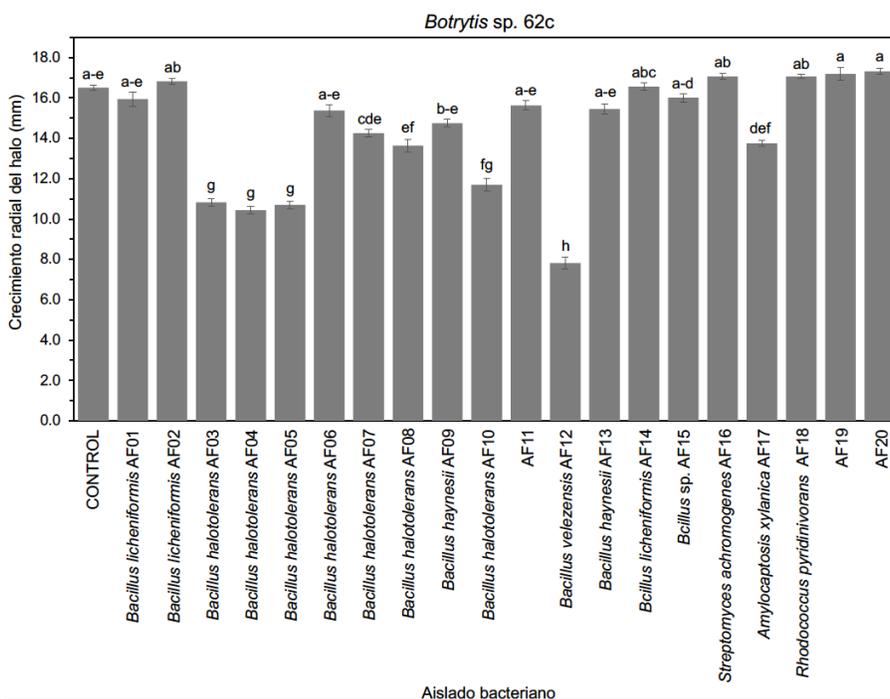
Aislado	Cepa de referencia	No. Acceso	Porcentaje de identidad
AF18	<i>Rhodococcus pyridinivorans</i> strain PDB9	NR_025033.1	97.50%
AF21	<i>Bacillus zanthoxyli</i> strain 1433	NR_164882.1	98.02%
AF22	<i>Bacillus niacini</i> strain NBRC 15566	NR_113777.1	97.38%
AF23	<i>Bacillus halotolerans</i> strain LMG 22477	NR_115931.1	97.65%
AF24	<i>Bacillus shackletonii</i> strain LMG 18435	NR_025373.1	98.07%
AF25	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
AF27	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain B8W22	NR_115953.1	98.24%
AF28	<i>Streptomyces afghaniensis</i> strain ISP 5228	NR_114833.1	98.38%
AF29	<i>Bacillus halotolerans</i> strain LMG 22477	NR_115931.1	97.90%
AF30	<i>Bacillus shackletonii</i> strain LMG 18435	NR_025373.1	97.98%
AF32	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
AF33	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
AF34	<i>Bacillus shackletonii</i> strain LMG 18435	NR_025373.1	98.99%
AF35	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
AF36	<i>Micromonospora aurantiaca</i> strain ATCC 27029	NR_074415.1	97.24%
AF38	<i>Bacillus 41iacin</i> strain NBRC 15566	NR_113777.1	98.01%
AF39	<i>[Brevibacterium] frigiditolerans</i> strain DSM 8801	NR_115064.1	99.22%
AF40	<i>Pseudarthrobacter phenanthrenivorans</i> strain Sphe3	NR_074770.2	99.08%

## 8.2 Evaluación de la actividad antagónica *in vitro* de los aislados termotolerantes contra *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF

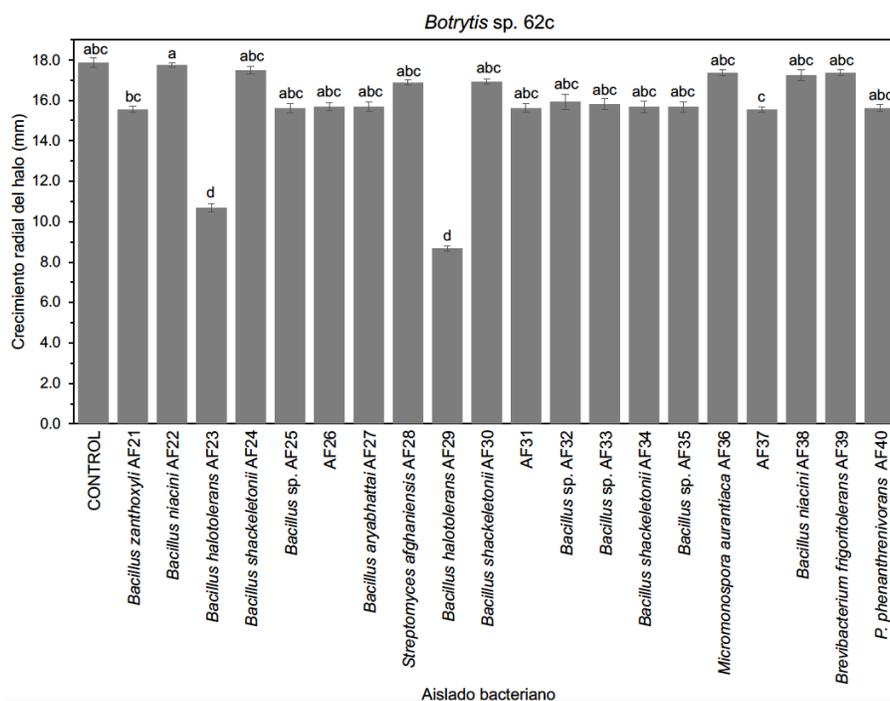
### 8.2.1 Antagonismo contra *Botrytis* sp. 62c por compuestos difusibles

En los ensayos de antagonismo por compuestos difusibles *in vitro* se observó una disminución en el crecimiento micelial de *Botrytis* sp. 62c por 8 cepas bacterianas, las cuales, a través de un análisis estadístico de comparación de medias Tukey, mostraron diferencias significativas comparados con el crecimiento de la placa control a un  $\alpha=0.05$  (**Figura 3-4**). Las cepas con esta actividad son: *Bacillus halotolerans* AF03, *Bacillus halotolerans* AF04, *Bacillus halotolerans* AF05, *Bacillus halotolerans* AF08, *Bacillus halotolerans* AF10, *Bacillus velezensis* AF12, *Bacillus halotolerans* AF23 y *Bacillus halotolerans* AF29.

Los 8 tratamientos que mostraron disminución en el crecimiento micelial de *Botrytis* sp. 62c de forma significativa se muestra expresada en milímetros y % de inhibición (**Tabla 5**). Los ensayos de antagonismo se muestran en la **Figura 5**.



**Figura 3.** Crecimiento micelial de *Botrytis* sp. 62c con los tratamientos AF01-AF20 a través de ensayos de compuestos difusibles. La comparación de medias con respecto al control se realizó por la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Las barras de error representadas muestran el error estándar (EE) de la media ( $n = 8$ ).

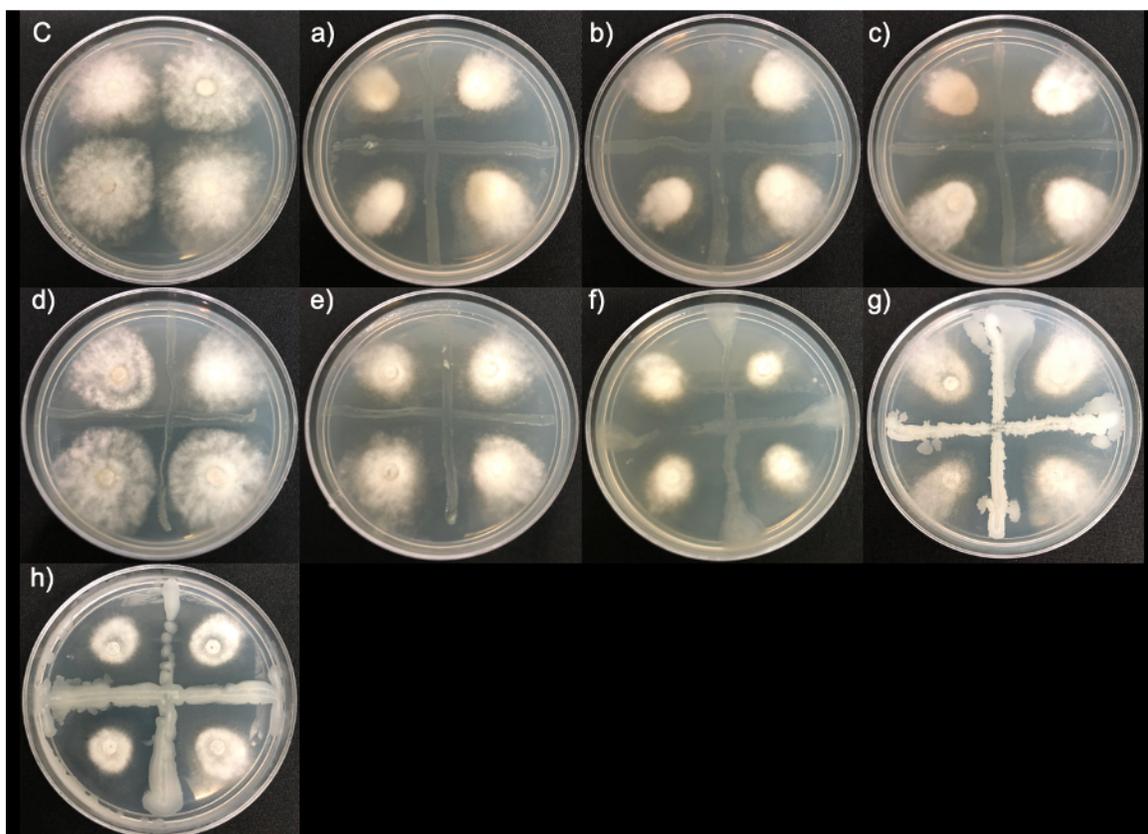


**Figura 4.** Crecimiento micelial de *Botrytis sp. 62c* con los tratamientos AF21-AF40 a través de ensayos de compuestos difusibles. La comparación de medias con respecto al control se realizó por la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Las barras de error representadas muestran el EE de la media ( $n = 8$ ).

**Tabla 5.** Inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis sp. 62c* expresada en porcentaje y milímetros. Los aislados indicados son aquellos que mostraron inhibición estadísticamente significativa del crecimiento micelial a través de una prueba de comparación de medias Tukey ( $\alpha=0.05$ ) con respecto al control. El cálculo se realizó como se mencionó en la sección 7.3.1.

Aislado bacteriano	Inhibición en porcentaje	Inhibición en mm (diámetro)
<i>Bacillus halotolerans</i> AF03	34.40 % $\pm$ 7.38	5.69 $\pm$ 1.28
<i>Bacillus halotolerans</i> AF04	36.74 % $\pm$ 6.08	6.06 $\pm$ 1.02
<i>Bacillus halotolerans</i> AF05	35.18 % $\pm$ 6.09	5.81 $\pm$ 1.07
<i>Bacillus halotolerans</i> AF08	17.39 % $\pm$ 11.53	2.88 $\pm$ 1.87
<i>Bacillus halotolerans</i> AF10	29.11 % $\pm$ 10.95	4.81 $\pm$ 1.89
<i>Bacillus velezensis</i> AF12	52.62 % $\pm$ 10.32	8.69 $\pm$ 1.79
<i>Bacillus halotolerans</i> AF23	40.21 % $\pm$ 6.52	7.18 $\pm$ 1.22
<i>Bacillus halotolerans</i> AF29	51.40 % $\pm$ 3.26	9.18 $\pm$ 0.70

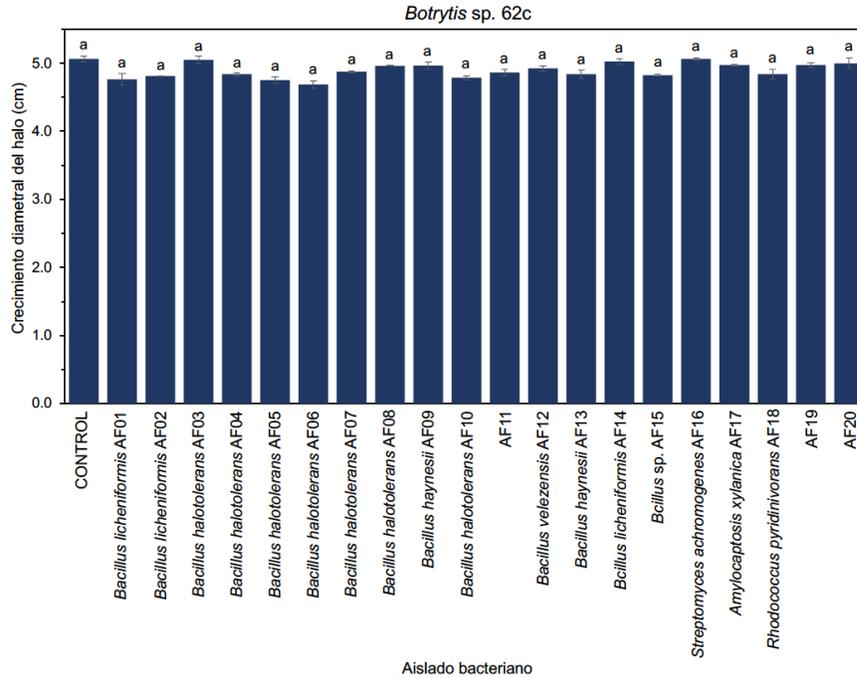
( $\pm$ ) desviación estándar calculada en Minitab versión 19.1.



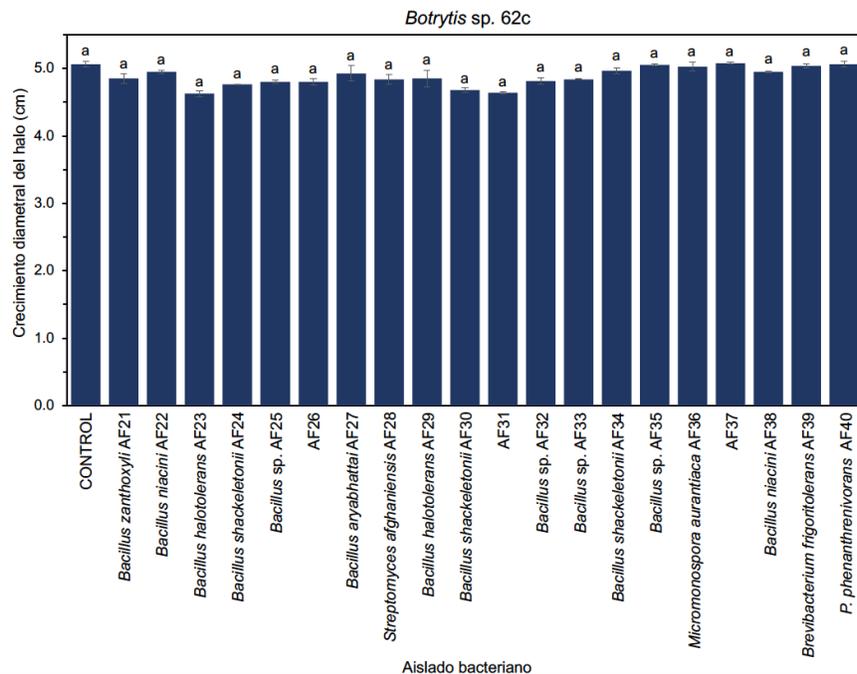
**Figura 5.** Ensayos de antagonismo por compuestos difusibles *in vitro* contra *Botrytis* sp. 62c Las imágenes corresponden al Control (C) y a las cepas que mostraron inhibición del crecimiento micelial estadísticamente significativa: a) *Bacillus halotolerans* AF03, b) *Bacillus halotolerans* AF04, c) *Bacillus halotolerans* AF05, d) *Bacillus halotolerans* AF08, e) *Bacillus halotolerans* AF10, f) *Bacillus velezensis* AF12, g) *Bacillus halotolerans* AF23 y h) *Bacillus halotolerans* AF29.

### 8.2.2 Antagonismo contra *Botrytis* sp. 62c por compuestos volátiles

En los ensayos por compuestos volátiles *in vitro*, no se observó disminución estadística significativa en el crecimiento micelial de *Botrytis* sp. 62c por ninguno de los aislados bacterianos. Esto se comprobó a través de un análisis estadístico de comparación de medias Tukey a un  $\alpha=0.05$  (**Figura 6-7**).



**Figura 6.** Crecimiento micelial de *Botrytis sp. 62c* con los tratamientos AF01-AF20 a través de ensayos de compuestos volátiles. La comparación de medias con respecto al control se realizó por la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Las barras de error representadas muestran el EE de la media ( $n = 2$ ).

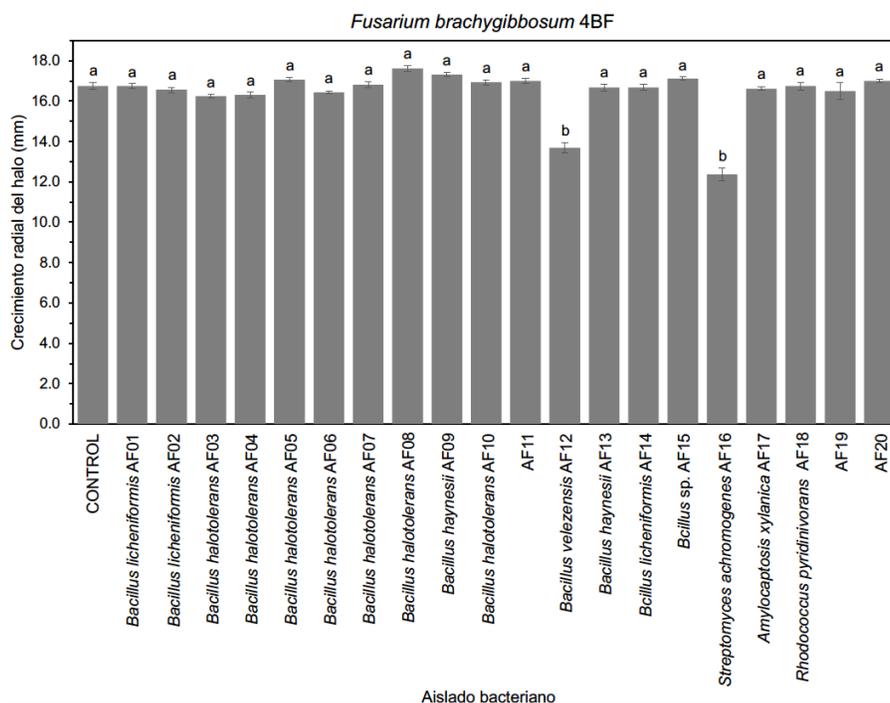


**Figura 7.** Crecimiento micelial de *Botrytis sp. 62c* con los tratamientos AF21-AF40 a través de ensayos de compuestos volátiles. La comparación de medias con respecto al control se realizó por la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Las barras de error representadas muestran el EE de la media ( $n = 2$ ).

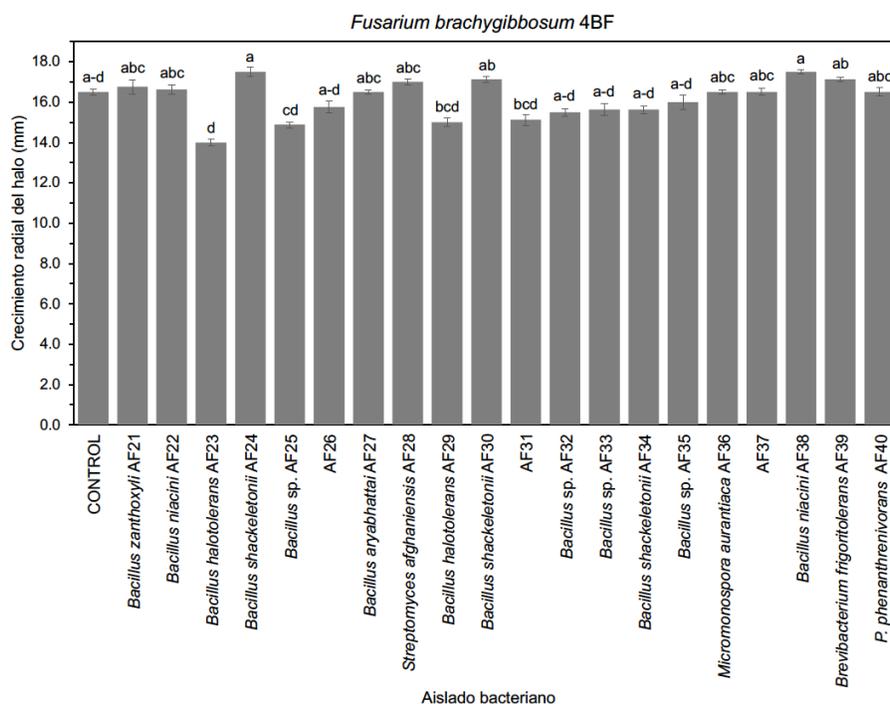
### 8.2.3 Antagonismo contra *F. brachygibbosum* 4BF por compuestos difusibles

En los ensayos de antagonismo por compuestos difusibles *in vitro* se observó una disminución en el crecimiento micelial de *F. brachygibbosum* 4BF por 2 aislados. Estos dos aislados mostraron diferencias significativas a través de un análisis estadístico de comparación de medias Tukey a un  $\alpha=0.05$  comparados con el crecimiento del hongo en la placa control (**Figura 8-9**). Las cepas con esta actividad son: *Bacillus velezensis* AF12 y *Streptomyces achromogenes* AF16.

La disminución en el crecimiento micelial de *F. brachygibbosum* 4BF de forma significativa por *B. velezensis* AF12 y *S. achromogenes* AF16 se muestra expresada en milímetros y % de inhibición (**Tabla 6**). Los ensayos de antagonismo se muestran en la **Figura 10**.



**Figura 8.** Crecimiento micelial de *F. brachygibbosum* 4BF con los tratamientos AF01-AF20 a través de ensayos de compuestos difusibles. La comparación de medias con respecto al control se realizó por la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Las barras de error representadas muestran el EE de la media (n = 8).

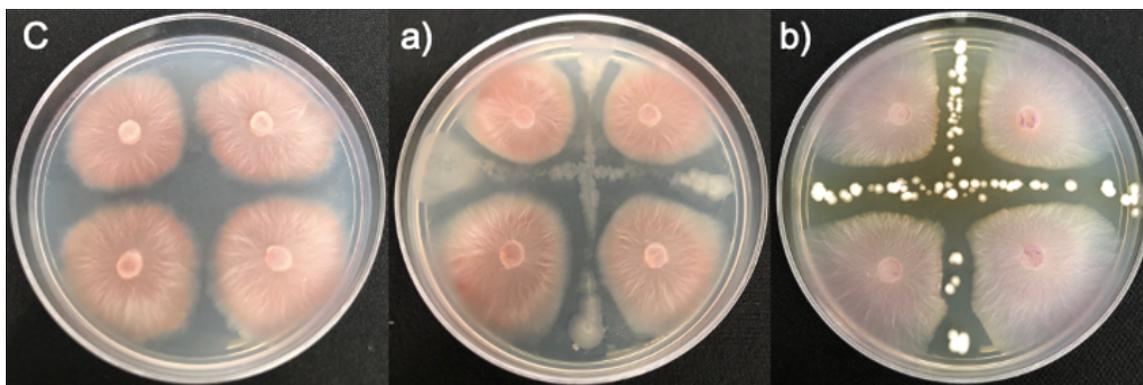


**Figura 9.** Crecimiento micelial de *F. brachygibbosum* 4BF con los tratamientos AF21-AF40 a través de ensayos de compuestos difusibles. La comparación de medias con respecto al control se realizó por la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Las barras de error representadas muestran el EE de la media ( $n = 8$ ).

**Tabla 6.** Inhibición del crecimiento micelial de *F. brachygibbosum* 4BF expresada en porcentaje y milímetros. Los aislados indicados son aquellos que mostraron inhibición estadísticamente significativa del crecimiento micelial a través de una prueba de comparación de medias Tukey ( $\alpha=0.05$ ) con respecto al control. El cálculo se realizó como se mencionó en la sección 7.3.1.

Aislado bacteriano	Inhibición en porcentaje	Inhibición en mm (diámetro)
<i>Bacillus velezensis</i> AF12	18.22 % $\pm$ 8.34	8.69 $\pm$ 1.79
<i>Streptomyces achromogenes</i> AF16	26.09 % $\pm$ 10.59	4.38 $\pm$ 1.77

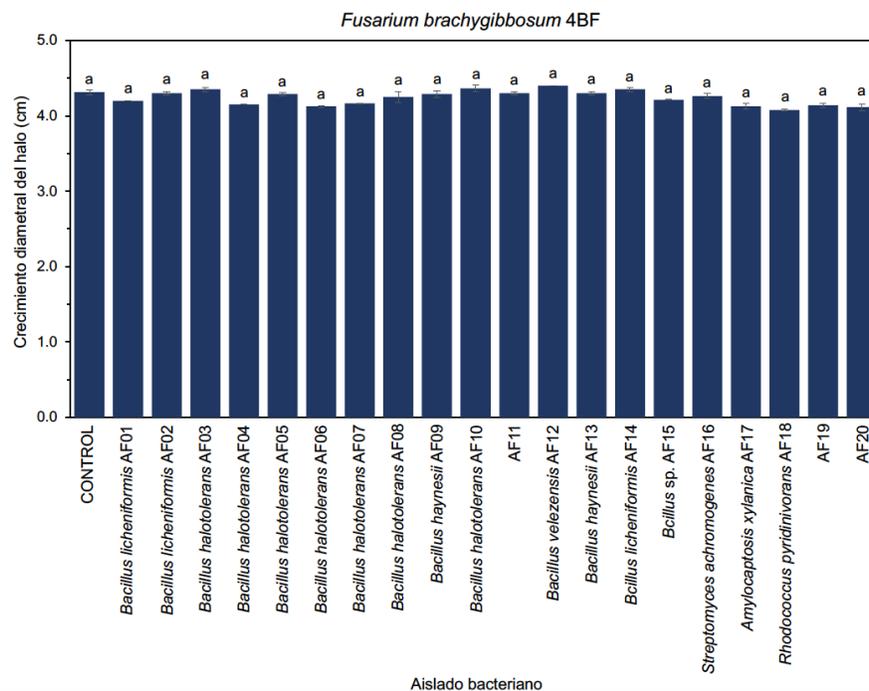
( $\pm$ ) desviación estándar.



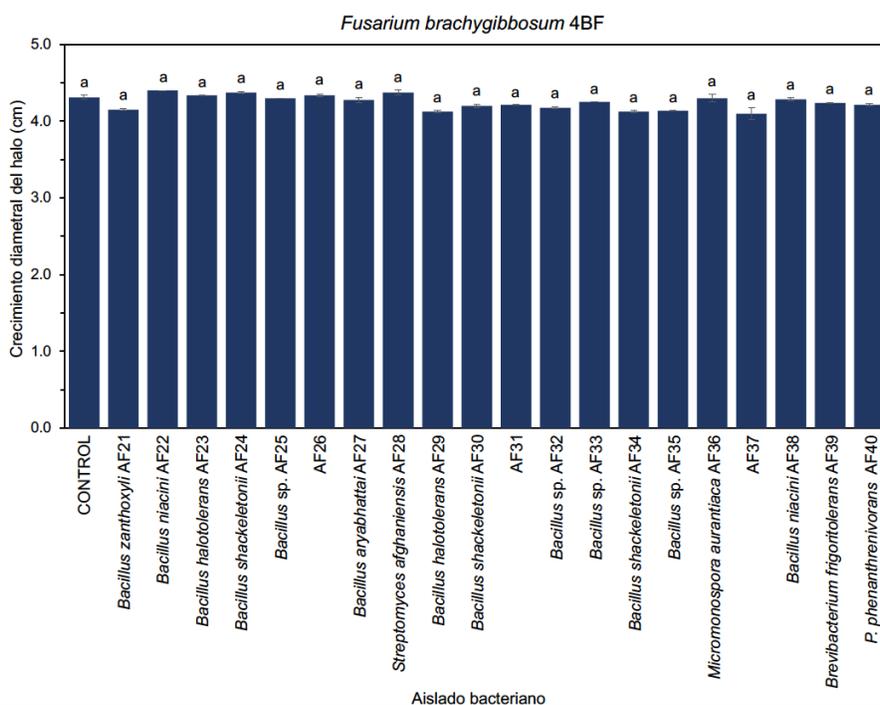
**Figura 10.** Ensayos de antagonismo por compuestos difusibles *in vitro* contra *F. brachygibbosum* 4BF. Las imágenes corresponden al Control (C) y a las cepas que mostraron inhibición del crecimiento micelial estadísticamente significativa: a) *Bacillus velezensis* AF12 y b) *Streptomyces achromogenes* AF16.

#### 8.2.4 Antagonismo contra *F. brachygibbosum* 4BF por compuestos volátiles

En los ensayos por compuestos volátiles *in vitro*, no se observó una disminución en el crecimiento micelial de *F. brachygibbosum* 4BF. por ningún aislado bacteriano. Esto se comprobó a través de un análisis estadístico de comparación de medias Tukey a un  $\alpha=0.05$  (Figura 11-12).



**Figura 11.** Crecimiento micelial de *F. brachygibbosum* 4BF con los tratamientos AF01-AF20 a través de ensayos de compuestos volátiles. La comparación de medias con respecto al control se realizó por la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Las barras de error representadas muestran el EE de la media ( $n = 2$ ).



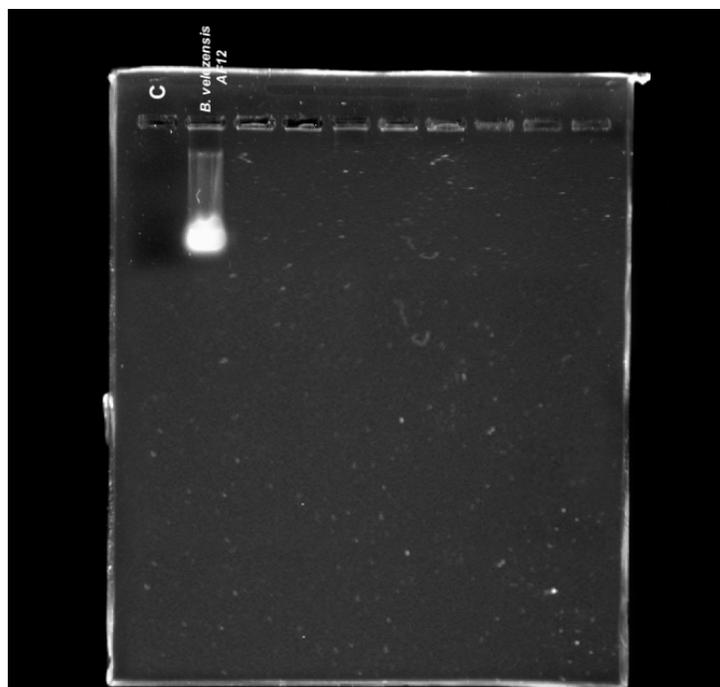
**Figura 12.** Crecimiento micelial de *F. brachygibbosum* 4BF con los tratamientos AF21-AF40 a través de ensayos de compuestos volátiles. La comparación de medias con respecto al control se realizó por la prueba de Tukey ( $\alpha=0.05$ ). Las barras de error representadas muestran el EE de la media (n = 2).

### 8.3 Caracterización *in silico* de genoma de *B. velezensis* AF12

*B. velezensis* AF12 que fue identificada a través de la comparación de su secuencia del gen ribosomal ARN 16S, fue seleccionada para su caracterización genómica debido a su actividad antagónica en los ensayos por compuestos difusibles *in vitro* hacia los patógenos evaluados.

#### 8.3.1 Secuenciación de genoma completo de *B. velezensis* AF12

La extracción de ADN genómico de AF12 fue exitosa, la integridad del ADN se pudo comprobar en la electroforesis en gel de agarosa al 1%, ya que se observó una banda (**Figura 13**). La cuantificación del ADN a través del microespectrofotómetro NanoDrop mostró una concentración de 90.95 ng/ $\mu$ L y una relación 260/280 de 1.75. Después de comprobar la óptima calidad del ADN, este fue enviado para su secuenciación.



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del ADN genómico de *B. velezensis* AF12. Primer carril corresponde a un control (C), segundo carril corresponde a AF12.

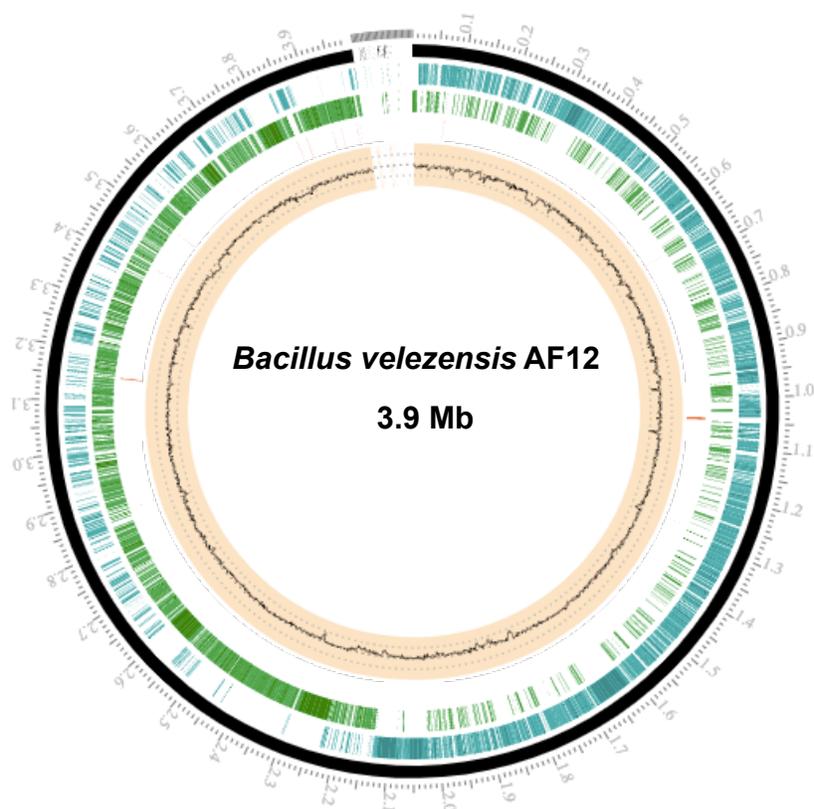
Los datos sin procesar que fueron obtenidos de la secuenciación, se cargaron al portal de datos Sequence Read Archive (SRA) del NCBI, en el cual, le fue asignada la clave de acceso SRR14068130.

Estos datos crudos fueron procesados a través de Trimmomatic versión 0.39 para eliminar bases secuenciadas de baja calidad, finalmente la calidad de las lecturas fue verificada a través de FastQC 0.11.9.

### **8.3.2 Ensamble de secuencias sin procesar y anotación de genoma**

El ensamblador SPAdes arrojó 130 contigs que conforman el genoma de AF12, el mapa genómico de esta cepa se muestra en la **Figura 14**.

La anotación del genoma realizada en los servidores PATRIC y RAST, de este último a través de la herramienta RASTtk, mostró que el genoma de AF12 contiene 3,997,902pb, con 4,086 genes codificadores de proteínas y 48 genes de ARN: 3 ARNr y 45 genes de ARNt (**Tabla 7**).



**Figura 14.** Mapa genómico de *Bacillus velezensis* AF12. En orden de exterior a interior se muestran los CDS de la cadena positiva (color azul), los CDS de la cadena negativa (color verde), los ARN de ambas cadenas (color rojo) y la línea negra con fondo color naranja corresponde al contenido de guanina-citosina (GC). Figura generada en PATRIC (<https://patricbrc.org/app/Annotation>).

**Tabla 7.** Características generales del genoma de *Bacillus velezensis* AF12.

Atributo	Valor
Tamaño del genoma (pb)	3,997,902
% GC	46.2
Numero de contigs	130
Número de subsistemas encontrados en RAST	330
N50 (bp)	195,863
L50	8
Tecnología de secuenciación	Illumina
Canalización de anotaciones	PATRIC y RAST
CDS (codificación)	4,086
Genes (ARN)	48
ARNr	3
ARNt	45



### 8.3.4 Índice general de relación del genoma (OGRI)

El análisis OGRI se basó en la comparación del genoma de AF12 con diferentes especies que presentan un porcentaje  $\geq 98.7$  en similitud en sus secuencias del gen ribosomal ARN 16S. Las herramientas empleadas son ANI y GGDC.

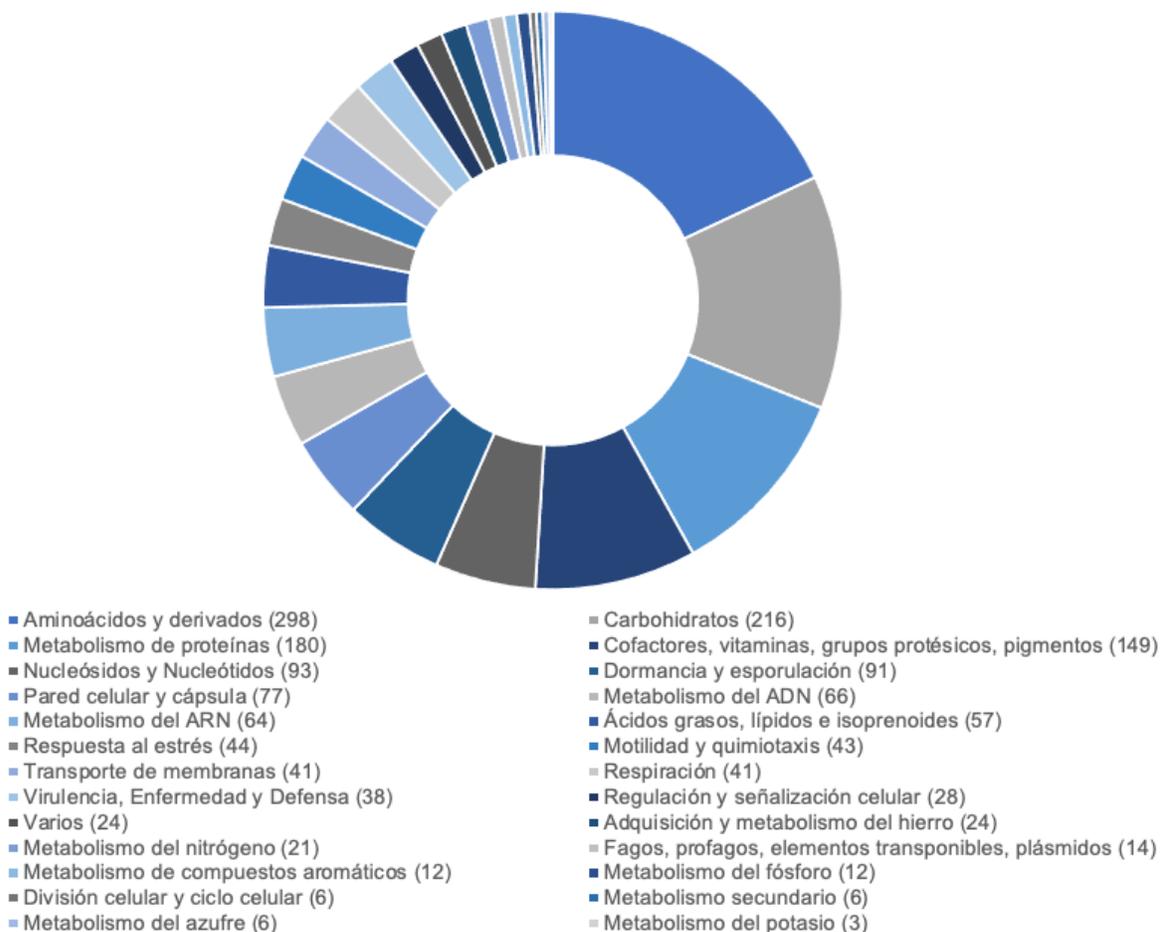
En la **Tabla 8** se puede observar los resultados de este análisis, donde destaca la especie *Bacillus velezensis* cepa CBMB205 con los porcentajes más altos en los parámetros evaluados. Basándonos en lo anterior, la identificación taxonómica de AF12 como *Bacillus velezensis* mencionada en las secciones 8.1.3 y 8.3.3 se ve reforzada.

**Tabla 8.** Análisis OGRI del genoma de *B. velezensis* AF12. El análisis OGRI se basó en la comparación del genoma de AF12 con genomas de especies bacterianas que presentaron similitud en la secuencia del gen ribosomal ARN 16S de  $\geq 98.7\%$ .

<b>Cepa bacteriana</b>	<b>16S <math>\geq 98.7\%</math></b>	<b>ANI <math>\geq 96\%</math></b>	<b>GGDC <math>\geq 70\%</math></b>
<i>Bacillus velezensis</i> CBMB205	99.68	98.15	98.54
<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 <sup>T</sup>	99.86	94.33	96.36
<i>Bacillus subtilis</i> NCIB 3610 <sup>T</sup>	99.59	77.01	0.18
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7 <sup>T</sup>	99.59	94.05	91.18
<i>Bacillus nakamurai</i> NRRL B-41091 <sup>T</sup>	99.59	86.38	74.41
<i>Bacillus atrophaeus</i> NRRL NRS 213 <sup>T</sup>	99.61	77.37	0.13
<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 <sup>T</sup>	99.39	77.35	0.22
<i>Bacillus halotolerans</i> FJAT-2398 <sup>T</sup>	99.42	77.53	0.37
<i>Bacillus cabrialesii</i> TE3 <sup>T</sup>	99.42	77.19	0.19
<i>Bacillus inaquosorum</i> KCTC 13429 <sup>T</sup>	99.39	77.51	0.24
<i>Bacillus stercoris</i> D7XPN1 <sup>T</sup>	99.55	77.16	0.22
<i>Bacillus mojavensis</i> KCTC 3706 <sup>T</sup>	99.72	77.23	0.24
<i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031 <sup>T</sup>	99.35	77.00	0.11
<i>Bacillus spizizenii</i> TU-B-10 <sup>T</sup>	99.29	77.25	0.25

### 8.3.5 Análisis funcional: Subsistemas y metabolitos secundarios

El 28% de las 4,086 secuencias de ADN codificantes (CDS) obtenidas en la anotación del servidor RAST se clasificaron en subsistemas o categorías funcionales. Se encontraron altos valores en los subsistemas de aminoácidos y derivados, así como de carbohidratos (**Figura 16**).



**Figura 16.** Subsistemas presentes en el genoma de *Bacillus velezensis* AF12.

Por otra parte, en el análisis antiSMASH donde se obtuvo la predicción de grupos de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios, se observó la presencia de grupos de genes propios del género *Bacillus* con 100% de similitud a los grupos conocidos de Bacilicina, Bacilibactina y Bacillaene. Así como también se encontró un grupo de genes con una similitud de 93% al grupo conocido de Fengicina, grupo conocido por tener actividad antifúngica, entre otros (**Tabla 9**).

**Tabla 9.** Análisis antiSMASH: Predicción de los metabolitos secundarios

<b>Grupo</b>	<b>Longitud</b>	<b>Grupo conocido más similar</b>	<b>Similitud</b>	<b>BGC-ID</b>
NRPS, other	83,078	Bacilisina	100%	BGC0001184
RiPP-like, NRPS	50,441	Bacilibactina	100%	BGC0000309
transAT-PKS, transAT-PKS-like	115,048	Difficidin	100%	BGC0000176
T3PKS	39,894	---	---	---
NRPS	40,621	Plipastatina	30%	BGC0000407
Terpene, NRPS, betalactone, transAT-PKS, RiPP-like	148,946	Fengicina	93%	BGC0001095
transAT-PKS-like, transAT-PKS, NRPS, T3PKS	108,909	Bacillaene	100%	BGC0001089
transAT-PKS	89,967	Macrolactina H	100%	BGC0000181
Terpene	20,741	---	---	---
PKS-like	41,245	Butirosina A / Butirosina B	7%	BGC0000693
NRPS	63,293	Surfactina	91%	BGC0000433
NRPS, transAT-PKS	70,100	Rizocticina A	22%	BGC0000926
NRPS	6,756	---	---	---

## 9. DISCUSIÓN

El ataque por fitopatógenos y las altas temperaturas derivadas del cambio climático, son dos ejemplos de estrés biótico y abiótico a los que las plantas se ven expuestas. El uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, puede ayudar a mitigar los factores estresantes de plantas. Para ello, en el presente trabajo de investigación se evaluó la actividad antifúngica de bacterias termotolerantes aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos, aunado a lo anterior, se secuenció y analizó el genoma de la cepa bacteriana AF12.

Se identificaron 18 de un total de 23 aislados bacterianos por medio de la secuenciación del gen ribosomal 16S. Durante las últimas décadas, el gen de ARNr 16S se ha aceptado generalmente como estándar para la identificación y clasificación de especies procariotas debido a su estructura, que contiene regiones conservadas y variables, y presencia en todos los organismos. Además, su longitud relativamente corta (aproximadamente 1500 pb) permite una secuenciación sencilla (Ibal *et al.*, 2019). Posterior a comparar las secuencias en la base de datos pública del NCBI, se encontró como dominante al género *Bacillus* al identificar a 13 aislados como miembros de este, mientras que 5 aislados pertenecieron a los géneros *Rhodococcus*, *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Brevibacterium* y *Pseudarthrobacter*.

Debido a su amplia capacidad fisiológica y capacidad para formar endosporas, las especies de *Bacillus* spp. son resistentes a condiciones ambientales adversas y se encuentran en una amplia gama de hábitats, incluido el suelo. *Bacillus* spp. representan las bacterias predominantes del suelo y la rizosfera, donde comprenden hasta el 95% de las poblaciones de bacterias Gram-positivas (Miljaković *et al.*, 2020).

Se han reportado una gran variedad de cepas termotolerantes del género *Bacillus* y algunas de ellas con características de PGPB. Tal es el caso de *Bacillus altitudinis*

KP-14 capaz de crecer hasta 50°C, además inhibe exitosamente el crecimiento de *Botrytis* sp. en condiciones *in vitro* en ensayos de antagonismo directo (Pranaw *et al.*, 2020). De igual forma en ensayos de antagonismo directo, *Bacillus subtilis* WXCDD105 aislada de la rizósfera de plantas de tomate, mostró actividad antifúngica hacia diversos hongos patógenos, con porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de 97.07% para *Botrytis* sp. y 77.45% para *Fusarium* spp. (Wang *et al.*, 2018), porcentajes ligeramente superiores a los obtenidos en la presente investigación.

En contraste con los resultados que se presentan, existen reportes de bacterias productoras de compuestos orgánicos volátiles que inhiben el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos, por ejemplo, *Bacillus amyloliquefaciens* L3 produce 2-nonanona y 2-heptanona, compuestos que tienen fuertes propiedades antifúngicas, para inhibir el crecimiento micelial de *Fusarium* sp. en una tasa de 19.01%, también la acetoína y el 2,3 - butanodiol promueven el crecimiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* (Wu *et al.*, 2019). Otro VOC, el dimetil disulfuro (DMDS) producido por *Pseudomonas stutzeri* E25 y *Stenotrophomonas maltophilia* CR71, inhibió el crecimiento micelial de *B. cinerea* en un 40 y 52%, respectivamente (Rojas-Solís, *et al.*, 2018).

*Bacillus subtilis* 30VD-1 aislada del suelo adyacente a *Brahea edulis* (Schwartz *et al.*, 2013) recientemente fue reportada como PGPB. En experimentos de confrontación directa, la cepa 30VD-1, inhibió el crecimiento de los hongos hasta en un 70%, aunado a esto, se realizó un análisis *in silico* y se encontraron genes codificantes a diversas enzimas líticas. Después de diversas pruebas, se encontró que esta cepa es capaz de producir quitinasas y pectinasas, por lo cual, la capacidad de antagonismo, puede atribuirse a la capacidad de producir enzimas líticas, aunque pueden haber más mecanismos involucrados. También en ensayos de antagonismo *in vitro* de placa dividida se reportó una disminución significativa en el crecimiento de *Fusarium* spp. en respuesta a compuestos orgánicos volátiles producidos por *B. subtilis* 30VD-1. Por último, en ensayos *in vivo*, se inocularon plántulas con *Fusarium* spp. y con *B. subtilis* 30VD-1. Después de 14 días, las

plantas tratadas con 30VD-1, mostraron un mejor desarrollo que aquellas inoculadas únicamente con el fitopatógeno, además, se produjo un aumento del 34.6% en el peso seco en comparación con las respectivas plantas de control infectadas (Khan *et al.*, 2018).

De manera similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, la cepa bacteriana *Streptomyces* sp. INECOL-8 mostró inhibición del crecimiento micelial hacia fitopatógenos *Fusarium* spp. mediante la emisión de compuestos antifúngicos difusibles. Esta cepa fue capaz de inhibir el crecimiento micelial en más del 20%. Por otra parte, en contraste a lo obtenido en esta investigación, INECOL-8 logró inhibir significativamente el crecimiento micelial de *Fusarium* spp. por la producción de compuestos orgánicos volátiles (Reverchon *et al.*, 2019).

De acuerdo a los resultados de los ensayos *in vitro*, es posible atribuir que las cepas bacterianas evaluadas presentan antagonismo hacia *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF a través de compuestos difusibles, ya sea por la producción de enzimas líticas o sustancias antifúngicas.

Se seleccionó a *Bacillus velezensis* AF12 para realizar una caracterización taxonómica más profunda, dado que presentó buen antagonismo hacia *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF con porcentajes de inhibición de 52.62% y 18.22%, respectivamente. Se construyó un árbol filogenético con la secuencia del gen ribosomal 16S y se utilizó a *Listeria innocua* Clp11262 como grupo externo (Flores *et al.*, 2020). AF12 exhibió una relación filogenética estrecha con *Bacillus velezensis* FZB42, resultados que refuerzan la previa identificación a través del gen ribosomal 16S.

Posteriormente, se secuenció el genoma completo de AF12 y se realizaron análisis *in silico* para la predicción de metabolitos secundarios involucrados en el antagonismo y promoción del crecimiento vegetal, así como el análisis de sistemas

funcionales. El genoma completo de *B. velezensis* AF12 consta de 3,997,902 pb y su contenido de G-C es de 46.2%, el ensamble del genoma generó un total de 130 contigs.

El análisis OGRI se puede utilizar para comprobar si una cepa pertenece a una especie conocida calculando la relación de diferentes parámetros basados en el genoma de la cepa conocida y la cepa a conocer. Algunos parámetros son la identidad de nucleótidos promedio (ANI) y la comparación genoma-genoma (GGDC), los cuales han sido de los más utilizados. Así bien, el análisis OGRI proporciona una forma simple, pero reproducible y objetiva que representa cuán similares son dos secuencias a nivel genoma. El límite de especies propuesto y generalmente aceptado para los valores de ANI y GGDC son 96 y 70%, respectivamente. Aunque se ha realizado un esfuerzo considerable para obtener datos del genoma para las cepas tipo, menos del 50% de las especies se encuentran publicadas. Por el contrario, una base de datos casi completa de secuencias del gen ribosomal 16S está disponible para las cepas tipo de especies procariotas. Por lo tanto, se puede utilizar una combinación de similitud 16S con un valor de corte de 98.7% y OGRI en un proceso sistemático para identificar y reconocer una especie (Chun *et al.*, 2018). En el análisis OGRI, la cepa *Bacillus velezensis* CBMB205 obtuvo los valores más altos en la similitud del gen ribosomal 16S, así como también en la identidad de nucleótidos promedio y en la comparación genoma-genoma, con porcentajes más altos de los límites propuestos: 99.68%, 98.15% y 98.54%, respectivamente. Por lo que al realizarse esta comparación, se fortalecen los análisis anteriores y se clasifica a la cepa AF12 como *Bacillus velezensis*.

Se ha propuesto que las fengicinas tienen una fuerte actividad antifúngica y las surfactinas muestran actividades bactericidas y fungicidas efectivas (Chen *et al.*, 2020-b). Dos cepas de *Bacillus velezensis* Y6 y F7 presentan fuerte actividad antagonista hacia los fitopatógenos *Ralstonia solanacearum* y *Fusarium oxysporum*

tanto en condiciones de laboratorio como de invernadero y se detectaron tres compuestos (iturina, surfactina y fengicina) como responsables de la actividad antimicrobiana de estos (Cao *et al.*, 2018), los dos últimos compuestos coinciden con los grupos de genes encontrados en la cepa de interés AF12. Una de las perspectivas de este trabajo es el análisis de estos compuestos para comprobar su actividad.

Además de la surfactina y fengicina, se encontraron otros grupos de genes en el análisis de predicción de metabolitos secundarios a través del servidor antiSMASH. Tal es el caso de bacillaene, que es un inhibidor de la síntesis de proteínas procarióticas (Patel *et al.*, 1995). También se encontraron genes relacionados a la síntesis de difficidina, bacilisina y bacilibactina, con porcentajes de similitud de 100% a los grupos conocidos. Se ha informado que la difficidina inhibe rápidamente la síntesis de proteínas y posiblemente también daña las membranas celulares (Zweerink & Edison, 1987). *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 suprime la actividad patógena de *Xanthomonas oryzae* que afecta a los cultivos de arroz. La difficidina y la bacilisina causaron una disminución de la expresión de genes implicados en la división celular, la síntesis de proteínas y pared celular de *X. oryzae* (Wu *et al.*, 2015). Por otra parte, la bacilibactina es un tipo de sideróforo producido por diversas especies de *Bacillus* (Arguelles-Arias *et al.*, 2009).

Con todo lo anterior, se sugiere que *Bacillus velezensis* AF12 presenta varios mecanismos PGPB, ya que es capaz de antagonizar a los fitopatógenos *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF, a través de los metabolitos detectados en el análisis antiSMASH y además, tiene la capacidad para producir sideróforos. Por el presente proyecto, podemos concluir que *Bacillus velezensis* AF12 podría ser un excelente agente bioinoculante, con capacidades estimulantes del crecimiento vegetal con acción directa e indirecta (biocontrol).

## 10. RESUMEN DE RESULTADOS

Se identificaron 8 cepas bacterianas pertenecientes al género *Bacillus* con actividad antagónica hacia *Botrytis* sp. 62c y 2 cepas hacia *F. brachygibbosum* 4BF, una perteneciente al género *Bacillus* y la otra a *Streptomyces*. Las cepas anteriormente mencionadas inhibieron el crecimiento micelial de los hongos de forma significativa en sus respectivos ensayos comparado con las placas controles a un  $\alpha=0.05$ .

La especie *Bacillus velezensis* AF12, mostró el mejor antagonismo en los ensayos contra *Botrytis* sp. 62c, así como fue la única cepa de *Bacillus* que mostró antagonismo contra *F. brachygibbosum* 4BF.

El genoma de *Bacillus velezensis* AF12 contiene diversos genes relacionados a los mecanismos propios de las PGPB, entre ellos se identificó *in silico*, la síntesis de compuestos antifúngicos. Por lo anterior, *Bacillus velezensis* AF12 es una cepa potencial como promotora del crecimiento vegetal.

## 11. CONCLUSIÓN

Diversas cepas termotolerantes de *Bacillus* y una de *Streptomyces* aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos presentan actividad antagónica *in vitro* contra los hongos fitopatógenos *Botrytis* sp. 62c y *F. brachygibbosum* 4BF, de entre ellas *Bacillus velezensis* AF12 mostró el potencial genómico para la síntesis de metabolitos antifúngicos

## 12. BIBLIOGRAFÍA

- Aabed, K., Almutairi, A., Al-shwuair, A., Al-otaibi, A., Alhazzani, A., y Al-shbi, A., Al-moegelth, H., Al-assaf, L., y Al-omri, S. (2021). Diversity and Distribution of Thermophiles and Thermotolerant Bacteria in the Soil Samples Obtained from Different Regions in Saudi Arabia. *Biosci Biotech Res Asia*, 18(1), 163-172. doi: 10.13005/bbra/2904
- Ahmad, M. S., Abdel-Fattah, M., Othman, A. M., y Saad, W. F. (2018). L-asparaginase production by a thermotolerant *Bacillus sp.* WF67: Nutritional and cultural parameters optimization. *Bioscience Research*, 15(2), 1390–1400.
- Alburqueque, D., y Gusqui, R. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control *in vitro* de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25(2), 489-498. doi: doi.org/10.22497/arnaldoa.252.25209
- Ali, H., Hameed, M., Abdulrahman, A., y Saood, H. (2020). First Report on *Fusarium brachygibbosum* Isolate FIR 16 ITS Isolated from Iraqi Wheat Plant. *Journal Of Ecological Engineering*, 21(3), 81-86. doi: 10.12911/22998993/118295
- Arguelles-Arias, A., Ongena, M., Halimi, B., Lara, Y., Brans, A., Joris, B., y Fickers, P. (2009). *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. *Microbial Cell Factories*, 8(63), 1-21. doi: 10.1186/1475-2859-8-63
- Bokhari, A., Essack, M., Lafi, F., Andres-Barrao, C., Jalal, R., Alamoudi, S., Razali, R., Alzubaidy, H., Shah, K. G., Siddique, S., Bajic, V. B., Hirt, H., y Saad, M. M. (2019). Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance. *Scientific Reports*, 9(18154), 1-13. doi: 10.1038/s41598-019-54685-y

- Braud, A., Jézéquel, K., Bazot, S., y Lebeau, T. (2009). Enhanced phytoextraction of an agricultural Cr- and Pb-contaminated soil by bioaugmentation with siderophore-producing bacteria. *Chemosphere*, 74(2), 280–286. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.09.013
- Bruno, L., Karthik, C., Ma, Y., Kadirvelu, K., Freitas, H., y Rajkumar, M. (2020). Amelioration of chromium and heat stresses in Sorghum bicolor by Cr<sup>6+</sup> reducing-thermotolerant plant growth promoting bacteria. *Chemosphere*, 244(125521). doi: 10.1016/j.chemosphere.2019.125521
- Caccamo, M., Gugliandolo, C., Zammuto, V., y Magazù, S. (2019). Thermal properties of an exopolysaccharide produced by a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* by ATR-FTIR spectroscopy. *International Journal Of Biological Macromolecules*, 145, 77-83. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.12.163
- Cao, Y., Pi, H., Chandrangsu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helman, D., y Cai, Y. (2018). Antagonism of Two Plant-Growth Promoting *Bacillus velezensis* Isolates Against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, 8(4360), 1-14. doi: 10.1038/s41598-018-22782-z
- Chávez, G., Mamani, M., Espinal, C., Tenorio, R., Crespo, C., y Alvarez, M. (2014). Potencial de cepas fúngicas aisladas en el área de Biotecnología Fúngica. Segunda parte: Biocontroladores fúngicos. *Revista CON-CIENCIA*, 2(1), 49-55.
- Chen, K., Li, G. J., Bressan, R. A., Song, C. P., Zhu, J. K., y Zhao, Y. (2020-a). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 25-54. doi: 10.1111/jipb.12899
- Chen, M., Wang, J., Liu, B., Zhu, Y., Xiao, R., Yang, W., Ge, C., y Chen, Z. (2020-b). Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737

and its lipopeptides. *BMC Microbiology*, 20(160), 1-12. doi: 10.1186/s12866-020-01851-2

Chen, Y., Xu, Y., Zhou, T., Akkaya, M., Wang, L., Li, S., y Li, X. (2020-c). Biocontrol of Fusarium wilt disease in strawberries using bioorganic fertilizer fortified with *Bacillus licheniformis* X-1 and *Bacillus methylotrophicus* Z-1. *3 Biotech*, 10(80), 1-14. doi: 10.1007/s13205-020-2060-6

Chun, J., Oren, A., Ventosa, A., Christensen, H., Arahal, D., da Costa, M., Rooney, A., Yi, H., Xu, X., de Meyer, S., y Trujillo, M. (2018). Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 68(1), 461-466. doi: 10.1099/ijsem.0.002516

Coffel, E., Horton, R., y de Sherbinin, A. (2017). Temperature and humidity based projections of a rapid rise in global heat stress exposure during the 21st century. *Environmental Research Letters*, 13(1), 014001. doi: 10.1088/1748-9326/aaa00e

Costa, O. Y., Raaijmakers, J. M., y Kuramae, E. E. (2018). Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Frontiers in microbiology*, 9, 1636. doi: 10.3389/fmicb.2018.01636

Cutuli, M., Gibello, A., Rodriguez-Bertos, A., Blanco, M., Villarroel, M., Giraldo, A., y Guarro, J. (2015). Skin and subcutaneous mycoses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) caused by *Fusarium oxysporum* in coinfection with *Aeromonas hydrophila*. *Medical Mycology Case Reports*, 9, 7-11. doi: 10.1016/j.mmcr.2015.06.002

Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rud, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. y Foster, G. D. (2012). The Top

10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430. doi: 10.1111/J.1364-3703.2011.00783.X

Desoignies, N., Schramme, F., Ongena, M., y Legrève, A. (2013). Systemic resistance induced by Bacillus lipopeptides in Beta vulgaris reduces infection by the rhizomania disease vector Polymyxa betae. *Molecular Plant Pathology*, 14(4), 416-421. doi: 10.1111/mpp.12008

Di Francesco, A., Ugolini, L., D'Aquino, S., Pagnotta, E., y Mari, M. (2017). Biocontrol of *Monilinia laxa* by *Aureobasidium pullulans* strains: insights on competition for nutrients and space. *International journal of food microbiology*, 248, 32-38. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.007

Egamberdieva, D., Wirth, S., Alqarawi, A., Abd\_Allah, E., y Hashem, A. (2017). Phytohormones and Beneficial Microbes: Essential Components for Plants to Balance Stress and Fitness. *Frontiers In Microbiology*, 8, 1-14. doi: 10.3389/fmicb.2017.02104

Esquivel-Cote, R., Gavilanes-Ruiz, M., Cruz-Ortega, R., y Huante, P. (2013). Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(3), 251-258.

Fernando, W., Nakkeeran, S., y Zhang, Y. (2005). Biosynthesis of Antibiotics by PGPR and its Relation in Biocontrol of Plant Diseases. *PGPR: Biocontrol And Biofertilization*, 67-109. doi: 10.1007/1-4020-4152-7\_3

Flores-Piña, A. 2021. Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades microbianas en suelo a través de un gradiente de temperatura. Tesis de maestría en proceso. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México.

- Flores, A., Diaz-Zamora, J., Orozco-Mosqueda, M., Chávez, A., de los Santos-Villalobos, S., Valencia-Cantero, E., y Santoyo, G. (2020). Bridging genomics and field research: draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* CR71, an endophytic bacterium that promotes plant growth and fruit yield in *Cucumis sativus* L. *3 Biotech*, 10(220), 1-7. doi: 10.1007/s13205-020-02209-1
- Guevara-Avenidaño, E., Bravo-Castillo, K., Monribot-Villanueva, J., Kiel-Martínez, A., Ramírez-Vázquez, M., Guerrero-Analco, J., y Reverchon, F. (2020). Diffusible and volatile organic compounds produced by avocado rhizobacteria exhibit antifungal effects against *Fusarium kuroshium*. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 51(3), 861-873. doi: 10.1007/s42770-020-00249-6
- Goswami, D., Thakker, J., y Dhandhukia, P. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1-19. doi: 10.1080/23311932.2015.1127500
- Gouda, S., Kerry, R., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H., y Patra, J. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206, 131-140. doi: 10.1016/j.micres.2017.08.016
- Han, X., Wang, Z., Chen, M., Zhang, X., Tang, C. Y., y Wu, Z. (2017). Acute Responses of Microorganisms from Membrane Bioreactors in the Presence of NaOCl: Protective Mechanisms of Extracellular Polymeric Substances. *Environmental Science & Technology*, 51(6), 3233–3241. doi:10.1021/acs.est.6b05475
- Hedreyda, C. T., y Monsalud, R. G. (2017). Species identification of thermo-tolerant *Bacillus* isolates using 16S rDNA, gyraseB gene (*gyrB*), and enzyme gene sequence analysis. *Philippine Journal of Science*, 146(4), 361-369.

- Huang, X., Wang, J., Ma, C., Ma, L., y Qiao, C. (2019). Diversity analysis of microbial communities and biodegradation performance of two halotolerant and thermotolerant *Bacillus licheniformis* strains in oilfield-produced wastewater. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 137, 30-41. doi: 10.1016/j.ibiod.2018.11.004
- Ibal, J., Pham, H., Park, C., y Shin, J. (2019). Information about variations in multiple copies of bacterial 16S rRNA genes may aid in species identification. *PLOS ONE*, 14(2), 1-15. doi: 10.1371/journal.pone.0212090
- Jangir, M., Pathak, R., Sharma, S., y Sharma, S. (2018). Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Biological Control*, 123, 60-70. doi: 10.1016/j.biocontrol.2018.04.018
- Jeyanthi, V., y Kanimozhi, S. (2018). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) - Prospective and Mechanisms: A Review. *Journal Of Pure And Applied Microbiology*, 12(2), 733-749. doi: 10.22207/jpam.12.2.34
- Kahsay, W. (2019). Effects of nitrogen and phosphorus on potatoes production in Ethiopia: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 5(1), 1-7. doi: 10.1080/23311932.2019.1572985
- Kang, S., Khan, A., Waqas, M., Asaf, S., Lee, K., Park, Y., Kim, A., Khan, M. A., You, Y. y Lee, I. (2019). Integrated phytohormone production by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus tequilensis* SSB07 induced thermotolerance in soybean. *Journal Of Plant Interactions*, 14(1), 416-423. doi: 10.1080/17429145.2019.1640294
- Khan, M., Asaf, S., Khan, A., Jan, R., Kang, S., Kim, K, y Lee, I. (2020). Thermotolerance effect of plant growth-promoting *Bacillus cereus* SA1 on soybean during heat stress. *BMC Microbiology*, 20(1), 1-14. doi: 10.1186/s12866-020-01822-7

- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T., Maymon, M., Humm, E., Nejat, N., Sanders, E., Kaplan, E., y Hirsch, A. M. (2018). Antifungal Activity of Bacillus Species Against Fusarium and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. *Frontiers In Microbiology*, 9, 1-12. doi: 10.3389/fmicb.2018.02363
- Kumar, A., Singh, V., Tripathi, V., Singh, P., y Singh, A. (2018). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Perspective in Agriculture Under Biotic and Abiotic Stress. *Crop Improvement Through Microbial Biotechnology*, 333-342. doi: 10.1016/b978-0-444-63987-5.00016-5
- Leghari, S. J., Wahocho, N. A., Laghari, G. M., HafeezLaghari, A., MustafaBhabhan, G., HussainTalpur, K., Bhutto, T. A., Wahocho, S. A. y Lashari, A. A. (2016). Role of nitrogen for plant growth and development: A review. *Advances in Environmental Biology*, 10(9), 209-219.
- Li, J., Fu, P., Zhu, Q., Mao, Y., y Yang, C. (2018). A lab-scale experiment on low-temperature coal oxidation in context of underground coal fires. *Applied Thermal Engineering*, 141, 333-338. doi: 10.1016/j.applthermaleng.2018.05.128
- Li, T., Zhang, J., Tang, J., Liu, Z., Li, Y., Chen, J., y Zou, L. (2020). Combined Use of Trichoderma atroviride CCTCCSBW0199 and Brassinolide to Control Botrytis cinerea Infection in Tomato. *Plant Disease*, 104(5), 1298-1304. doi: 10.1094/pdis-07-19-1568-re
- Mahuku, G. (2004). A simple extraction method suitable for PCR-based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 71-81.
- Makled, S., Hamdan, A., y El-Sayed, A. (2019). Effects of dietary supplementation of a marine thermotolerant bacterium, Bacillus paralicheniformis SO-1, on growth

performance and immune responses of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Nutrition*, 25(4), 817-827. doi: 10.1111/anu.12899

Manoj, S., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., y Rajkumar, M. (2019). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal Of Environmental Management*, 254(109779), 1-14. doi: 10.1016/j.jenvman.2019.109779

Meena, V., Maurya, B., Verma, J., Aeron, A., Kumar, A., Kim, K., y Bajpai, V. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering*, 81, 340-347. doi: 10.1016/j.ecoleng.2015.04.065

Mehmood, U., Inam-ul-Haq, M., Saeed, M., Altaf, A., Azam, F., y Hayat, S. (2018). A brief review on plant growth promoting Rhizobacteria (PGPR): a key role in plant growth promotion. *Plant Protection*, 2(2), 77-82.

Miljaković, D., Marinković, J., y Balešević-Tubić, S. (2020). The Significance of *Bacillus* spp. in Disease Suppression and Growth Promotion of Field and Vegetable Crops. *Microorganisms*, 8(137), 1-19. doi: 10.3390/microorganisms8071037

Morales-Cedeño, L. 2019. Identificación molecular de patógenos fungicos que afectan a las berries postcosecha y bacterias antagonistas para su biocontrol. Tesis de Maestría. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 70 pp.

Mustari, K., Larekeng, H., Yani, A., y Rahim, I. (2019). Exploration of bacteria associated with chili peppers' rhizosphere and their capacity to absorb and produce gibberellin hormone. *IOP Conference Series: Earth And Environmental Science*, 343(1), 1-8. doi: 10.1088/1755-1315/343/1/012059

- Nazir, N., Kamili, A. N., y Shah, D. (2018). Mechanism of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in enhancing plant growth-A review. *IJMTE*, 8(7), 709-721.
- Odoh, C. K. (2017). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR): A Bioprotectant bioinoculant for Sustainable Agrobiolgy. A Review. *International Journal Of Advanced Research In Biological Sciences (IJARBS)*, 4(5), 123-142. doi: 10.22192/ijarbs.2017.04.05.014
- Patel, P., Huang, S., Fisher, S., Pirnik, D., Aklonis, C., Dean, L., Fernandes, P., y Mayerl, F. (1995). Bacillaene, a Novel Inhibitor of Procaryotic Protein Synthesis Produced by *Bacillus subtilis*: Production, Taxonomy, Isolation, Physico-chemical Characterization and Biological Activity. *The Journal Of Antibiotics*, 48(9), 997-1003. doi: 10.7164/antibiotics.48.997
- Pranaw, K., Pidlisnyuk, V., Trögl, J., y Malinská, H. (2020). Bioprospecting of a Novel Plant Growth-Promoting Bacterium *Bacillus altitudinis* KP-14 for Enhancing *Miscanthus × giganteus* Growth in Metals Contaminated Soil. *Biology*, 9(9), 305. doi: 10.3390/biology9090305
- Ram, R. M., y Singh, H. B. (2018). *Bacillus sp.* BHU 08 isolated from stressed regions of Eastern Uttar Pradesh and Bundelkhand for promotion of plant growth in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 1305-1311.
- Rameshkumar N., Dhanapaul, S., Krishnan, M., y Kayalvizhi, N. (2017). *Bacillus tequilensis* a novel thermotolerant strain for effective bioremediation of melanoidin pigment in its natural environment. In: Prashanthi M., Sundaram, R., Jeyaseelan, A., y Kaliannan, T. (eds.). *Bioremediation and sustainable technologies for cleaner environment*. Springer. Cham, Alemania. pp. 329-345.

- Rehman, F., Kalsoom, M., Adnan, M., Toor, M., y Zulfiqar, A. (2020). Plant Growth Promoting Rhizobacteria and their Mechanisms Involved in Agricultural Crop Production: A Review. *Suntext Review Of Biotechnology*, 1(2), 1-7. doi: 10.51737/2766-5097.2020.010
- Reverchon, F., García-Quiroz, W., Guevara-Avenidaño, E., Solís-García, I., Ferrera-Rodríguez, O., y Lorea-Hernández, F. (2019). Antifungal potential of Lauraceae rhizobacteria from a tropical montane cloud forest against *Fusarium* spp. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 50(3), 583-592. doi: 10.1007/s42770-019-00094-2
- Rojas-Solís, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., Rocha-Granados, M., Macías-Rodríguez, L., y Santoyo, G. (2018). *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis And Agricultural Biotechnology*, 13, 46-52. doi: 10.1016/j.bcab.2017.11.007
- Safary, A., Mmoniri, R., Mirhashemi, S., Nikzad, H., y Khiavi, M. (2013). Phylogenetic and Biochemical Characterization of a New Halo-Thermotolerant, Biofilm-Forming Bacillus from Saline Lake of Iran. *Polish Journal Of Microbiology*, 62(4), 419-425. doi: 10.33073/pjm-2013-057
- Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiel, N., García-Sánchez, J., Pérez-y-Terrón, R., y Martínez-Contreras, R. (2018). Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiological Research*, 208, 85-98. doi: 10.1016/j.micres.2018.01.010
- Sánchez San Fulgencio, N., Suárez-Estrella, F., López, M., Jurado, M., López-González, J., y Moreno, J. (2018). Biotic aspects involved in the control of damping-off producing agents: The role of the thermotolerant microbiota isolated from composting of plant waste. *Biological Control*, 124, 82-91. doi: 10.1016/j.biocontrol.2018.04.015

- Santos, A., Núñez-Montero, K., Lamilla, C., Pavez, M., Quezada-Solís, D., y Barrientos, L. (2020). Antifungal activity screening of antarctic actinobacteria against phytopathogenic fungi. *Acta Biológica Colombiana*, 25(2), 353-358. doi: 10.15446/abc.v25n2.76405
- Santoyo, G., Sánchez-Yáñez, J. M., y de los Santos-Villalobos, S. (2019). *Methods for detecting biocontrol and plant growth-promoting traits in rhizobacteria*. In: Reinhardt, D. y A. Sharma. (eds.). *Methods in Rhizosphere Biology Research*. Springer. Singapur. pp. 133–149.
- Sayed, R. (2019). *Plant Growth Promoting Rhizobacteria for Sustainable Stress Management*. Singapore: Springer Singapore.
- Schwartz, A., Ortiz, I., Maymon, M., Herbold, C., Fujishige, N., Vijanderan, J., Vilella, W., Hanamoto, K., Diener, A., Sanders, E., DeMason, D., y Hirsch, A. (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. doi: 10.3390/agronomy3040595
- Seesom, W., Thongket, P., Yamamoto, T., Takenaka, S., Sakamoto, T., y Sukhumsirichart, W. (2017). Purification, characterization, and overexpression of an endo-1,4- $\beta$ -mannanase from thermotolerant *Bacillus* sp. SWU60. *World Journal Of Microbiology And Biotechnology*, 33(3), 1-12. doi: 10.1007/s11274-017-2224-7
- Shan, L., Cui, W., Zhang, D., Zhang, J., Ma, N., Bao, Y., Dai, X. F., y Guo, W. (2017). First Report of *Fusarium brachygibbosum* Causing Maize Stalk Rot in China. *Plant Disease*, 101(5), 837. doi: 10.1094/pdis-10-16-1465-pdn

- Sharifi, P. (2017). The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR), Salicylic Acid and Drought Stress on Growth Indices, the Chlorophyll and Essential Oil of Hyssop (*Hyssopus Officinalis*). *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 14(3), 1033-1042. doi: 10.13005/bbra/2538
- Shuping, D., y Eloff, J. (2017). The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: a review. *African Journal Of Traditional, Complementary And Alternative Medicines*, 14(4), 120-127. doi: 10.21010/ajtcam.v14i4.14
- Singh, I. (2018). Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) and their various mechanisms for plant growth enhancement in stressful conditions: a review. *European Journal of Biological Research*, 8(4), 191-213.
- Son, S., Kim, H., Choi, G., Lim, H., Jang, K., Lee, S., Lee, S., Sung, N. y Kim, J. (2008). Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans*. *Journal Of Applied Microbiology*, 104(3), 692-698. doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03581.x
- Song, Z., y Kuenzer, C. (2014). Coal fires in China over the last decade: A comprehensive review. *International Journal Of Coal Geology*, 133, 72-99. doi: 10.1016/j.coal.2014.09.004
- Song, Z., Wu, D., Jiang, J., y Pan, X. (2019). Thermo-solutal buoyancy driven air flow through thermally decomposed thin porous media in a U-shaped channel: Towards understanding persistent underground coal fires. *Applied Thermal Engineering*, 159(113948), 1-13. doi: 10.1016/j.applthermaleng.2019.113948
- Srivastava, D. A., Harris, R., Breuer, G., y Levy, M. (2021). Secretion-Based Modes of Action of Biocontrol Agents with a Focus on *Pseudozyma aphidis*. *Plants*, 10(2), 210. doi: 10.3390/plants10020210

- Swain, M., Laxminarayana, K., y Ray, R. (2012). Phosphorus Solubilization by Thermotolerant *Bacillus subtilis* Isolated from Cow Dung Microflora. *Agricultural Research*, 1(3), 273-279. doi: 10.1007/s40003-012-0022-x
- Tamariz-Angeles, C., Lázaro-Palomino, J., Olivera-Gonzales, P., Castañeda-Barreto, A., y Villena, G. (2020). Isolation of thermotolerant *Bacillus subtilis* DCH4 from Chancos hot spring (Carhuaz, Peru) with potential to degrade lignocellulosic agriculture wastes. *Revista Peruana De Biología*, 27(1), 067-078. doi: 10.15381/rpb.v27i1.17582
- Terrones-Salgado, J., Nieto-Angel, D., Nava-Díaz, C., Téliz-Ortiz, D., García-Velasco, R., Vallejo-Pérez, M. R., y Sánchez-García, P. (2019). *Botrytis cinerea* causing gray mold in blackberry fruit in Mexico. *Mexican Journal Of Phytopathology*, 37(3), 365-382.
- Tewari, S., y Arora, N. K. (2018). Role of salicylic acid from *Pseudomonas aeruginosa* PF23EPS+ in growth promotion of sunflower in saline soils infested with phytopathogen *Macrophomina phaseolina*. *Environmental Sustainability*, 1(1), 49–59. doi: 10.1007/s42398-018-0002-6
- Vágvölgyi, C., Sajben-Nagy, E., Bóka, B., Vörös, M., Berki, A., Palágyi, A., Krisch, J., Škrbić, B., Đurišić-Mladenović, N., y Manczinger, L. (2012). Isolation and Characterization of Antagonistic *Bacillus* Strains Capable to Degrade Ethylenethiourea. *Current Microbiology*, 66(3), 243-250. doi: 10.1007/s00284-012-0263-8
- Velasco-Jiménez, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., Clarenc Aarland, R., y Rodríguez-Sahagún, A. (2020). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *REVISTA TERRA LATINOAMERICANA*, 38(2), 333-345. doi: 10.28940/terra.v38i2.470

- Verma, P.P., Shelake, R.M., Das, S., Sharma, P., y Kim, JY. (2019) Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Fungi (PGPF): Potential Biological Control Agents of Diseases and Pests. In: Singh D., Gupta V., Prabha R. (eds). *Microbial Interventions In Agriculture And Environment*, 281-311. doi: 10.1007/978-981-13-8391-5\_11
- Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R., Pandey, M., y Sharma, S. (2017). Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in plant science*, 8, 161. oi: 10.3389/fpls.2017.00161
- Wang, H., Shi, Y., Wang, D., Yao, Z., Wang, Y., Liu, J., Zhang, S., y Wang, A. (2018). A Biocontrol Strain of *Bacillus subtilis* WXCDD105 Used to Control Tomato *Botrytis cinerea* and *Cladosporium fulvum* Cooke and Promote the Growth of Seedlings. *International Journal Of Molecular Sciences*, 19(1371), 1-17. doi: 10.3390/ijms19051371
- Wang, J., Zhang, Y., Jin, J., Li, Q., Zhao, C., Nan, W., Wang, X., Ma R., y Bi, Y. (2017). An intact cytokinin-signaling pathway is required for *Bacillus* sp. LZR216-promoted plant growth and root system architecture alteration in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Growth Regulation*, 84(3), 507-518. doi: 10.1007/s10725-017-0357-1
- Wu, L., Wu, H., Chen, L., Yu, X., Borriss, R., y Gao, X. (2015). Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports*, 5(12975), 1-9. doi: 10.1038/srep12975
- Wu, Y., Zhou, J., Li, C., y Ma, Y. (2019). Antifungal and plant growth promotion activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microbiologyopen*, 8(813), 1-14. doi: 10.1002/mbo3.813

Zouari, I., Masmoudi, F., Medhioub, K., Tounsi, S., y Trigui, M. (2020). Biocontrol and plant growth-promoting potentiality of bacteria isolated from compost extract. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 113(12), 2107-2122. doi: 10.1007/s10482-020-01481-8

Zweerink, M., y Edison, A. (1987). Difficidin and oxydifficidin: Novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. III. Mode of action of difficidin. *The Journal Of Antibiotics*, 40(12), 1692-1697. doi: 10.7164/antibiotics.40.1692