



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LOS COMPONENTES DE MEMBRANA Y LA ACCIÓN ANTIFÚNGICA EN CEPAS DE *Bacillus* spp.

TESIS

**Que como requisito parcial para obtener
el título profesional de**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA
EXPERIMENTAL**

Presenta

L. Bt. Salvador Chávez Avila

Director de tesis:
D.C. Gustavo Santoyo Pizano

Co-director de tesis:
D.C. Christian Sohlenkamp
(CCG-UNAM)

Morelia, Michoacán, febrero de 2024



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS
UMSNH

DEDICATORIA

A mi familia: padres y hermanas.

A Fernanda: mi amor incondicional.

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.

Al D.C. Christian Sohlenkamp, por la oportunidad de conocer el Centro de Ciencias Genómicas y las facilidades para realizar mi estancia, así como el tiempo dedicado en revisión, sugerencias y correcciones en el presente trabajo.

A los D.C. Eduardo Valencia Cantero, D.C. Ernesto García Pineda y al D.C. Pedro Damián Loeza Lara por el tiempo dedicado en la 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 amor incondicional y soporte durante este par de años, por los meses de trabajo juntos. Me motivaste día a día a alcanzar la mejor versión de mí. A tu lado, la maestría fue una experiencia inolvidable. 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 CONAHCYT por financiar mis estudios de maestría.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Cambio climático y su efecto en los cultivos.....	4
2.2 Pronóstico de la población mundial en las siguientes décadas y estrategias para asegurar la seguridad alimentaria	6
2.3 Características biológicas de los <i>Bacillus</i>	9
2.4 Biodisponibilidad de nutrientes esenciales para plantas por <i>Bacillus</i> spp.	10
2.5 Síntesis de fitohormonas por <i>Bacillus</i> spp.	13
2.6 Infecciones fúngicas en los cultivos agrícolas	14
2.6.1 <i>Botrytis cinerea</i>	15
2.6.2 <i>Fusarium</i> sp.....	17
2.6.3 <i>Geotrichum candidum</i>	18
2.6.4 <i>Botryosphaeria</i> sp.	20
2.7. Problemática en la aplicación de fungicidas químicos en el control de fitopatógenos	22
2.8 <i>Bacillus</i> como agente de biocontrol de hongos fitopatógenos.....	24
2.8.1 Lipopéptidos bacterianos	25
2.8.1.1 Importancia de los lipopeptidos en la motilidad y colonización.....	28
2.8.2 Compuestos orgánicos volátiles.....	29
2.8.3 Enzimas líticas	29
2.8.4 Competencia por espacio y nutrientes	30
2.9 <i>Bacillus</i> con capacidad de crecer en temperaturas dentro del rango termófilo	30
2.9.1 Cambios en la composición de lípidos de membrana.....	31

2.10 Incendios subterráneos como fuente de bacterias termotolerantes	33
2.11 Aislados bacterianos provenientes de muestras de suelo de incendios subterráneos con actividad antagónica hacia hongos fitopatógenos	34
3. JUSTIFICACIÓN	37
4. HIPÓTESIS	38
5. OBJETIVOS	39
5.1 Objetivo general	39
5.2 Objetivos específicos	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1 Material biológico	40
6.1.1 Aislados bacterianos	40
6.1.2 Cepas fúngicas	40
6.2 Obtención de los nuevos aislados de suelos afectados por incendios subterráneos	40
6.3 Evaluación de termotolerancia	40
6.4 Identificación taxonómica por secuenciación del gen ARNr 16S de los nuevos aislados	41
6.4.1 Extracción de ADN genómico	41
6.4.2 Amplificación por PCR del gen ribosomal ARN 16S	41
6.4.3 Secuenciación e identificación taxonómica de los amplicones del gen ARN 16S	42
6.5 Filogenia de las 49 <i>Bacillus</i> spp.	42

6.6	Escrutinio de la actividad antagónica de los nuevos aislados de suelos afectados por incendios subterráneos hacia hongos fitopatógenos	42
6.7	Cinéticas de crecimiento de las <i>Bacillus</i> spp. seleccionadas	43
6.8	Evaluación de termosensibilidad de los fitopatógenos fúngicos.....	43
6.9	Evaluación de la actividad antagónica a 28, 32, 35 y 37°C	44
6.10	Obtención del perfil de lípidos de membrana	44
6.10.1	Preparación de células bacterianas para extracción de lípidos	44
6.10.2	Extracción de lípidos de membrana, TLC y cuantificación.....	44
6.11	Análisis estadísticos.....	45
7.	RESULTADOS.....	46
7.1	Identificación de nuevas cepas aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos	46
7.2	Evaluación de la termotolerancia de los aislados de <i>Bacillus</i> y su filogenia....	47
7.3.	Escrutinio de la actividad antagónica de las 49 <i>Bacillus</i> spp.....	50
7.4	Evaluación de termosensibilidad de los fitopatógenos fúngicos.....	53
7.5.	Evaluación de la actividad antagónica de las cepas seleccionadas hacia hongos fitopatógenos a diferentes temperaturas.....	54
7.6.	Cinéticas de crecimiento de la población termosensible y termotolerante a diferentes temperaturas	58
7.7.	Perfil lipídico membranal de las cepas de <i>Bacillus</i> a diferentes temperaturas	60
8.	DISCUSIÓN	63
9.	RESUMEN DE RESULTADOS.....	81

10. CONCLUSIÓN	82
11. PERSPECTIVAS	83
12. BIBLIOGRAFÍA	84
13. MATERIAL SUPLEMENTARIO	121

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Aislados termosensibles cultivados en placas de AN. Las resiembras de los aislados fueron incubadas a 30 y 50 °C	48
Figura 2. Aislados termotolerantes cultivados en placas de AN	48
Figura 3. Árbol filogenético del gen ribosomal ARN 16S de los 49 aislados de <i>Bacillus</i>	49
Figura 4. Aislados de <i>Bacillus</i> con actividad antagónica sobre hongos fitopatógenos	51
Figura 5. Evaluación de la actividad antagónica de los 8 aislados seleccionados sobre <i>B. rhodina</i>	52
Figura 6. Termosensibilidad de agentes fúngicos.....	53
Figura 7. Antagonismo contra <i>F. brachygibbosum</i> a diferentes temperaturas	55
Figura 8. Antagonismo contra <i>G. candidum</i> a diferentes temperaturas.....	56
Figura 9. Antagonismo contra <i>B. rhodina</i> a diferentes temperaturas.....	56
Figura 10. Antagonismo hacia <i>B. cinerea</i> a diferentes temperaturas	57
Figura 11. Cinéticas de crecimiento de las dos poblaciones de <i>Bacillus</i> spp. en diferentes temperaturas	59
Figura 12. Crecimiento de las <i>Bacillus</i> spp. representado a nivel de población ...	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Reportes de genes antimicrobianos de cepas de <i>Bacillus</i> con actividad de biocontrol	27
Tabla 2. Actividad antagónica de aislados de <i>Bacillus</i> provenientes de suelos afectados por incendios subterráneos hacia hongos fitopatógenos	35
Tabla 3. Identificación de los nuevos aislados provenientes de muestras de suelos afectados por incendios subterráneos	47
Tabla 4. Perfil lipídico membranal de los aislados termosensibles	60
Tabla 5. Perfil lipídico membranal de los aislados termotolerantes	61
Tabla 1S. Análisis BLAST de los aislados no identificados a nivel especie	121

RESUMEN

El aumento en la temperatura a nivel global derivado de las actividades antropogénicas afecta negativamente a los cultivos agrícolas; ya que altera la fisiología de las plantas y disminuye significativamente la producción de alimentos, además, aumenta la susceptibilidad de los cultivos a plagas y enfermedades fúngicas. La aplicación de fungicidas químicos es la técnica más efectiva para combatir estas infecciones, sin embargo, contaminan el medio ambiente y producen resistencia en los patógenos. Una potencial alternativa al uso de fungicidas químicos es la aplicación de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB por sus siglas en inglés), especialmente aquellas termotolerantes. En el presente trabajo 8 aislados bacterianos fueron identificados por la secuenciación del gen ARNr 16S como cepas del género *Bacillus*. Se realizaron cinéticas de crecimiento a 28, 37, 40 y 50 °C para determinar su termotolerancia. Se encontraron 4 cepas termosensibles: *B. aryabhattai* AF27, *Bacillus* sp. AF53, *Bacillus* sp. AF56 y *Bacillus* sp. AF62; y 4 termotolerantes: *B. velezensis* AF12, *B. halotolerans* AF23, *B. amyloliquefaciens* AF42 y *B. velezensis* AF52. El crecimiento de algunas cepas en la población termosensible y termotolerante se reportó a una temperatura máxima de 32 °C y 40 °C, respectivamente. Un análisis filogenético de las bacterias, basado en el gen ARNr 16S, reveló agrupaciones de clados que se correlacionan con la temperatura de crecimiento. También se evaluó el antagonismo de las 8 cepas hacia los hongos fitopatógenos: *Botrytis cinerea*, *Fusarium brachygibbosum*, *Geotrichum candidum* y *Botryosphaeria rhodina* a diferentes temperaturas y se encontró que la población termotolerante presenta una mayor actividad antagónica hacia los 4 hongos evaluados. Finalmente se observó que las 8 cepas exhiben modificaciones en sus lípidos de membrana, especialmente en la cardiolipina, cuya concentración aumentó conforme incrementó la temperatura, sugiriendo un posible mecanismo de tolerancia al estrés térmico. Estos hallazgos sugieren que las especies termotolerantes de *Bacillus* podrían ofrecer una alternativa para mitigar los efectos del aumento de la temperatura, como las infecciones fúngicas en cultivos.

Palabras clave: Calentamiento global, enfermedades fúngicas, PGPB termotolerantes.

ABSTRACT

The increase in global temperature resulting from anthropogenic activities adversely affects agricultural crops; as it alters plant physiology and significantly reduces food production, additionally, it increases crop susceptibility to pests and fungal diseases. The application of chemical fungicides is the most effective technique for combating these infections; however, they pollute the environment and induce resistance in pathogens. A potential alternative to the use of chemical fungicides is the application of plant growth-promoting bacteria (PGPB), especially those that are thermotolerant. In the present study, 8 bacterial isolates were identified through 16S rRNA gene sequencing as strains belonging to the *Bacillus* genus. Growth kinetics were conducted at 28, 37, 40, and 50 °C to determine their thermotolerance. 4 thermosensitive strains were found: *B. aryabhatai* AF27, *Bacillus* sp. AF53, *Bacillus* sp. AF56, and *Bacillus* sp. AF62; and 4 thermotolerant strains: *B. velezensis* AF12, *B. halotolerans* AF23, *B. amyloliquefaciens* AF42, and *B. velezensis* AF52. The growth of some strains in the thermosensitive and thermotolerant populations was reported at a maximum temperature of 32 °C and 40 °C, respectively. A phylogenetic analysis of the bacteria, based on the 16S rRNA gene, revealed clusters that correlate with the growth temperature. The antagonism of the 8 strains against the phytopathogenic fungi *Botrytis cinerea*, *Fusarium brachygibbosum*, *Geotrichum candidum*, and *Botryosphaeria rhodina* was also evaluated at different temperatures, and it was found that the thermotolerant population exhibits higher antagonistic activity against all 4 fungi evaluated. Finally, it was observed that the 8 strains exhibit modifications in their membrane lipids, especially in cardiolipin, whose concentration increased as the temperature rose, suggesting a potential mechanism for thermal stress tolerance. These findings suggest that thermotolerant *Bacillus* species could offer an alternative to mitigate the effects of temperature increase, such as fungal infections in crops.

Keywords: Global warming, fungal diseases, thermotolerant PGPB.

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas están expuestas a diferentes tipos de estrés, que se pueden categorizar como biótico y abiótico y por su naturaleza de organismos sésiles, no pueden huir de éstos. El estrés biótico incluye el ataque de patógenos que pueden ser causados por insectos, nematodos, bacterias y hongos; mientras que el estrés abiótico incluye alta salinidad, sequías, inundaciones, metales pesados, así como altas y bajas temperaturas (Chen et al., 2022). Entre estos últimos, el estrés por calor tiene uno de los efectos más perjudiciales, ya que las temperaturas por encima del valor umbral óptimo (15 – 24°C) tienen un impacto negativo en la fisiología de las plantas, desde daños leves hasta permanentes (Shaffique et al., 2022).

El aumento de la temperatura es una consecuencia directa del cambio climático. De acuerdo con proyecciones realizadas para el próximo siglo, se prevé que la temperatura global continúe en aumento (Coffel et al., 2018). Un incremento de 3 a 4°C en la temperatura puede provocar una disminución de la productividad de los cultivos agrícolas de hasta un 35%, debido a que las plantas se exponen a estrés por calor (Khan et al., 2020b).

Los diferentes tipos de estrés coexisten de manera frecuente y causan un efecto devastador en los cultivos, por ejemplo, las altas temperaturas influyen en la propagación de patógenos en las plantas, tal es el caso de los hongos fitopatógenos (Bokhari et al., 2019). El ataque constante de fitopatógenos fúngicos reduce el rendimiento y la calidad de los cultivos, causando pérdidas en diferentes etapas del ciclo agrícola (Morales-Cedeño, et al., 2021).

Los géneros de hongos fitopatógenos *Botrytis* y *Fusarium* forman parte de los principales 10 agentes fúngicos de importancia mundial por la severidad de los daños que producen en los cultivos agrícolas (Dean et al., 2012). *Botrytis cinerea* afecta a más de 200 especies de plantas en campo y frutos en etapa posterior a la cosecha, lo que provoca pérdidas masivas durante el crecimiento, transporte, almacenamiento y comercialización (Cui et al., 2020). Por su parte, la infección por

Fusarium brachygibbosum altera el rendimiento de los cultivos, ya que puede interferir con la absorción y translocación de agua y nutrientes. En infecciones severas, la marchitez vascular causada por *F. brachygibbosum* puede provocar la muerte prematura de la planta. La sintomatología principal se basa en la presencia de zonas necróticas de color marrón en el sistema vascular de la planta (Shan et al., 2017). Por otra parte, *Geotrichum candidum* es el agente causal de la pudrición ácida ocasionada durante el almacenamiento en postcosecha de cítricos, que son los más afectados (Singh & Deverall, 1984); también provoca el ablandamiento en diversos frutos de interés comercial (Robledo-Leal et al., 2016). Finalmente, *Botryosphaeria rhodina* es un patógeno que infecta, principalmente, a especies leñosas, los síntomas de la enfermedad que ocasiona se puede observar cómo canchales, tizones en los brotes, manchas en las hojas, pudriciones de frutas y semillas, además de comprometer procesos fisiológicos como la traslocación de agua y nutrientes (Yan et al., 2018).

La técnica más efectiva, hasta la fecha, para hacer frente a las infecciones por fitopatógenos fúngicos es la aplicación de fungicidas químicos (Alburquerque & Gusqui, 2018). Sin embargo, el uso de fungicidas produce contaminación ambiental y alta toxicidad residual, además de la generación de cepas resistentes a estos compuestos (Khan et al., 2018).

La temperatura también tiene repercusiones en las células bacterianas, principalmente debido a la desnaturalización de biomoléculas, como los ácidos nucleicos (ARN y ADN), así como ribosomas y proteínas, lo que podría ocasionar la inactivación de enzimas importantes en el metabolismo bacteriano. Cuando la temperatura supera el umbral de crecimiento bacteriano, el resultado es la muerte celular (Russell, 2003). El umbral de temperatura permite realizar una clasificación bacteriana, aquellos microorganismos que crecen entre 20 y 45 °C se les denomina mesófilos, mientras que los que pueden crecer a menores y mayores temperaturas de este rango, se les conoce como extremófilos, los cuales a su vez se denominan

psicrófilos (<20 °C), termófilos (45-80 °C) e hipertermófilos (>80 °C) (Merino et al., 2019).

Una alternativa biotecnológica al uso de fungicidas químicos es la aplicación de microorganismos termotolerantes como agentes de biocontrol, tal es el caso de *Bacillus* spp. que tienen un efecto supresor sobre las enfermedades de las plantas causadas por fitopatógenos. *Bacillus* spp. se eligen en los sistemas agrícolas, debido a su capacidad de producir metabolitos secundarios y de adaptarse a condiciones de estrés como las altas temperaturas (Singh et al., 2021). Para contrarrestar los efectos de las altas temperaturas, las bacterias emplean diversos mecanismos como la síntesis de proteínas de choque térmico y la modificación en la composición lipídica de la membrana (Horváth et al., 2012). Esta última es esencial, que ya la membrana al ser la responsable de la permeabilidad celular, experimenta cambios en sus componentes bajo condiciones estresantes, siendo la supervivencia bacteriana determinada por su capacidad de adaptación a estas modificaciones (Rojas-Solis et al., 2020b).

Comprender los mecanismos genéticos, fisiológicos y morfológicos de tolerancia a altas temperaturas de *Bacillus* spp. brinda una herramienta importante para utilizar y aplicar estos aislados bacterianos en regiones donde los cultivos agrícolas se ven afectados por las temperaturas elevadas.

2. ANTECEDENTES

2.1 Cambio climático y su efecto en los cultivos

La temperatura promedio del planeta ha estado aumentando paulatinamente desde que se inició la revolución industrial, a partir de entonces se han estado emitiendo altos niveles de gases de efecto invernadero como dióxido de carbono (CO₂) y metano (CH₄), entre otros, originados, principalmente, por actividades antropogénicas como la quema de combustibles fósiles (Mikhaylov et al., 2020), siendo esta la principal actividad que contribuye al calentamiento global (Fatima et al., 2020). La temperatura aumenta a la par de la urbanización y ésta se ha convertido en una de las mayores fuentes de emisiones de CO₂, contribuyendo con un 75% de las emisiones globales (Zhu et al., 2022), ya que, la urbanización es un proceso complejo, que resulta en una densa concentración de la población en determinado espacio, el uso del suelo de éste y de la actividad económica que se desarrolla. Se pronostica que seguirá aumentando (Wang et al., 2022).

El reciente informe de la Evaluación del Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC), señaló que la temperatura promedio global durante el periodo 2011-2020 fue 1.09 °C más alta en que en 1850-1900, con aumentos sobre la superficie terrestre de 1.59 °C y de 0.88 °C sobre el océano. Además, se menciona que la temperatura global seguirá aumentando para el periodo 2021-2040, pronosticando un aumento de 1.5 °C, mientras que para el 2081-2100, se proyecta un aumento de hasta 4.4 °C (IPCC, 2023).

Los cultivos agrícolas se están viendo drásticamente afectados por las condiciones ambientales cambiantes y, en consecuencia, muestran menores rendimientos (Vaishnav et al., 2019). Una agricultura exitosa, que permita producir alimentos suficientes para satisfacer las necesidades humanas depende totalmente de los factores ambientales. Los cultivos son altamente vulnerables al cambio climático, ya que cada especie tiene límites de temperatura en los cuales la fenofase y ciclo de vida funcionan correctamente (Skendžić et al., 2021), una alta temperatura repercute en el desarrollo de los cultivos, retrasa su desarrollo y promueve prácticas

agrícolas no ordinarias, como fecha de siembra tardía, que finalmente se refleja en una disminución del rendimiento (Fatima et al., 2020).

Por ejemplo, el aumento de 3 a 4 °C en la temperatura puede provocar una disminución de la producción de los cultivos agrícolas de hasta un 15 – 35 %, lo cual atentaría contra el suministro mundial de alimentos (Khan et al., 2020b). Los registros meteorológicos muestran que las temperaturas medias anuales en las áreas donde se cultivan *Triticum aestivum* (trigo), *Oryza sativa* (arroz), *Zea mays* (maíz) y *Glycine max* (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., 2018). El rendimiento de cada cultivo depende de la antesis (fase de expansión de una flor, durante la cual ocurre la polinización). El *Z. mays*, tiene una fase de antesis comprimida que dura entre 3 y 5 días, mientras que *O. Sativa*, *Sorghum bicolor* (sorgo) y otros granos pequeños puede extender la antesis durante un período de una semana o más. La sensibilidad de cada cultivo a las temperaturas extremas afectará este proceso. En aquellos cultivos con duración de antesis por varias semanas, evitará que una sola ocurrencia de un evento de temperaturas altas afecte a todas las flores en polen (Hatfield & Prueger, 2015). Ledesma y Sugiyama, (2005), evaluaron el polen viable en fresas (*Fragaria xananassa* Duch.) 'Toyonoka', expuestas a estrés térmico, el cual consistió en un periodo día/noche de 30 °C/25 °C, mientras que el periodo del testigo fue de 23 °C/18 °C, observaron que la viabilidad del polen es significativamente menor bajo estrés térmico. También, reportaron que los porcentajes de germinación del polen de plantas cultivadas *in vitro* a 30 °C/25 °C y germinadas a 30 °C, también disminuyeron con respecto a plantas cultivadas a 23 °C/18 °C y germinadas a 23 °C.

Además de los efectos directos derivados del aumento de la temperatura que sufren las plantas, también sufren efectos indirectos como mayor frecuencia de olas de calor, enfermedades, plagas e impactos por infecciones (Skendžić et al., 2021). Se

sabe que, a mayor temperatura, las infecciones fúngicas en las plantas también aumentan, lo que es importante debido a que los agentes causales de la mayoría de las enfermedades en los cultivos y los principales responsables de la pudrición de los frutos en postcosecha son los hongos (Gatto et al., 2011).

2.2 Pronóstico de la población mundial en las siguientes décadas y estrategias para asegurar la seguridad alimentaria

La población mundial está creciendo actualmente a un ritmo de alrededor del 1.13 % por año y, en cuestión de individuos, esto representa un aumento de alrededor de 80 millones (Tripathi et al., 2019). Las Naciones Unidas estimaron que la población mundial aumentaría a 7,700 millones en 2019 y estiman que aumente a 8,500 millones en 2030, a 9,700 millones en 2050 y a 10,900 millones en el 2,100, observándose la mayor parte del crecimiento poblacional en los países en desarrollo (UN, 2019). Esto demandará un aumento enorme en la producción de los cultivos agrícolas para satisfacer las necesidades alimentarias de la población (Ons et al., 2020). En otras palabras, se deberá garantizar la seguridad alimentaria, que esencialmente se refiere a la combinación de cuatro factores importantes: disponibilidad de alimentos, acceso, utilización y vulnerabilidad. Ante el crecimiento de la población mundial, el suministro seguro y sostenible de alimentos inocuos, nutritivos y asequibles de alta calidad, será el principal desafío en los próximos años. Esto no será fácil debido a que se debe de llevar a cabo utilizando la menor cantidad de suelo e insumos, así como no contribuir al cambio climático global y al aumento de otros factores ambientales que afectan de forma negativa (Tripathi et al., 2019).

Para lograrlo, la superficie de tierras de cultivo deberá ser mayor, entonces se promoverá la alteración de ecosistemas naturales, también conocido como cambio de uso de suelo (Ons et al., 2020), provocando cambios en las propiedades físicas, hidrológicas, químicas y biológicas del mismo. Además, cuando se altera el suelo, aumenta su susceptibilidad a la desertificación (Béjar-Pulido et al., 2020).

Si bien, actualmente también existen variedades que producen un mayor rendimiento y serán fundamentales para cubrir la demanda alimenticia, tienen consecuencias como la reducción de la biodiversidad agrícola derivada del aumento de los monocultivos (McCouch et al., 2020). Esta pérdida de diversidad de las variedades locales en las áreas geográficas de origen de los cultivos debido a la sustitución por cultivos de alto rendimiento también se denomina "erosión genética" (Khoury et al., 2022). Adicionalmente, el uso de monocultivos a menudo se asocia con una vulnerabilidad mayor a enfermedades y plagas fúngicas (Ons et al., 2020).

También, para lograr abastecer la demanda de alimentos se intensifican las prácticas agrícolas para obtener el mayor rendimiento de los cultivos, aplicando excesivas y desequilibradas cantidades de nitrógeno (N) y fósforo (P) (Dai et al., 2020). Esta actividad provoca varios problemas, entre ellos, acidificación del suelo, deposición de nitrógeno atmosférico, lixiviación de fósforo, eutrofización de cuerpos de agua, así como el desequilibrio de N y P en el suelo. En el caso del fósforo, esto se debe principalmente al uso excesivo de fertilizantes fosfatados para mantener altos rendimientos en los cultivos, lo que resulta en un incremento de áreas con niveles muy elevados de este elemento en el suelo (Chen et al., 2021).

La aplicación de estiércol (fertilizantes orgánicos) también es una práctica usada para aumentar el rendimiento de los cultivos. Lo anterior no solamente altera las propiedades del suelo, también contribuye con alrededor del 5% de las emisiones antropogénicas globales de gases de efecto invernadero, principalmente a través de las emisiones de metano (CH_4) y óxido nitroso (N_2O) (Folberth et al., 2020).

Otra técnica para maximizar el rendimiento de los cultivos es la agricultura que hace uso de cultivos genéticamente modificados, los cuales se conforman de plantas que han sido modificadas a través de técnicas de ingeniería genética, con el fin de mejorar rasgos existentes o introducir algún nuevo rasgo (Krishan et al., 2020). Por ejemplo, la generación de plantas con rasgos de resistencia a ataques por insectos fitófagos, los cuales disminuyen el rendimiento de los cultivos, ya sea por alimentación o por transmisión de virus. Las plantas modificadas genéticamente a

través de la expresión de toxinas, proteínas de fusión y lectinas, muestran resistencia contra patógenos (Talakayala et al., 2020).

Así como también la generación de plantas transgénicas enriquecidas con antocianinas que sobreexpresan genes reguladores o de biosíntesis de antocianinas. Estos pigmentos actúan como antioxidantes, mediadores de las cascadas de señalización inducidas por especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés). Las ROS se sintetizan como respuesta al estrés en plantas, entre ellos el estrés de tipo ambiental (abiótico) que incluye el estrés por calor, por sequía, por salinidad, por bajas temperaturas y por metales pesados. Cuando la planta se encuentra en condiciones de estrés extremo, las ROS se producen en exceso y causan daño oxidativo, inhibiendo su crecimiento y reduciendo la productividad de los cultivos. Por lo anterior, la generación de plantas tolerantes a diversos tipos de estrés abióticos, enriquecidas con antocianinas, podría ser de gran importancia ante el escenario del cambio climático global, ya que el impacto de diversas tensiones abióticas aumentará, amenazando el rendimiento de los cultivos y la seguridad alimentaria mundial (Naing & Kim, 2021). Otro ejemplo es la generación de plantas sobreexpresadoras de defensinas vegetales que mejoran el nivel de defensa contra patógenos, por ejemplo, el péptido Rs-AFP2 se ha expresado en *Triticum* el cual mostró una mayor resistencia a *F. graminearum*. Asimismo, CADEF1 se ha expresado en *Solanum lycopersicum* (tomate) transgénico y mostró resistencia a *Fusarium* spp. y *Phytophthora infestans* (Sher-Khan et al., 2019).

Las organizaciones no gubernamentales (ONG) y los ambientalistas han identificado desventajas en el empleo de plantas transgénicas, principalmente respuestas alérgicas, aumento de superplagas y la pérdida de biodiversidad (Baghbani-Arani et al., 2021).

Las técnicas mencionadas anteriormente aumentan el rendimiento de los cultivos, sin embargo, presentan las desventajas ya mencionadas. Por lo anterior, se requieren de estrategias que permitan hacerle frente a uno de los mayores desafíos del mundo que es satisfacer la creciente y cambiante demanda de alimentos, de

manera ambiental y socialmente sostenible (Molotoks et al., 2021). El uso de bioinoculantes bacterianos cumple con estos criterios. Se sabe que la tolerancia de las plantas al estrés está relacionada con los microorganismos con los cuales se encuentra interaccionando. La tolerancia al estrés mediada por microorganismos en las plantas es un enfoque ecológico para lograr un mejor crecimiento y rendimiento de los cultivos (Vaishnav et al., 2019). Además, todos los elementos aportados a través de fertilizantes químicos pueden ser aportados por microorganismos, especialmente N, P y potasio (K) (Soumare et al., 2020). A los microorganismos que mejoran la salud de las plantas se les conoce como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB, por sus siglas en inglés), las cuales lo hacen a través de dos mecanismos, directos e indirectos (Santoyo et al., 2019).

2.3 Características biológicas del género *Bacillus*.

El género *Bacillus* pertenece al grupo de las Gram-positivas y pertenece al filo Firmicutes, sus miembros tienen forma de bastón, son aeróbicos o anaeróbicos facultativos y catalasa positivos (Fira et al., 2018). Se caracterizan por la variedad de los ambientes en los que pueden ser encontrados, tanto en el suelo, agua y aire, así como en ambientes extremos (Miljaković et al., 2020). Su capacidad de formar endosporas es la función que le permite sobrevivir en ambientes adversos bajo condiciones estresantes, como aquellos con altas temperaturas (Hurtado-Bautista et al., 2021). Un ejemplo de ello es la cepa de *B. licheniformis* que fue aislada de fluido térmico de un respiradero hidrotermal, interesantemente se reportó su capacidad de crecer a una temperatura máxima de 60 °C (Caccamo et al., 2020). Es sabido que *Bacillus* spp. abundan en el suelo y la rizosfera, llegando a componer hasta el 95 % de las poblaciones de bacterias Gram-positivas (Miljaković et al., 2020). Además, las cepas de *Bacillus* son ampliamente utilizadas en el control biológico de patógenos de plantas y como biofertilizantes, ya que cuentan con una amplia maquinaria genómica que les permite producir una gran variedad de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, así como para estimular el crecimiento vegetal (Santoyo et al., 2012).

La asociación de bacterias y plantas es importante, se da principalmente cuando las bacterias logran colonizar la rizosfera y/o endosfera de las raíces, ahí es en donde los microorganismos producen cientos de compuestos que tienen un papel fundamental para su interacción con la planta, potenciando su crecimiento y/o antagonizando patógenos fúngicos, estableciendo relaciones simbióticas o mutualistas, en donde ambas partes resultan beneficiadas (Santoyo, 2022). La rizosfera se refiere a la zona del suelo que se encuentra en contacto con las raíces de las plantas, es aquí donde el rizobioma (poblaciones de microorganismos del suelo), contribuye a la nutrición vegetal, participando directamente en la disponibilidad de nutrientes, mejorando las propiedades de las raíces y antagonizando patógenos presentes en el suelo (Orozco-Mosqueda et al., 2022; Richardson et al., 2009). La cepa de *B. amyloliquefaciens* aislada de la rizosfera de *Cucumis sativus* (pepino) aumentó la altura, diámetro del tallo, longitud de la raíz y peso fresco de los brotes y raíces de plantas de este mismo cultivo en experimentos en macetas tras incubarse 30 días, además mostró actividad de biocontrol al disminuir la severidad de la infección por *F. oxysporum* (Han et al., 2019). Algunos miembros del género *Bacillus* también logran colonizar el interior de los tejidos, estableciendo una relación simbiótica o mutualista sin producir efectos negativos a la planta a los cuales se les denomina endófitos (Orozco-Mosqueda et al., 2021).

2.4 Biodisponibilidad de nutrientes esenciales para plantas por *Bacillus* spp.

Dentro de los mecanismos directos que usan las PGPB se encuentra el incremento de la biodisponibilidad de nutrientes, mismos que son esenciales para las plantas (Orozco-Mosqueda et al., 2021). El nitrógeno en los vegetales, por ejemplo, se requiere para la síntesis de proteínas y nucleótidos, además, es indispensable para la fotosíntesis al formar parte de la clorofila (Moreau et al., 2019). En la producción agrícola, un suministro óptimo de nitrógeno se ve reflejado en un incremento en el metabolismo fotosintético y, por consecuencia, en un aumento en el rendimiento de los cultivos (Leghari et al., 2016). El nitrógeno se aplica en fertilizantes a partir de los cuales las plantas solo captan del 40 al 50 %, provocando aplicaciones

excesivas, lo que causa daños ambientales como la degradación del suelo, la contaminación del aire y de las aguas subterráneas (Plett et al., 2020). Las plantas pueden obtener este elemento a través de rizobacterias con la capacidad de fijar el nitrógeno atmosférico. Su función es fijar el N atmosférico (N_2) convirtiéndolo en amoníaco (NH_3) y, posteriormente, convertirlo en nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). De esta forma puede ser absorbido por las plantas. Para esto, las bacterias hacen uso de un complejo sistema de enzimas llamado nitrogenasa (Manoj et al., 2020), el cual se basa en los genes *nif*, entre los cuales se encuentra *nifH*, *nifD* y *nifK*, que codifican para la subunidad estructural de la dinitrogenasa reductasa y las 2 subunidades de la dinitrogenasa, respectivamente (Mahmud et al., 2020). Por otro lado, *B. mycoides* CA1 y *B. megaterium* CY5 tienen la capacidad de producir amoníaco al ser crecidas en fuentes de nitrógeno, la captación de N fue demostrada con ensayos de cultivos de caña de azúcar empleando isótopos $^{15}N_2$, esta acumulación de amoníaco puede ser captada por la planta y así potenciar la producción de biomasa vegetal (Singh et al., 2020).

El fósforo es un componente de varias biomoléculas, entre ellas el ácido desoxirribonucleico (ADN), el ácido ribonucleico (ARN), los fosfolípidos de membrana, así como también, en plantas, participa en procesos metabólicos como la fotosíntesis, la transferencia de energía, la transducción de señales y la respiración (Jeyanthi & Kanimozhi, 2018).

Algunas razones del por qué el fósforo asimilable para las plantas se ve limitado son por la precipitación y la creación de complejos del suelo con otros nutrientes, por lo que, para mantener un constante abastecimiento de este elemento en los cultivos, se opta por el uso excesivo de fertilizantes químicos fosfatados, de los cuales gran parte se precipitan al suelo y producen un daños ambientales (Wahid et al., 2020). Además, los fertilizantes fosfatados contienen una diversidad importante de metales pesados que se acumulan en el suelo, dañan la fertilidad, producen eutrofización, promueven aumento en la huella de carbono y puede tener efectos dañinos en la salud del consumidor (Rawat et al., 2021).

Algunas rizobacterias desempeñan un papel crucial en la nutrición de fósforo en las plantas al solubilizar fosfatos y mineralizar el fósforo, convirtiéndolo en formas

asimilables por las plantas (Rodríguez et al., 2006). Las estrategias que utilizan son la secreción de fosfonatos, fosfatasa y liasas, así como ácidos orgánicos como el ácido cítrico, ácido láctico, ácido glucónico, que producen cambios en el pH rizosférico, convirtiendo los fosfatos insolubles en formas móviles para que sean aprovechables por las plantas (Manoj et al., 2020). También secretan sideróforos, los cuales son agentes quelantes, promoviendo la solubilización y aumentando la disponibilidad de iones de fosfato férrico (FePO_4) (Prakash & Arora, 2019).

Los productos de los grupos de genes de la pirroloquinolina quinina (*pqqA*, *B*, *C*, *D*, *E*, *F*) y la glucosa deshidrogenasa (*gcd*) son los que destacan en la solubilización de los fosfatos, su función es convertir la glucosa en ácido glucónico (principal ácido orgánico para la disolución) (Rawat et al., 2021). Los genes *pqqA*, *pqqB*, *pqqC* y *pqqE* se identificaron en la cepa de *B. mycoides* Gnyt1, y se demostró a través de la construcción de mutantes su participación en la solubilización de fosfato con la secreción de ácidos orgánicos. Estos genes se clonaron exitosamente en *Escherichia coli* y con estas cepas recombinantes se evaluó la concentración de ácidos orgánicos. Se encontró que *pqqA* participa en la síntesis de ácido oxálico, ácido tartárico, ácido málico, ácido cítrico, ácido láctico y ácido acético. De forma interesante, encontraron que las cepas recombinantes *ppqB* y *ppqD* obtuvieron los más altos valores en concentración de malato. Las cepas recombinantes de *E. coli* recombinantes adquirieron propiedades de disolución de fósforo a través de la integración de la familia de genes *ppq*, provenientes de la cepa solubilizadora de fósforo *B. mycoides* Gnyt1 (Yao, 2020).

El K en el suelo no se encuentra disponible para la planta, ya que su forma predominante en el suelo es insoluble, y se encuentra en rocas y minerales de silicato (Gouda et al., 2018). Está involucrado en diversos procesos metabólicos como la fotosíntesis, la regulación de la apertura y cierre estomático (Khan et al., 2022), así como también en el transporte y la absorción de otros nutrientes, en la formación de células, síntesis de enzimas, proteínas, almidón, celulosa, vitaminas y también confieren resistencia al estrés abiótico y biótico (Meena et al., 2015). Los genes *ackA* (ácido acético quinasa), *gltA* (ácido cítrico sintasa), *mdh* (malato deshidrogenasa) y *ppc* (fosfoenolpiruvato carboxilasa), los cuales están

relacionados con la solubilización de potasio, fueron encontrados en el genoma de *B. aryabhatai* SK1-7. La expresión de estos genes en KS1-7 se evaluó en medio suplementado con una fuente de potasio insoluble, feldespato de potasio (KAlSiO_8) y soluble, fosfato dipotásico (K_2HPO_4). Los mayores niveles de expresión de los 4 genes se obtuvieron en el medio suplementado con KAlSiO_8 , en el cual, la solubilización se vió estimulada (Chen et al., 2022).

2.5 Síntesis de fitohormonas por *Bacillus* spp.

Las *Bacillus* spp. pueden mejorar la salud de la planta mediante la modulación de la síntesis de hormonas vegetales (Saeed et al., 2021), las cuales regulan el crecimiento y desarrollo vegetal. Las fitohormonas, u hormonas vegetales, funcionan como señales moleculares en respuesta a factores ambientales (Backer et al., 2018; Barnawal et al., 2017).

Las auxinas son una de las fitohormonas más importantes ya que intervienen en distintos procesos fisiológicos como la germinación de semillas, la formación de vasos xilemáticos, el alargamiento y proliferación de células vegetales, ramificación de raíces (raíces laterales y adventicias), fototropismo, geotropismo, fotosíntesis, florescencia y fructificación, y tolerancia a condiciones estresantes (Venieraki et al., 2021). El ácido indol-3-acético (AIA) es el tipo de auxina que las PGPB producen principalmente. Se han encontrado siete vías para la biosíntesis bacteriana de AIA, cinco de estas vías dependen del L-triptófano como precursor, este aminoácido es producido por la planta como exudado radicular y las bacterias producen AIA como metabolito secundario para liberar el triptófano en exceso (Gamalero & Glick, 2022). Batista et al., (2021) evaluaron la producción de auxinas por la cepa RZ2MS9 de *B. thuringiensis* observando que la capacidad de síntesis aumentó 5 veces al adicionar 1 g/L de L-triptófano. También se encontraron conjuntos de genes involucrados en las vías dependientes de triptófano: indol-3-piruvato (IPA) y triptamina (TPM) para la síntesis de AIA, para IPA *ipdC*, *aldH* y aminotransferasas, y para TPM, *ipdC*, *tdc* y *mao*.

Las citoquininas (CK) participan en la división y elongación celular, germinación de semillas, crecimiento de brotes, absorción de nutrientes, prevención de la senescencia, desarrollo vascular y desarrollo de gameto. Adicionalmente, contribuyen a la resistencia del estrés biótico y abiótico en plantas. Las CK pueden ser sintetizadas por PGPB, y se han reportado cepas que a altas concentraciones de sal, la síntesis de las CK no se ve obstaculizada (Kumawat et al., 2023). En el genoma de la cepa *B. subtilis* YB-15 se encontraron los genes *miaA* y *miaB* que participan la biosíntesis de CK. La inoculación de esta cepa en plántulas de *Triticum* mostró características promotoras del crecimiento vegetal (PGP por sus siglas en inglés) aumentar el peso fresco de los brotes en un 4.2 % y el peso fresco de las raíces en un 11.4 % a los 20 días, lo cual se reflejó en un mayor peso fresco y seco (Xu et al., 2022).

Las giberelinas (GA) participan en la germinación de semillas, la promoción del crecimiento de tallos y hojas, la estimulación de la floración y el desarrollo de frutos y el retraso del envejecimiento de las plantas (Bhat et al., 2020). Las GA son diterpenoides tetracíclicos formados por cuatro unidades isoprenoides. Son estructuras de 19 o 20 carbonos. Las tres giberelinas biológicamente activas más comunes son GA1, GA3 (ácido giberélico) y GA4 (Kalra & Bhatla, 2018). La cepa de *B. megaterium* HT517 tiene la capacidad de sintetizar AIA y GA3 y se reportó que en plantas de *S. lycopersicum* acelera el crecimiento vegetativo y reproductivo. Se identificaron los genes funcionales *trpA*, *trpB*, *trpS*, *TDO2* e *idi*, involucrados en la síntesis de terpenoides (Yang et al., 2022). Se han reportado otras especies de *Bacillus* con la capacidad de sintetizar GA, como *B. licheniformis*, *B. pumilis*, *B. cereus*, *B. macroides* y *B. siamensis* (Keswani et al., 2021).

2.6 Infecciones fúngicas en los cultivos agrícolas

Las infecciones por hongos fitopatógenos afectan a la industria agrícola y hortícola en todo el mundo, causando pérdidas de hasta 200 mil millones de dólares estadounidenses por año (Shuping & Eloff, 2017). En general, el ciclo de vida de los hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas suele ser similar, es decir, se compone

de seis etapas: i) las esporas que se encuentran en el aire, agua, artrópodos, aves o material con el cual se manipulan los cultivos, como tijeras de poda, llegan a un hospedero sano que presenta alguna herida; ii) las esporas penetran por las heridas y germinan en el hospedero sano; iii) el agente fúngico comienza a colonizar los tejidos y se observa sintomatología en la planta; iv) la enfermedad se incrementa y produce la muerte de tejidos de la planta; v) en los tejidos infectados de la planta, el agente fúngico prolifera y comienza la producción de esporas; vi) las esporas son depositadas nuevamente en el ambiente y de esta forma comienza de nuevo el ciclo (Kenfaoui et al., 2022). Algunos de los hongos patógenos de plantas que fueron empleados en este estudio y que tienen importancia global por las enfermedades que producen se mencionan enseguida:

2.6.1 *Botrytis cinerea*

B. cinerea fue designado por la comunidad científica como el segundo patógeno vegetal más importante a nivel mundial en cultivos agrícolas (Dean et al., 2012). Se estima que causa pérdidas en la producción mundial entre 10 y 100 mil millones de dólares anuales (De Angelis et al., 2022). Es un necrótrofo importante y típico en el mundo causando daños tanto antes como después de la cosecha en numerosos cultivos, su enfermedad se conoce como moho gris (Souibgui et al., 2021). Puede desarrollarse en el campo y también puede causar descomposición de productos hortofrutícolas en postcosecha o permanecer latente hasta el almacenamiento. La germinación de esporas de este patógeno se desarrolla vigorosamente en condiciones de alta humedad relativa y bajas temperaturas. Así, en el almacenamiento en frío, se produce el desarrollo de síntomas de moho gris, por lo que esta enfermedad se propaga rápidamente entre las frutas del mismo embalaje (Yusoff et al., 2020).

B. cinerea no presenta especificidad de huésped aparente y puede infectar a más de 1000 especies de plantas, infecta y crece en tejidos dañados o senescentes, provocando eventualmente la muerte del tejido. También puede ingresar al huésped a través de heridas o aberturas naturales. Además de permanecer de forma inactiva

en órganos de plantas que no están en proceso de senescencia o que no están maduros (Petrasch et al., 2019).

Entre los cultivos que infecta se encuentran *S. lycopersicum* (tomate), *Rubus ulmifolius* (zarzamora), *Vaccinium corymbosum* (arándano), *Ribes rubrum* (grosella), *Rubus idaeus* (frambuesas), *Fragaria* (fresa) y *Vitis vinífera* (uvas). Cabe destacar que afecta diferentes órganos de las plantas como hojas, tallos, flores y frutos (Terrones-Salgado et al., 2019). En cultivos de *Fragaria*, el patógeno infecta las hojas y puede ser destructivo también para los frutos verdes y maduros. Por lo anterior se requieren estrategias de control de este fitopatógeno para evitar daños significativos, para lograr esto se utilizan principalmente, fungicidas químicos de origen sintético. Se han reportado aplicaciones de hasta 20 veces por semana para lograr su control (Amiri et al., 2019). En *S. lycopersicum*, el síntoma más común que se observa en hojas maduras y senescentes, así como en frutos es la podredumbre gris, seguido de la rápida aparición de masas de conidias grises (esporas asexuales). También puede presentarse en tallos, principalmente en heridas en donde puede permanecer en letargo y, cuando finaliza esta etapa, las lesiones del tallo se vuelven blancas y muestran grandes esclerocios negros (masas compactas de micelio), pudiendo llegar a casos severos lo que da lugar a la pudrición de la totalidad del tallo (Rhouma et al., 2023).

Aproximadamente, el 8 % del mercado mundial de fungicidas se utiliza para controlar a este patógeno. Es importante resaltar que solo un bajo porcentaje de los fungicidas alcanzan su objetivo biológico, ya que el 90 % de ellos se pierden por fotólisis, volatilización, degradación, lixiviación y escurrimiento durante la aplicación (De Angelis et al., 2022). Se sabe que *B. cinerea* desarrolla resistencia a los fungicidas (Dèné & Valiuškaitė, 2021), debido a su alta variabilidad genética, abundante esporulación y corto tiempo de generación. Esto conduce a la aplicación de un elevado número de fungicidas para su control (Samaras et al., 2021). Incluso, esta especie se ha utilizado como un organismo modelo para comprender el desarrollo de la resistencia fúngica a estos compuestos químicos (Garfinkel, 2021).

En cultivos agrícolas, se ha informado sobre la resistencia a fungicidas en *B. cinerea*, especialmente en algunas regiones de China, donde los fungicidas procimidona y carbendazim han perdido su efectividad. Actualmente, en estas regiones rara vez se utilizan estos compuestos para controlar a este fitopatógeno, ya que se ha observado una resistencia de hasta el 100 % (Li et al., 2020). Sin embargo, el control de la enfermedad se sigue basando, principalmente, en el uso de estos compuestos sintéticos (de la Fuente et al., 2020).

2.6.2 *Fusarium* sp.

El género *Fusarium* es de importancia económica mundial debido a las pérdidas económicas que causa su infección (Cutuli et al., 2015). Se ubica entre los géneros más destacados de hongos fitopatógenos en la producción agrícola, siendo responsable de diversas enfermedades que afectan a una amplia gama de cultivos. Algunos de los géneros más conocidos son *F. graminearum*, que causa el tizón de la espiga de *T. durum* y, *F. oxysporum*, que causa marchitez y pudrición del tallo en diversos cultivos como *Capsicum* y *S lycopersicum* (Summerell, 2019). También es de relevancia *F. brachygibbosum*, ya que existen reportes recientes de infecciones en cultivos en los cuales disminuye el rendimiento al interferir con la absorción y translocación de agua y nutrientes (Shan et al., 2017).

En regiones de clima templado, *F. graminearum* pasa el período invernal en tejidos vegetales previamente infectados, dando origen a conidios asexuales o ascosporas sexuales. Estas estructuras pueden ocasionar infecciones primarias en diversas partes de la planta, como flores, tallos o raíces. Después de la germinación de las esporas y su penetración en el tejido vegetal, los estudios microscópicos revelan que las hifas pueden desarrollarse entre las células sin provocar daño visible. Posteriormente, el crecimiento dentro de las células y la colonización extensiva de los tejidos está relacionada con la aparición de necrosis visible (Brauer et al., 2020).

La enfermedad que produce posiciona a este género dentro de los diez patógenos principales según su importancia científica y económica en cultivos agrícolas en todo el mundo (Dean et al., 2012). Esta enfermedad es conocida como el tizón de

la espiga y es una de las enfermedades más graves, que provoca la pérdida de la calidad de la cosecha y reducción del rendimiento del grano (Femenias et al., 2020). Además, contamina el grano con dos grupos de micotoxinas, la zearalenona (ZEA) y los tricotecenos (TCT), incluidos los tricotecenos tipo B (TCT-B), el deoxinivalenol (DON), sus derivados 3-acetilados (3-ADON) o 15-acetilados (15-ADON) y nivalenol (VNI). DON es la micotoxina detectada con mayor frecuencia en los cereales en todo el mundo (Chen et al., 2019). El DON inhibe la síntesis de proteínas al unirse al ribosoma y causa efectos eméticos, anorexia y desregulación inmunológica, así como efectos de crecimiento, reproductivos y teratogénicos en mamíferos. Por lo anterior, las organizaciones reguladoras han establecido niveles máximos permisibles de DON en los cereales para minimizar la exposición humana y animal a esta micotoxina (Zhou et al., 2020). También se ha reportado que TCT encontrados en *Z. mays*, se pueden encontrar en otros cereales de grano pequeño, como el *T. durum*, *Hordeum vulgare* (cebada), la *Avena sativa* (avena) y el *Secale cereale* (centeno), disminuyendo la calidad final de los granos (Femenias et al., 2020).

La especie *F. brachygibbosum* se ha identificado en diversas plantas, entre las cuales se encuentra el *Z. mays* (Ali et al., 2020; Shan et al., 2017), en *S. lycopersicum* causando marchitez de las hojas y marchitez vascular de tallos y raíces (Liu et al., 2023), así como en tubérculos de *Solanum tuberosum* (papa) (Merima et al., 2022). 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).

2.6.3 *Geotrichum candidum*

Geotrichum es un género de hongos con morfotipos coloniales dimórficos (colonias parecidas a levaduras o mohos de color crema). Las especies de *Geotrichum* se encuentran en muchos sustratos incluidos el suelo, las plantas, la leche y el agua, o asociadas con insectos (Paes et al., 2021). Originalmente, las especies se asignaban basándose únicamente en diferencias morfológicas (Kidd et al., 2023).

Actualmente, la identificación de *Geotrichum* se basa en la combinación de varios enfoques, como morfología, fisiología, ecología, técnicas de PCR y secuenciación de genes (Paes et al., 2021). *G. candidum* presenta micelio aéreo en colonias similares a levaduras en diferentes medios de crecimiento. Presenta anamorfismo, ya que se observan artrosporas asexuales (esporas desarrolladas en una hifa terminal) (Omeike et al., 2019). *G. candidum* es un hongo que puede causar infecciones en humanos (Keene et al., 2019), aunque es poco común, puede colonizar la piel, el sistema respiratorio y el tracto gastrointestinal causando una enfermedad conocida como geotricosis (Paes et al., 2021). También, puede colonizar alimentos como quesos frescos, mantequilla, leche fermentada, nata, carne de ave, zumos de frutas y verduras alterando sus propiedades organolépticas como el sabor, aroma, color y textura. Por otro lado, es usado en la industria láctea, especialmente de quesos, ya que interviene en la fermentación y maduración tanto de producción industrial como artesanal, contribuyendo así a sus características finales (Koňuchová & Valík, 2021).

No obstante, también es ampliamente reconocido como un patógeno de plantas, ya que es el agente causal de la pudrición ácida que se presenta durante el almacenamiento postcosecha de *Citrus sinensis* (siendo estos los más afectados) (Singh & Deverall, 1984), de *Fragaria* (Wenyue et al., 2018), *Daucus carota* (zanahoria) (Hameed et al., 2019), *Prunus persica* var. nucipersica (nectarina) y *Prunus persica* (durazno) (Yaghmour et al., 2012), melón (Halfeld-Vieira et al., 2020) y *Actinidia deliciosa* (kiwi) (Cheng et al., 2021). Aunque no se limita a estos cultivos, *G. candidum* es un patógeno importante que causa la pudrición ácida en otras frutas y verduras (Thomidis et al., 2021). Además, aunque la enfermedad se presenta principalmente en frutos maduros, también puede aparecer en frutos inmaduros gravemente dañados (Tozlu, 2016), principalmente en aquellos con daños derivados de insectos o bien por heridas mecánicas (Paes et al., 2021), que pudieran presentarse en campo (Türkkan, 2019).

Los síntomas incluyen una descomposición suave, acuosa y marrón con una fina capa de crecimiento micelial blanco en la superficie del fruto. La descomposición puede llegar a la semilla y consumir todo el fruto. Cuando éstos se pudren, tienen

un olor característico, que oscila de levadura a vinagre, también puede haber salida de jugo de la lesión, lo que hace que la cáscara se desintegre y forme surcos (Yaghmour et al., 2012).

En *D. carota* infectadas con *G. candidum*, la enfermedad termina con la formación de esporas del patógeno de color blanco pálido en la superficie del área de pudrición y la formación de mal olor (Tozlu, 2016). De igual forma, en la infección en zanahorias, como primer paso, *G. candidum* crece en la superficie de las lesiones enfermas en condiciones de humedad. Posteriormente, las lesiones se extienden profundamente hacia el interior, provocando el ablandamiento del tejido cubierto por una capa blanquecina y acuosa, así como el hundimiento en casos más severos (Horita & Hatta, 2016).

Diversos fungicidas químicos como imazalil y tiabendazol, no presentan efecto alguno contra *G. candidum*; sin embargo, en estudios realizados *in vitro*, se ha demostrado la eficacia de cepas de *Bacillus* para inhibir el crecimiento de este patógeno (Wang et al., 2018).

2.6.4 *Botryosphaeria* sp.

El género *Botryosphaeria* pertenece a la familia Botryosphaeriaceae y al filo Ascomycota, los cuales se conforman de hongos endófitos, fitopatógenos y saprófitos cosmopolitas, con una amplia gama de huéspedes como especies de plantas tropicales, subtropicales y templadas (Mohankumar et al., 2023). Los conidios de *Botryosphaeria*, a menudo se distinguen tener paredes delgadas, estrechas y parecidas a *Fusicoccum*, y de paredes gruesas, más anchas, parecidas a *Diplodia* (Moral et al., 2019).

Los hongos del género *Botryosphaeria* han sido identificados como patógenos oportunistas que residen de forma oculta en los tejidos de las plantas, los cuales se muestran asintomáticos; no obstante, el microorganismo posee potencial latente de patogenicidad (Hattori et al., 2021). Cuando las condiciones de temperatura son propicias, el patógeno sale de su fase latente en la superficie del fruto, incluso sin depender de alguna abertura natural, y éste muestra síntomas característicos de manchas negras redondas del tamaño de un alfiler que evolucionan hacia el tizón

de la fruta. La capacidad del hongo para penetrar directamente los tejidos vegetales se debe a la formación de apresorios. Estas estructuras fúngicas se consideran importantes para que el patógeno infecte con éxito a su huésped. En Brasil, esta enfermedad es la principal infección en postcosecha de *Malus domestica* (manzana) y *Mangifera indica* (mangos) almacenados. (Darge & Woldemariam, 2021).

Botryosphaeria spp. a menudo se distinguen fácilmente del resto de los grupos de hongos por sus características macroscópicas, como micelio aéreo de gris a negro y pigmento de gris a índigo o de gris a negro. En los últimos años, la identificación del género *Botryosphaeria* a nivel de especie se realiza con precisión combinando datos de secuencias de ADN con características morfológicas (Darge & Woldemariam, 2021). Estos fitopatógenos infectan principalmente a especies leñosas, su enfermedad se le conoce como “muerte regresiva” (Niem et al., 2020), se puede observar como canchros, tizones en los brotes, manchas en las hojas, pudriciones de frutas y semillas, además de comprometer procesos fisiológicos como la traslocación de agua y nutrientes (Yan et al., 2018),

Algunos cultivos que se ven afectados por la muerte regresiva son *Juglans regia* (nuez), *Prunus dulcis* (almendra) (Holland et al., 2021), *Macadamia* (Mohankumar et al., 2023), y *Pistacia vera* (pistacho) (Moral et al., 2019). En los nogales, los miembros de este género provocan la muerte regresiva de ramas, brotes y yemas, por lo que reducen los rendimientos al infectar directamente la planta. Si no se controla la muerte regresiva, la disminución del rendimiento podría aumentar con cada cosecha, lo que en última instancia provocaría una pérdida casi total del huerto. Se ha informado de muerte regresiva en todos los países donde se cultivan nogales como cultivos comerciales (Antony et al., 2023). Sin embargo, también es hospedero de otros cultivos, como plantas perennes que abarca a *M. domestica*, *Vaccinium myrtillus* (arándano), *C. sinensis* y *V. vinifera*, en las cuales los síntomas se observan como muerte regresiva, canchros, pudrición de frutos y decoloración de hojas (Belair et al., 2022). En *Vitis vinifera* (vid), la muerte regresiva por *Botryosphaeria* es una de las enfermedades más importantes, que afecta la

sostenibilidad de los viñedos y provoca pérdidas económicas. Estos agentes fúngicos viven y colonizan la madera de los órganos perennes causando necrosis, así como otros síntomas foliares como clorosis o marchitamiento repentino, asociados a una característica franja marrón debajo de la corteza (Lemaitre-Guillier et al., 2020). También, suelen observarse síntomas de este microorganismo como lesiones anulares concéntricas en la superficie de la fruta infectada, tanto en manzana como en peras, con la aparición de canchales (Zhai et al., 2014).

2.7. Problemática en la aplicación de fungicidas químicos en el control de fitopatógenos

La producción agrícola se ha intensificado en los últimos años (Wu et al., 2015) y en los próximos, deberá de aumentar debido a la demanda de alimentos de una población en crecimiento (Cao et al., 2018).

Los patógenos de plantas son responsables de importantes pérdidas económicas en cultivos agrícolas que ascienden a miles de millones de dólares estadounidenses (Dmitrović et al., 2022). Los agentes fúngicos producen pérdidas de cultivos, ya que a través de sus esporas, infectan a los cultivos y a sus frutos antes y después de la cosecha (Baard et al., 2023). En los últimos siglos, los productores han usado a los agroquímicos para mejorar la calidad y elevar la producción de los cultivos, sin embargo, su aplicación constante e indiscriminada genera problemáticas como contaminación ambiental, debida a la residualidad de los agrotóxicos; afectación de la salud pública humana; intoxicaciones agudas y graves; y la selección de hongos resistentes (Shafi et al., 2017). Por ejemplo, contra *B. cinerea*, la aplicación de botriticidas (fungicidas específicos para *Botrytis*) llegan a representar hasta el 10 % de las ventas del mercado mundial, sin embargo, no solo éstos son usados, también se aplican fungicidas de amplio espectro cuya venta en el mercado global es desconocida (Dean et al., 2012). La aplicación de los fungicidas suele ser de forma constante e indiscriminada, lo que repercute negativamente en el medio ambiente y promueve la generación de cepas resistentes (Morales-Cedeño, Orozco-Mosqueda, et al., 2021). Dadas estas consideraciones, resulta de gran relevancia la búsqueda

de alternativas orgánicas y respetuosas con el ecosistema para gestionar eficazmente las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en los cultivos de valor económico, contribuyendo así a mantener la sostenibilidad de la agricultura (Baard et al., 2023; Santos et al., 2020; Zouari et al., 2020).

A través del control biológico se puede reducir la aplicación de uso de plaguicidas sintéticos para lograr una práctica agrícola amigable con el ecosistema, viable y sostenible (Chenniappan et al., 2019). De esta manera, el control biológico es una estrategia que se basa en el uso de organismos vivos, entre ellos las bacterias, para tratar las infecciones ocasionadas por fitopatógenos, con el fin de que sus poblaciones no alcancen límites superiores en los cuales produzcan pérdidas económicas (Carmona-Hernandez et al., 2019).

En general, la aplicación de biofungicidas del género *Bacillus* en cultivos agrícolas es preferida debido a dos principales características, la capacidad de crecer en condiciones de estrés ambiental, así como la capacidad de formar endosporas que le otorga una mayor viabilidad a largo plazo y vida de anaquel (Chen et al., 2007). Adicionalmente, la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos de Norte América (FDA de los EE. UU.) cataloga a *B. subtilis* como un organismo generalmente reconocido como seguro (GRAS por sus siglas en inglés) para su uso en las industrias de procesamiento de alimentos, por lo que su utilización como biofungicida para biocontrolar a una gran variedad de fitopatógenos de plantas (por su gran diversidad de sustancias antimicrobianas), es una alternativa potencial al uso de fungicidas químicos, lo cual, a largo plazo, podría frenar los efectos negativos de estos compuestos (Shafi et al., 2017). Es por eso que la aplicación de bacterias que tienen la capacidad de biocontrolar a los microorganismos patógenos de plantas, como hongos y bacterias, es una alternativa prometedora que está llamando la atención (Ongena & Jacques, 2008).

2.8 *Bacillus* como agente de biocontrol de hongos fitopatógenos

Los cultivos son constantemente afectados por enfermedades producidas por microorganismos patógenos, especialmente hongos, provocando que aproximadamente el 25% del rendimiento mundial se pierda (Wu et al., 2015). Un punto clave para contrarrestar los daños provocados por los hongos fitopatógenos de plantas por parte de las PGPB, es por la capacidad que tienen de colonizar competitivamente las raíces de los cultivos, donde adicionalmente podrán actuar de forma simultánea como biofertilizantes (Chen et al., 2007) y como antagonistas debido a su capacidad de producir diversos compuestos llamados metabolitos secundarios (Wu et al., 2021), entre ellos lipopéptidos antimicrobianos principalmente representados por iturinas, surfactinas y fengicinas (Fira et al., 2018). De hecho, se sabe que el alrededor del 4-5 % de los genomas de los miembros del grupo de *B. subtilis* se encarga de la síntesis de metabolitos secundarios con potencial antagonista (Fira et al., 2018) así como un 8.5 % en *B. licheniformis* (Miljaković et al., 2020) y cerca del 10 % en *B. amyloliquefaciens* (Chowdhury et al., 2015). Además, la producción de estos lipopéptidos, generalmente contribuye a la motilidad de enjambre (desplazamiento multicelular rápido y organizado en superficies sólidas o semisólidas) y la capacidad de formar biopelícula (Fira et al., 2018). Esta matriz de biopelícula genera un ambiente en donde se da lugar el intercambio metabólico, así como también confiere protección contra factores adversos ambientales, como antibióticos (Kierek-Pearson & Karatan, 2005). La biopelícula se compone, principalmente, de exopolisacáridos, así como también se pueden encontrar proteínas y ADN, además, los exopolisacáridos son fundamentales para que la matriz pueda adherirse a superficies. Se sabe que la presencia de estos lipopéptidos promueve la colonización de plantas (Danhorn & Fuqua, 2007). Por ejemplo, *B. velezensis* KY498625 fue capaz de producir exopolisacáridos con diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, encontrando a través de cromatografía de gases a presencia de glucosa, galactosa y manosa como sus componentes monosacáridos (Moghannem et al., 2018).

Dentro de las formulaciones de biopesticidas, los miembros del género *Bacillus* son preferidos por la capacidad de producir una gran variedad de moléculas biológicamente activas, que inhiben el crecimiento de fitopatógenos, así como también, endosporas que les permite presentar alta viabilidad a largo plazo y obtener un producto comercialmente estable (Wu et al., 2015).

Las especies de *Bacillus* producen varias moléculas importantes como enzimas, vitaminas y metabolitos secundarios con los cuales pueden promover el crecimiento de las plantas. También, tienen la capacidad de producir dos sustancias antimicrobianas como bacteriocinas y lipopéptidos, sintetizadas de forma ribosomal y no ribosomal respectivamente (Chen et al., 2020).

2.8.1 Lipopéptidos bacterianos

Los lipopéptidos se sintetizan por grandes enzimas de forma no ribosomal por péptido sintetasas (NRPs) (Chowdhury et al., 2015). En ellos destaca su alta actividad antimicrobiana, baja toxicidad, actividades antivirales y antitumorales, biodegradabilidad y estabilidad a altas temperaturas. Las tres familias principales de lipopéptidos cíclicos son fengicina, iturina A y surfactina (Chen et al., 2020). Por otra parte, otros metabolitos secundarios son los productos naturales de policétidos (PKs), que también presentan actividad antimicrobiana y participan en la competencia con otros microorganismos (Wei et al., 2018). Algunos compuestos derivados del metabolismo secundario con actividad antimicrobiana se mencionan enseguida.

La fengicina es conocida por tener fuerte actividad antifúngica contra hongos filamentosos (Chen et al., 2018), consta de 10 residuos de aminoácidos y un ácido graso β -hidroxi. Su método de acción es dañar la estructura de la membrana celular fúngica y romperla (Bai et al., 2022). Las surfactinas son un grupo de tensioactivos microbianos lipopeptídicos con actividad antimicrobiana (Dmitrović et al., 2022). Además de esta actividad antimicrobiana tiene otras funciones biológicas, como hemólisis, antibiosis, antimicoplasma/chlamydia, acción antiviral e inhibición de la proliferación de células tumorales (Bai et al., 2022). El bacillaeno es un producto

natural híbrido PK/NRP que tiene actividad antibiótica sobre un amplio espectro de bacterias (Valenzuela-Ruiz et al., 2022). La bacilisina es un dipéptido antibacteriano que forma parte de la vía de síntesis ribosómica, el cual posee un amplio espectro antagónico contra bacterias y algunos hongos (Li et al., 2023). La bacilibactina es un sideróforo quelante del hierro sintetizado por péptidos sintasas no ribosomales, presenta alta afinidad para unirse competitivamente a los hierros solubles que son requeridos para el crecimiento y desarrollo de los patógenos, además de, al mismo tiempo contribuir en la nutrición de las plantas (Thomloudi et al., 2021). La subtilosina A es un péptido antimicrobiano aniónico macrocíclico producido por varias especies de *Bacillus*, es un antibiótico de amplio espectro, con efecto tanto en bacterias Gram-positivas como en Gram-negativas, aerobias y anaerobias, la cual se asocia con receptores membranales bacterianos conduciendo a la permeabilización membranal (Kamali et al., 2022). La macrolactina H es un grupo de antibióticos macrólidos que contienen un anillo de lactona de 24 miembros, es sintetizada por la policétido sintasa (PKs) y tiene actividad antibacteriana de amplio espectro contra bacterias (Yuan et al., 2016). La difficidina tiene actividad antagónica de amplio espectro contra bacterias (Li et al., 2021).

El biocontrol de fitopatógenos por *Bacillus* spp. a través de la secreción de lipopéptidos es considerada una técnica más segura para el medio ambiente (Chen et al., 2020). Múltiples reportes de *Bacillus* spp. con la capacidad de sintetizar sustancias antimicrobianas y antagonizar agentes fitopatógenos que causan enfermedades importantes en cultivos agrícolas han sido reportados (**Tabla 1**).

Tabla 1. Reportes de genes antimicrobianos de cepas de *Bacillus* con actividad de biocontrol.

Cepa	Fuente de aislamiento	Patógeno biocontrolado	Enfermedad producida	Huésped del patógeno	Predicción de los grupos de genes antimicrobianos conocidos más similares	Referencia
<i>B. paralicheniformis</i> TRQ65	Campos comerciales <i>Triticum turgidum</i> subsp. <i>durum</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	La mancha	Trigo	Bacitracin, bacillibactin, butirosin, lichenysin, haloduracin alpha, haloduracin beta	Valenzuela-Ruiz et al., (2019)
<i>B. velezensis</i> BY-2	Tejidos de las raíces internas de <i>Brassica napus</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Podredumbre blanca	Colza oleaginosa	Iturin, fengycin, surfactin, Bacillaeno, difficidin, bacilysin, macrolactin, bacillibactin	Mullins et al., (2020)
<i>B. velezensis</i> LM2303	Estiércol de <i>Bos mutus</i> salvaje	<i>Fusarium graminearum</i>	Tizón de la cabeza	Trigo	Plantathiazolicin, bacilysin, difficidin, Bacillaeno, macrolactin	Chen et al., (2018)
<i>B. subtilis</i> A-5	Natto casero	<i>Magnaporthe grisea</i>	Tizón del arroz	Arroz	Surfactin, fengycin, bacillibactin, subtilisin_a, and bacilysin	Bai et al., (2022)
<i>B. cabrialesii</i> TE3	Tejido interno de <i>Oryza sativa</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	La mancha	Trigo	Bacilysin, Bacillaeno, subtilisin A, bacillibactin, surfactin, fengycin, rhizoctin a	Villa-Rodríguez et al., (2021)
<i>Bacillus</i> sp. TS02	Suelos comerciales de <i>Triticum durum</i>	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	La mancha	Trigo	Fengycin, bacilysin, subtilisin A, bacillibactin, Bacillaeno, surfactin	Valenzuela-Ruiz et al., (2022)
<i>B. velezensis</i> Bvel1	Raíces de <i>Olea europaea</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	Bayas maduras	Surfactin, macrolactin, Bacillaeno, fengycin, difficidin, bacillibactin, bacilysin	Nifakos et al., (2021)
<i>B. atropheus</i> GQJK17	Rizosfera de <i>Lycium barbarum</i>	<i>Fusarium solani</i>	Raíz podrida	Goji	Surfactin, Bacillaeno, fengycin, pegipeptin, anthracimycin, xenocoumacin, bacillomycin, rhizoctin, bacillibactin	Ma et al., (2018)
<i>B. halotolerans</i> KLBC XJ-5	Muestra de suelo de <i>Fragaria</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	Fresa	Bacilysin, subtilisin A, fengycin, Bacillaeno, surfactin, bacillibactin	Wang et al., (2021)
<i>B. halotolerans</i> Cal.I.30	Tejido interno de <i>Calendula officinalis</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	Tomate	Surfactin, fengycin, Bacillaeno, bacilysin, subtilisin A, bacillibactin	Tsalgatidou et al., (2022)
<i>B. siamensis</i> strain LZ88	Suelo rizosférico de <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Alternaria alternata</i>	Mancha marrón tabaco	Tabaco	Surfactin, macrolactin H, Bacillaeno, fengycin, difficidin, bacillibactin, bacilysin, mersacidin	Wang et al., (2022)
<i>B. amyloliquefaciens</i> S917	Frutas y verduras frescas	<i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>brasiliense</i>	Podredumbre blanda	Pimiento picante	Bacillaeno, macrolactin H, bacilysin, bacillibactin	Li et al., (2023)
<i>B. amyloliquefaciens</i> GKT04	Raíz de <i>Musa paradisiaca</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> race 4	Necrosis vascular	Banano	Difficidin, bacillibactin, bacilysin, surfactin, plantazolicin, macrolactin H, Bacillaeno, fengycin	Tian et al., (2021)
<i>Bacillus</i> sp. 7PJ-16	Tallo de <i>Morus alba</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Esclerotiniosis de morera	Morera	Surfactin, fengycin, bacillibactin, sutilin, subtilisin A, bacilysin	Xu et al., (2019)

<i>B. safensis</i> QN1NO-4	Fruto de <i>Morinda citrifolia</i>	<i>Colletotrichum fragariae</i>	Antracnosis	Fresa	Bacillibactin, Bacillaeno, macrolactin, plantazolicin, kalimantacin	bacilysin, butirosin, fengycin, difficidin	Li et al., (2021)
<i>Bacillus</i> sp. SBA12	Muestras de suelo de tierras agrícolas	<i>Phytophthora infestans</i>	Tizón tardío	Papa	Petrobactin, bacillibactin, polyoxypeptin	fengycin	Salwan & Sharma, (2020)
<i>Bacillus</i> sp. LYLB4	Frutas de <i>Pyrus communis</i>	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	Formación de canchros	Pera	Bacillomycin, bacillibactin, macrolactin, Bacillaeno	bacilysin, difficidin	Wu et al., (2019)
<i>B. subtilis</i> 9407	Frutas de <i>Malus domestica</i>	<i>Acidovorax citrulli</i>	Mancha bacteriana del fruto	Melón	Bacilibactin, subtilisin A, fengycin, Bacillaeno, surfactin	bacilysin	Gu et al., (2021)
<i>B. amyloliquefaciens</i> Cas02	Suelo rizosférico de <i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i>	Marchitez de Granville	Tabaco	Surfactin, macrolactin H, fengycin, difficidin, bacillibactin, bacilysin	Bacillaeno	Chu et al., (2022)
<i>B. thuringiensis</i> CR71	Tejido interno de <i>Physalis ixocarpa</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	Tomate	Thusin, petrobactin		Flores et al., (2020)
<i>B. halotolerans</i> Hii4	Hojas de la planta medicinal <i>Hypericum hircinum</i>	<i>Botrytis cinerea</i>	Moho gris	Bayas de uva de mesa	Surfactin, mycosubtilin, bacillibactin, bacilysin, subtilisin A	Bacillaeno, fengycin	Thomloui et al., (2021)
<i>B. subtilis</i> Dcl1	Rizoma seco de <i>Curcuma longa</i>	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Antracnosis	Fresa	Surfactin, bacillibactin, Bacillaeno, bacilysin	iturin, fengycin	Jayakumar et al., (2021)

2.8.1.1 Importancia de los lipopéptidos en la motilidad y colonización bacteriana

El establecimiento de poblaciones bacterianas debe de ser suficiente y persistente para que pueda generar los efectos benéficos en la planta. Cada bioinoculante bacteriano tiene características singulares para proliferar y colonizar el sistema radicular. La colonización no exitosa es un factor limitante para el biocontrol. Las plantas, para reclutar PGPR secretan exudados radiculares como azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, nucleósidos, fitosideróforos y compuestos fenólicos que actúan como señales químicas para que las bacterias móviles migren hacia la superficie de la raíz (Wang et al., 2021). Además, se ha reportado en *Bacillus* que los lipopéptidos también influye en la motilidad, Cao et al., (2018) evaluaron la motilidad superficial de *B. velezensis* a través de la construcción de dos mutantes sencillas en los genes *ituA* y *fenC*, que codifican a iturina y fengicina, respectivamente, así como una mutante doble *ituA fenC*. Se observó un defecto

moderado en la motilidad de las mutantes sencillas, en la mutante doble, casi la totalidad de la motilidad se perdió, por lo que la presencia de estos lipopéptidos es requerida para una correcta función en *B. velezensis*.

La motilidad se atribuye, principalmente, a estructuras flagelares. Algunos genes involucrados en la motilidad de *B. subtilis* YB-15 son: *flgD*, *flgE*(*flgG*), *flgK*, *flgL*, *hag* (*fliC*), *fliD* para el anzuelo y el filamento; *fliH*, *flpP*, *fliI*, *fliR*, *fliQ*, *flhB* y *flhA* para la secreción de proteínas flagelares; *flgB*, *flgC* y *fliE* para la varilla proximal; *fliF*, *fliG*, *fliM* y *fliN*(*fliY*) para el anillo MS y C; *flgM*, *flgN*, *fliK*, *fliJ*, *flit* y *fliS* para otras proteínas flagelares; y *motA* y *motB* para el motor rotativo (Xu et al., 2022).

2.8.2 Compuestos orgánicos volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles (VOCs) son sustancias de bajo peso molecular, promueven el crecimiento vegetal de forma indirecta o directa, a través del antagonismo hacia fitopatógenos microbiológicos, así como en la inducción de resistencia sistémica en la planta (Verma et al., 2019) que incluyen aldehídos, alcoholes, cetonas, hidrocarburos, indoles, derivados de ácidos grasos, terpenos y jasmonatos. Especies del género *Bacillus* se encuentran dentro de la lista de bacterias reportadas como productoras de VOCs (Velasco-Jiménez et al., 2020).

Un ejemplo de promoción del crecimiento vegetal de manera indirecta a través de VOCs se puede observar en *B. megaterium*, que tiene la capacidad de generar amoníaco, una sustancia que reprime el crecimiento del fitopatógeno *F. oxysporum* (Verma et al., 2019). También se encuentran otros VOCs con actividad antifúngica, como el ácido cianhídrico (HCN), dimetildisulfuro (DMSD) y *N*, *N*-dimetil hexadecilamina (DMHDA). Además, pueden suprimir la germinación de esporas de varios fitopatógenos fúngicos (Santoyo et al., 2019).

2.8.3 Enzimas líticas

Las enzimas líticas desempeñan un papel significativo tanto en el control biológico de hongos como en el proceso de reciclaje de nutrientes mediante la descomposición de materia orgánica, lo que a su vez incrementa la disponibilidad de nutrientes en la rizosfera (Manoj et al., 2020). Algunas enzimas líticas producidas

por *Bacillus* spp. son las quitinasas, glucanasas, proteasas y lipasas, las cuales lisan células fúngicas (Saeed et al., 2021). Con respecto al biocontrol de hongos, las quitinasas, glucanasas y proteasas actúan en las paredes celulares fúngicas que están compuestas principalmente por polisacáridos como β -1,3-glucano, quitina y materiales fibrilares unidos por azúcares, proteínas y lípidos (Manoj et al., 2020). La bacteria de *Bacillus* sp. que produce β -1,3-glucanasa ha demostrado un efecto antagonista contra varios patógenos, incluyendo *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Pythium ultimum* (Singh, 2018).

2.8.4 Competencia por espacio y nutrientes

Otro mecanismo es la competencia por espacio y nutrientes en el cual los agentes antagonistas deben de crecer y adaptarse al ambiente de una forma más rápida que los patógenos, aun cuando los nutrientes se encuentren limitados, por ejemplo, en el espacio de una herida en un fruto (Chen et al., 2020). Es un mecanismo indirecto y se fundamenta en las necesidades nutricionales, tanto del antagonista como del patógeno (Di Francesco et al., 2017). Este proceso desempeña una función crucial en la estrategia de biocontrol de patógenos vegetales, ya que las bacterias no patógenas compiten con los patógenos por los nutrientes orgánicos, lo que les permite crecer y mantenerse viables (Srivastava et al., 2021; Verma et al., 2019). A menudo, se tiende a confundir la competencia por nutrientes y la competencia por espacio como términos intercambiables, pero, en realidad, existe una distinción fundamental entre ambas. En la competencia por nutrientes, no es necesario que haya un contacto directo entre el antagonista y el agente patógeno, mientras que, en la competencia por espacio, dicho contacto es esencial (Di Francesco et al., 2017).

2.9 *Bacillus* con capacidad de crecer en temperaturas dentro del rango termófilo

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 segundos destaca la temperatura. La mayoría de las bacterias son capaces de

proliferar en el rango mesófilo (30-45 °C), mientras que aquellas bacterias capaces de crecer a temperaturas altas se les conoce como bacterias termófilas, éstas tienen su temperatura óptima de crecimiento por encima de los 45 °C (Merino et al., 2019). Por otro lado, aquellas bacterias que tienen su temperatura óptima de crecimiento en el rango mesófilo, pero pueden crecer por encima de los 45 °C, se clasifican como termotolerantes (Aabed et al., 2021).

Se han reportado bacterias pertenecientes al género *Bacillus* aisladas de diversos ambientes con la capacidad de tolerar temperaturas por encima del rango mesófilo: *B. licheniformis* ICHB5 (55 °C) aislada de aguas termales (Tamariz-Angeles et al., 2020), *B. licheniformis* LH(X-9) (60 °C) aislada de agua residual de campo petrolífero (Huang et al., 2019), *B. paralicheniformis* SO-1 (60 °C) aislada de sedimento marino (Makled et al., 2019), *B. pumilus* 10104 (55 °C) aislada de aguas termales (Hedreyda & Monsalud, 2017), *B. subtilis* CM1 (50 °C) aislada de estiércol de vaca (Swain et al., 2012), *B. altitudinis* KP-14 (50 °C) aislada de suelo contaminado por metales (Pranaw et al., 2020), *B. cereus* TCR17 (50 °C) aislada de muestra de suelo (Bruno et al., 2020) y *Bacillus* sp. WF67 (60 °C) aislada de composta (Ahmad et al., 2018).

El uso de PGPB termotolerantes sería una herramienta importante para contrarrestar o amortiguar los efectos del estrés por calor en plantas, lo que les permitiría a los cultivos hacer frente al inminente aumento de la temperatura global. De esta forma se podría aumentar el crecimiento y la productividad agrícola bajo situaciones de estrés por calor (Khan et al., 2020b).

2.9.1 Cambios en la composición de lípidos de membrana

Los efectos que provoca la alta temperatura en células bacterianas incluyen el daño a la membrana celular, alterando su permeabilidad, que en casos severos puede provocar la fuga del contenido citoplasmático y la incapacidad de bombear metabolitos y macromoléculas esenciales al interior de la célula y evitar la entrada de solutos indeseables del entorno externo, así como, la degradación de ARN, daño al ADN, desnaturalización de proteínas y la inactivación de enzimas (Russell, 2003).

Como respuesta a este estrés, las bacterias buscan contrarrestar o evitar los efectos negativos a través de la síntesis de proteínas de choque térmico, así como también la modificación en la composición lipídica de la membrana (Horváth et al., 2012).

La membrana celular es una barrera física que delimita el espacio intracelular del espacio extracelular, es de naturaleza anfipática, mantiene metabolitos y macromoléculas dentro de la célula e impide la entrada de ciertas moléculas que pueden ser dañinas, además, permite un intercambio regulado de sustancias entre el exterior y el interior celular a través proteínas específicas (López-Lara et al., 2003; Mrozik et al., 2004). La membrana está compuesta por una bicapa lipídica, en donde los glicerofosfolípidos son los componentes más abundantes (Geiger et al., 2010).

Las membranas están integradas por lípidos anfifílicos que se conforman de glicerofosfolípidos, dos ácidos grasos, un grupo glicerol, un grupo fosfato y un grupo cabeza variable. La fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), lisil-fosfatidilglicerol (LPG), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilserina (PS), son ejemplos de glicerofosfolípidos (Sohlenkamp & Geiger, 2015). Sin embargo, también se pueden encontrar lípidos de membrana libres de fósforo, como glicolípidos, sulfolípidos, lípidos de betaína o lípidos que contienen ornitina, lo que se da, principalmente, cuando la bacteria se encuentra en condiciones limitantes de este nutriente (Geiger et al., 2010). En *B. subtilis*, el lipidoma se compone de aproximadamente 70 % de fosfolípidos y 30 % de glucolípidos. De los fosfolípidos, PE y PG son los más abundantes, seguido de la CL y LPG en menor abundancia (Willdigg & Helmann, 2021).

La membrana, al ser la responsable de la permeabilidad celular, sufre modificaciones en sus componentes bajo situaciones de estrés ambiental, y la supervivencia de la célula está definida por la capacidad de adaptación a través de estas modificaciones membranales (Rojas-Solis et al., 2020b). Dentro de las modificaciones que sufre se encuentra un incremento en la CL, este fosfolípido tiene un papel importante en la adaptación de la membrana celular al ambiente (Rojas-Solis et al., 2023).

Las bacterias modifican sus componentes de membrana a través de dos estrategias: i) la modificación de la naturaleza química de los componentes de membrana con el fin de obtener propiedades distintas, este mecanismo suele actuar como respuesta rápida, por ejemplo, el lípido de membrana aniónico PG modificado a lípido de membrana catiónico (LPG) o zwitteriónico (APG), que le confiere resistencia a péptidos catiónicos y antibióticos; ii) el reemplazo de lípidos existentes por nuevos lípidos con nuevas características distintas, a través de la degradación y síntesis *de novo* respectivamente (Sohlenkamp & Geiger, 2015).

Haque & Russell (2004), evaluaron la composición de fosfolípidos y ácidos grasos de varias cepas de *B. cereus* a 15 y 37 °C, encontrando mayor abundancia de PG y menor abundancia de PE a 37 °C. Por otro lado, la cantidad de ácidos grasos saturados a 37 °C fue 19.6 veces mayor a la cantidad encontrada a 15 °C, esta modificación les permite mantener la fluidez membranar. También se observó en *Bradyrhizobium* sp. TAL1000 un comportamiento similar, la cepa fue evaluada a 28 y 37 °C, encontrando que la proporción de ácidos grasos saturados aumentó a 37 °C, mientras que los ácidos grasos monoinsaturados disminuyeron a esta temperatura (Paulucci et al., 2011).

2.10 Incendios subterráneos como fuente de bacterias termotolerantes

Los incendios subterráneos se distinguen por su capacidad para consumir materia orgánica y las raíces de las plantas bajo la superficie terrestre. Se originan cuando la materia orgánica bajo tierra se enciende debido a la presencia de calor y oxígeno proveniente del entorno y su duración puede extenderse a varios meses o incluso años (Song et al., 2019). En su fase inicial, su detección puede resultar complicada, pero una vez localizados, apagar completamente estos incendios se convierte en una tarea sumamente ardua, incluso imposible (Li et al., 2018). Su detección se lleva a cabo mediante la observación de indicios como grietas, fisuras, hundimientos, cambios térmicos anómalos y la degradación de la vegetación en la superficie (Song & Kuenzer, 2014).

El suelo que se encuentra entre el incendio subterráneo y el exterior exhibe un gradiente de temperatura, con calor más elevados en las proximidades del incendio y temperaturas más bajas en la zona cercana al exterior (Flores-Piña, 2021). En este entorno termófilo, las bacterias que podrían estar presentes pueden haber desarrollado estrategias de supervivencia singulares para obtener ventajas competitivas. Esto podría abrir la puerta a un potencial recurso sin explorar de compuestos antifúngicos que podrían utilizarse en el control biológico de hongos fitopatógenos en cultivos agrícolas (Santos et al., 2020).

Flores-Piña (2021), a partir de muestras de suelos afectados por incendios subterráneos en la comunidad de pueblo viejo, municipio de Venustiano Carranza, Michoacán, realizó el aislamiento de 400 bacterias, las cuales pertenecieron a dos phyla, principalmente, Firmicutes y Actinobacteria, siendo el primero el más abundante. No obstante, también observó que, en las muestras de suelo expuestas a mayor temperatura, la abundancia del phylum Firmicutes fue mayor.

2.11 Aislados bacterianos provenientes de muestras de suelo de incendios subterráneos con actividad antagónica hacia hongos fitopatógenos

Diversas cepas de *Bacillus* aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos de la comunidad de Pueblo Viejo, Michoacán, mostraron actividad antagónica *in vitro* sobre los hongos fitopatógenos *B. cinerea*, *G. candidum*, *Botrytis* sp. y *F. brachygibbosum* (**Tabla 2**).

Los ensayos de antagonismo que corresponden a *B. cinerea* y *G. candidum* fueron reportados por Valencia-Marín (2021), mientras que los ensayos de antagonismo hacia *Botrytis* sp. y *F. brachygibbosum* los reportó Chávez-Avila (2021), donde se encontró que la cepa *B. velezensis* AF12 fue la única que inhibió el crecimiento micelial de *F. brachygibbosum*.

Tabla 2. Actividad antagónica de aislados de *Bacillus* provenientes de suelos afectados por incendios subterráneos hacia hongos fitopatógenos.

Cepa	Porcentajes de inhibición del crecimiento micelial (%)			
	<i>G. candidum</i>	<i>Botrytis sp.</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>F. brachygibbosum</i>
<i>B. licheniformis</i> AF01	33.4	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> AF02	29.7	-	-	-
<i>B. halotolerans</i> AF03	34.7	34.4	33.5	-
<i>B. halotolerans</i> AF04	30.6	36.7	25.4	-
<i>B. halotolerans</i> AF05	34.2	35.1	32.8	-
<i>B. halotolerans</i> AF06	33.5	-	-	-
<i>B. halotolerans</i> AF07	40.5	-	24.4	-
<i>B. halotolerans</i> AF08	35.5	17.3	-	-
<i>B. haynesii</i> AF09	22.1	-	-	-
<i>B. halotolerans</i> AF10	36.2	29.1	-	-
<i>B. velezensis</i> AF12	41.9	52.6	44	18.2
<i>B. haynesii</i> AF13	18.5	-	-	-
<i>B. licheniformis</i> AF14	17	-	-	-
<i>Bacilo sp.</i> AF15	26.3	-	-	-
<i>B. halotolerans</i> AF23	33	40.2	42.7	-
<i>Bacilo sp.</i> AF25	19.4	-	-	-
<i>B. aryabhattai</i> AF27	9.8	-	-	-
<i>B. halotolerans</i> AF29	29.2	51.4	46.3	-

La actividad antagónica de la cepa de *B. velezensis* AF12 destacó contra los hongos *G. candidum*, *Botrytis sp.* y *B. cinerea*, además de que fue la única cepa, de la colección de *Bacillus*, que inhibió el crecimiento micelial de *F. brachygibbosum*. El genoma de esta cepa se encuentra secuenciado (BioProject: PRJNA224116) y se compone de 52 contigs, conformados por un total de 3,995,228 pb y 3,673 secuencias codificantes de proteínas. También se identificaron *in silico* grupos de genes involucrados en el metabolismo secundario con actividad antimicrobiana y se observó que AF12 presenta alta similitud con bacilisina, bacilibactina, difcidina, bacillaeno y macrolactina H, con un porcentaje de similitud del 100 %. También se encontraron genes con una similitud del 93 % al grupo conocido de fengicina, el cual posee actividad antifúngica (Chávez-Avila, 2021).

Al observar que cepas de *Bacillus* mostraron antagonismo contra diversos hongos fitopatógenos, y que una de ellas (*B. velezensis* AF12) tiene la maquinaria genómica para antagonizar patógenos, nos preguntamos si esta actividad se mantiene a mayor temperatura y si suceden cambios en la composición de lípidos de membrana y actividad antagónica a nivel de poblaciones de *Bacillus* termotolerantes y termosensibles. Este fue el punto de partida del presente proyecto de investigación.

3. JUSTIFICACIÓN

El aumento en la temperatura mundial causada en parte por el efecto del calentamiento global favorece la propagación y el ataque de fitopatógenos hacia los cultivos, afectando el crecimiento de las plantas y su producción. Por lo tanto, se requieren estrategias para mitigar los efectos adversos antes mencionados, como el uso de biofungicidas bacterianos. En particular, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal del género *Bacillus* presentan una alta tolerancia al estrés térmico, exhibiendo diversos mecanismos de tolerancia. Develar dichos mecanismos en poblaciones de *Bacillus*, particularmente en aquellas termotolerantes, así como sus mecanismos de antagonismo y protección vegetal, permitirá seleccionar las cepas con mayor potencial fungicida en sistemas de producción agrícola en regiones donde existen altas temperaturas y son susceptibles a altas temperaturas.

4. HIPÓTESIS

Poblaciones termotolerantes de especies de *Bacillus* modifican sus componentes lipídicos de membrana y mantienen sus actividades antifúngicas bajo estrés térmico.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Comparar la acción antifúngica y los componentes lipídicos de membrana de cepas de *Bacillus* spp. bajo condiciones de estrés térmico.

5.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar taxonómicamente cepas de *Bacillus* spp. tolerantes y sensibles a la temperatura (50 °C).
2. Evaluar el antagonismo por las cepas de *Bacillus* spp. hacia los hongos patógenos *Botrytis cinerea*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium brachygibbosum* y *Botryosphaeria rhodina* bajo diferentes temperaturas de incubación (28, 32, 35 y 37 °C).
3. Determinar la cinética de crecimiento de cepas antagonistas de *Bacillus* spp. termotolerantes y termosensibles a diferentes temperaturas (32, 37, 40 y 50 °C).
4. Comparar el perfil de lípidos de membrana en especies antifúngicas de *Bacillus* termotolerantes y termosensibles en condiciones de estrés térmico.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

6.1.1 Aislados bacterianos

Los aislados bacterianos provienen de un muestreo previo realizado en la comunidad de Pueblo Viejo, municipio de Venustiano Carranza, Michoacán. Las muestras de suelo fueron tomadas a diferentes profundidades de zonas perturbadas por incendios subterráneos en donde la temperatura del suelo se encontraba entre 42 y 58 °C, así como también de muestras de suelo sin perturbación (Flores-Piña, 2021). El mantenimiento se realizó a través de resiembras cada 21 días en agar nutritivo (AN), se incubaron a 30 °C por 24 h, posteriormente, se resguardaron a 4 °C. También se realizaron stocks en glicerol al 30 % y se resguardaron a -20 °C.

6.1.2 Cepas fúngicas

Las cepas empleadas provienen de un aislamiento previo realizado de frutos de *Fragaria × ananassa* en estado de descomposición y fueron identificadas como *B. cinerea* 62BCV, *F. brachygibbosum* 4BF, *G. candidum* FRB y *Botrytis* sp. 62C (Morales-Cedeño et al., 2021). El mantenimiento se realizó a través de resiembras cada 21 días en agar papa dextrosa (APD), se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad por 3-5 días, posteriormente, fueron resguardadas a 4 °C.

6.2 Obtención de los nuevos aislados de suelos afectados por incendios subterráneos

Se tomaron fragmentos de agar de cultivos bacterianos resguardados a 4 °C y se transfirieron a matraces con caldo nutritivo (CN), se incubaron a 28 °C con agitación constante (150 rpm) hasta que los medios presentaran signos de crecimiento bacteriano, cuando esto sucedió, se inocularon 20 µL de la suspensión en placas con AN y se incubaron a 28 °C hasta que fuese visible el crecimiento bacteriano. Finalmente se realizaron resiembras con las mismas condiciones de incubación y las bacterias fueron resguardadas a 4 °C.

6.3 Evaluación de termotolerancia

A partir de cultivos frescos en placa, se realizaron dos resiembras por bacteria en AN, se incubaron por 24 h, una a 28 °C y la otra 50 °C. La temperatura de 50 °C fue elegida debido a que se encuentra fuera del rango mesófilo, que abarca de 20 a 45 °C (Merino et al., 2019).

6.4 Identificación taxonómica por secuenciación del gen ARNr 16S de los nuevos aislados

6.4.1 Extracción de ADN genómico

A partir de cultivos frescos, se realizó la extracción de ADN genómico (ADNg) siguiendo el protocolo de Mahuku (2004). Se verificó la integridad y calidad del ADN a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1 % a 100 V por 20 min y con lecturas en un microespectrofotómetro NanoDrop constatando una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1.8, respectivamente. Como colorante en la electroforesis se utilizó Blue/Orange (Promega, Madison, WI, EE. UU.). El ADNg fue resguardado a -20 °C.

6.4.2 Amplificación por PCR del gen ribosomal ARN 16S

Con los ADNg extraídos anteriormente, se realizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar el gen ribosomal ARN 16S empleando los oligonucleótidos fD1 (5' – CAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG – 3') y rD1 (5' – AAG GAG GTG ATC CAG CC – 3') (Weisburg et al., 1991) a un volumen final de 50 µL (1 µL – FD1, 1 µL – RD1, 1 µL – ADNg, 22 µL – H₂O dd, 25 µL – Green Master Mix). 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 repitieron 30 ciclos) (X = tiempo hasta que se sacara la muestra). Se verificó la integridad y calidad del ADN a través de una electroforesis en gel de agarosa al 2 % a 80 V por 60 min y con lecturas en un microespectrofotómetro NanoDrop, constatando una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1.8, respectivamente. Como colorante en la electroforesis se utilizó Blue/Orange (Rojas-Solís et al., 2018). Los productos de PCR fueron resguardados a -20 °C.

6.4.3 Secuenciación e identificación taxonómica de los amplicones ARN 16S

Las muestras de los productos de PCR se enviaron a Macrogen, empresa biotecnológica ubicada en Corea, para su secuenciación. Con estos resultados se observó cada cromatograma para verificar la correcta secuenciación empleando el programa Mega versión 7.9. Finalmente, se realizó la identificación parcial 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>).

Una vez obtenido el panorama de las posibles especies con las que se contaban, se seleccionaron aquellas pertenecientes al género *Bacillus*, con las cuales se realizaron posteriores análisis y ensayos.

6.5 Filogenia de las 49 cepas de *Bacillus* spp.

Se construyó una filogenia con las secuencias de los genes ARNr 16S de las 49 aislados de *Bacillus* a una máxima verosimilitud con 1,000 bootstraps usando el programa Mega versión 7.9 (Kumar et al., 2016) utilizando a *Escherichia coli* ATCC 11775 como grupo externo. Además, se colocaron identificadores que permiten distinguir entre cepas termotolerantes y termosensibles.

6.6 Escrutinio de la actividad antagónica de los nuevos aislados de suelos afectados por incendios subterráneos hacia hongos fitopatógenos

La actividad antagónica de los nuevos aislados de *Bacillus* (AF41-AF68) hacia los hongos fitopatógenos *B. cinerea*, *Botrytis* sp. *F. brachygibbosum*, *G. candidum* y *B. rhodina* se realizaron a través de ensayos de confrontación directa en placas con APD. Los ensayos se realizaron de la misma forma que los realizados por Hernández-León et al., (2015). Brevemente: la bacteria se inoculó en forma de cruz en una placa Petri con APD generando 4 cuadrantes. En el centro de cada cuadrante se inoculó un fragmento circular de agar-micelio del hongo. Como control, únicamente se inoculó el hongo. Finalmente, se incubaron en oscuridad a

temperatura ambiente hasta que el crecimiento micelial de la placa control abarcara la totalidad de la superficie.

Se calcularon los porcentajes de inhibición (Guevara-Avendaño et al., 2020) y se seleccionaron aquellos que inhibieron el crecimiento micelial para un análisis de comparación de medias (ANOVA) y *post hoc* Duncan con un nivel de significancia de 0.05.

Una vez obtenido el panorama la actividad antagonica de las 49 aislados de *Bacillus* se seleccionaron 8 cepas bajo los siguientes criterios: 1) cuatro que fuesen termotolerantes y cuatro termosensibles; 2) que tuvieran actividad antagonica hacia los hongos evaluados; y 3) que fueran especies de *Bacillus* diferentes. Con los 8 aislados seleccionados se realizaron posteriores análisis y ensayos.

6.7 Cinéticas de crecimiento de las *Bacillus* spp. seleccionadas

Se evaluó el crecimiento de las cepas de *Bacillus* seleccionadas a las 6, 12, 28, 24, 36 y 48 h. Se partió de cultivos bacterianos incubados en agitación constante a 150 rpm a 30 °C. Una vez que los cultivos alcanzaron una densidad óptica (D.O.) de 0.1 (590 nm), se colocaron 500 µL en un volumen de 4.5 mL de CN (volumen final de 5 mL), los cuales fueron incubados a 150 rpm a 30, 37, 40 y 50 °C durante 48 horas. Finalmente, se midió la absorbancia a 590 nm (Uddin et al., 2017).

6.8 Evaluación de termosensibilidad de los fitopatógenos fúngicos

Partiendo de un cultivo fresco de hongo, se inoculó un fragmento en el centro de una placa nueva con APD. Las placas se incubaron a 28, 32, 35 y 37 °C hasta que el crecimiento micelial de la placa de 28 °C abarcara la totalidad de la superficie (Wu et al., 2019).

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de comparación de medias (ANOVA) y *post hoc* Duncan con un nivel de significancia de 0.05.

Después de observar los distintos crecimientos en las temperaturas evaluadas, se procedió a la evaluación el antagonismo a diferentes temperaturas.

6.9 Evaluación de la actividad antagónica a 28, 32, 35 y 37°C

Los ensayos se realizaron de la misma forma que en el escrutinio de la actividad antagónica anteriormente descrita. Cada temperatura se conformó de un control (en el cual no se inoculó bacteria) y los tratamientos (en presencia con las cepas seleccionadas). La incubación se realizó a 28, 32, 35 y 37 °C y las mediciones se registraron cuando el crecimiento micelial de la placa control incubada a 28 °C abarcó la totalidad de la superficie de la placa Petri.

6.10 Obtención del perfil de lípidos de membrana

6.10.1 Preparación de células bacterianas para extracción de lípidos

Se prepararon cultivos bacterianos en 25 mL de medio CN, los cuales se ajustaron a una densidad óptica (D.O.) de 0.1. Se transfirió 1 mL a un tubo Eppendorf y se le adicionó 0.5 µCi de [1-14C] acetato (Amersham Biosciences). Posteriormente, los cultivos bacterianos se incubaron a 30, 37 y 40 °C (ambas poblaciones) y a 50 °C (solo la población termotolerante), durante 24 horas con agitación constante (150 rpm). Se concentraron las células por centrifugación a 6000 rpm durante 10 min a 4 °C. Los pellets formados se lavaron con agua, y finalmente, se resuspendieron en 100 µL de agua destilada estéril (Rojas-Solis et al., 2020b).

6.10.2 Extracción de lípidos de membrana, TLC y cuantificación

Los lípidos bacterianos se extrajeron utilizando un sistema de cloroformo/metanol/agua. Se añadieron 375 µL de metanol:cloroformo (2:1, v/v) a las células bacterianas suspendidas y la mezcla se agitó con vórtex. Posteriormente, se añadieron 125 µL de agua destilada estéril y cloroformo con el fin de obtener la separación en dos fases. En la fase orgánica inferior se encontraban los lípidos, por lo cual, esta fue transferida a un tubo nuevo. Se eliminaron los disolventes de la muestra con N₂. Para resuspender los lípidos, se agregaron 50 µL de cloroformo/metanol 1:1 (v/v). Se colocaron alícuotas de 20 µL de los lípidos

obtenidos en placas cromatografía de capa fina de alto rendimiento (HPTLC por sus siglas en inglés) de gel de sílice 60 (Merck, Pool, Reino Unido). Una vez que la placa se secó, los lípidos se separaron por cromatografía de capa fina (TLC) de una dimensión usando como solventes cloroformo/metanol/ácido acético glacial (130:50:20, v/v/v). Los fosfolípidos radiactivos se expusieron a una pantalla de PhosphorImager (Amersham Biosciences). Finalmente, la pantalla fue observada en un equipo PhosphorImager y con el software ImageQuant (Amersham Biosciences) se realizó la cuantificación de los lípidos individuales (Rojas-Solis et al., 2020b).

6.11 Análisis estadísticos

Los experimentos se repitieron al menos tres veces, y los resultados fueron analizados utilizando el software Statistica 8.0 mediante un ANOVA de una vía, seguido de la comparación de medias a través de la prueba de Duncan ($p \leq 0.05$).

7. RESULTADOS

7.1 Identificación de nuevas cepas aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos

Los nuevos 26 aislados provenientes de muestras de suelos afectados por incendios subterráneos fueron parcialmente identificados por secuenciación del gen ARNr 16S, resultando en 21 pertenecientes al género *Bacillus*, así como también 4 que pertenecieron al género *Paenibacillus* y 1 a *Leifsonia*. Todos ellos obtuvieron un porcentaje mayor a 97 % de similitud en sus secuencias del gen ARNr 16S, obtenidos a través del análisis BLAST de NCBI (**Tabla 3**).

Para algunos de estos aislados no fue posible su identificación a nivel de especie, ya que las secuencias de sus genes ARNr 16S obtuvieron el mismo porcentaje de identidad con más de una especie. Estos aislados fueron: AF41, AF53, AF56, AF62, AF64 y AF65. La cepa AF41 se relaciona con *B. megaterium* ATCC 14581 y *B. aryabhatai* B8W22 con un 98.14%; las cepas AF53, AF56 y AF62 se relacionan con *B. thuringiensis* IAM 12077 y *B. toyonensis* BCT-7112 con un 99.24%, 97.87% y 99.16% respectivamente; la cepa AF64 y AF65 se relacionan con *B. jeotgali* YKJ-10 y *B. subterraneus* COOI3B con un 99.15% y 99.44% respectivamente. Los resultados de los análisis BLAST solo de 6 aislados se muestran en la **Tabla S1**.

A los 21 aislados pertenecientes al género *Bacillus*, recientemente identificados se le sumaron los 28 aislados, también pertenecientes al género *Bacillus* (AF01-AF40) de aquellos identificados previamente (Valencia-Marín, 2021; Chávez-Avila, 2021), resultando en un total de 49 aislados de *Bacillus*, a los cuales se les evaluó su termotolerancia.

Tabla 3. Identificación de los nuevos aislados provenientes de muestras de suelos afectados por incendios subterráneos. La identificación fue realizada a través de la comparación de sus secuencias del gen ARNr 16S en la base de datos pública de NCBI con la herramienta nucleotide BLAST.

Aislado	Cepa de referencia	Porcentaje de identidad	No. Acceso
AF41	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
AF42	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa MPA 1034	98.20%	NR_117946.1
AF43	<i>Bacillus megaterium</i> cepa ATCC 14581	98.91%	NR_117473.1
AF45	<i>Bacillus simplex</i> cepa NBRC 15720 = DSM 1321	98.32%	NR_112726.1
AF46	<i>Bacillus zanthoxyli</i> cepa 1433	98.08%	NR_164882.1
AF47	<i>Paenibacillus susongensis</i> cepa M327	98.04%	NR_134118.1
AF48	<i>Leifsonia lichenia</i> cepa 2Sb	97.82%	NR_112644.1
AF49	<i>Bacillus megaterium</i> cepa ATCC 14581	97.96%	NR_117473.1
AF50	<i>Bacillus cereus</i> cepa ATCC 14579	97.37%	NR_074540.1
AF51	<i>Bacillus velezensis</i> cepa CBMB205	98.73%	NR_116240.1
AF52	<i>Bacillus velezensis</i> cepa FZB42	98.35%	NR_075005.2
AF53	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
AF54	<i>Bacillus megaterium</i> cepa ATCC 14581	98.26%	NR_117473.1
AF55	<i>Bacillus velezensis</i> cepa FZB42	98.43%	NR_075005.2
AF56	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
AF57	<i>Bacillus pseudomycooides</i> cepa NBRC 101232	97.10%	NR_113991.1
AF58	<i>Bacillus pseudomycooides</i> cepa NBRC 101232	97.41%	NR_113991.1
AF59	<i>Bacillus velezensis</i> cepa CBMB205	97.75%	NR_116240.1
AF60	<i>Bacillus simplex</i> cepa NBRC 15720 = DSM 1321	98.07%	NR_112726.1
AF61	<i>Paenibacillus susongensis</i> cepa M327	98.55%	NR_134118.1
AF62	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
AF64	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
AF65	<i>Bacillus</i> sp.	-	-
AF66	<i>Paenibacillus susongensis</i> cepa M327	98.22%	NR_134118.1
AF67	<i>Paenibacillus susongensis</i> cepa M327	98.54%	NR_134118.1
AF68	<i>Bacillus pumilus</i> cepa CIP 52.67	99.32%	NR_115334.1

7.2 Evaluación de la termotolerancia de los aislados de *Bacillus* y su filogenia.

Los ensayos de termotolerancia en placas con AN mostraron una mayor cantidad de aislados termosensibles (**Figura 1**), con respecto a los aislados termotolerantes (**Figura 2**), con 27 y 22 aislados respectivamente. Dentro de los aislados termosensibles se encontraron las posibles especies *B. megaterium*, *B. zanthoxyli*,

B. aryabhatai, *B. simplex*, *B. niacini*, *B. shackletonii*, *B. cereus* y *B. pseudomycoides*. Por otra parte, en los aislados termotolerantes encontramos a las posibles siguientes especies: *B. velezensis*, *B. halotolerans*, *B. haynesii*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. pumilus*.



Figura 1. Aislados termosensibles cultivados en placas de AN. Las resiembras de los aislados fueron incubadas a 30 y 50 °C.



Figura 2. Aislados termotolerantes cultivados en placas de AN. Las resiembras de los aislados fueron incubadas a 30 y 50 °C.

Con las secuencias de los genes 16S de los 49 aislados de *Bacillus* se realizó una filogenia con máxima verosimilitud a 1,000 bootstraps con el programa de Mega 7.9,

en el cual se utilizó a *Escherichia coli* ATCC 11775 como grupo externo. Además, se colocaron indicadores circulares basados en su termotolerancia, siendo el color naranja para aquellos aislados termotolerantes y el color gris para aquellos aislados termosensibles (**Figura 3**). La filogenia permitió observar dos grupos marcados notablemente, uno donde se agrupan las cepas termotolerantes y otro donde se agrupan las cepas termosensibles.

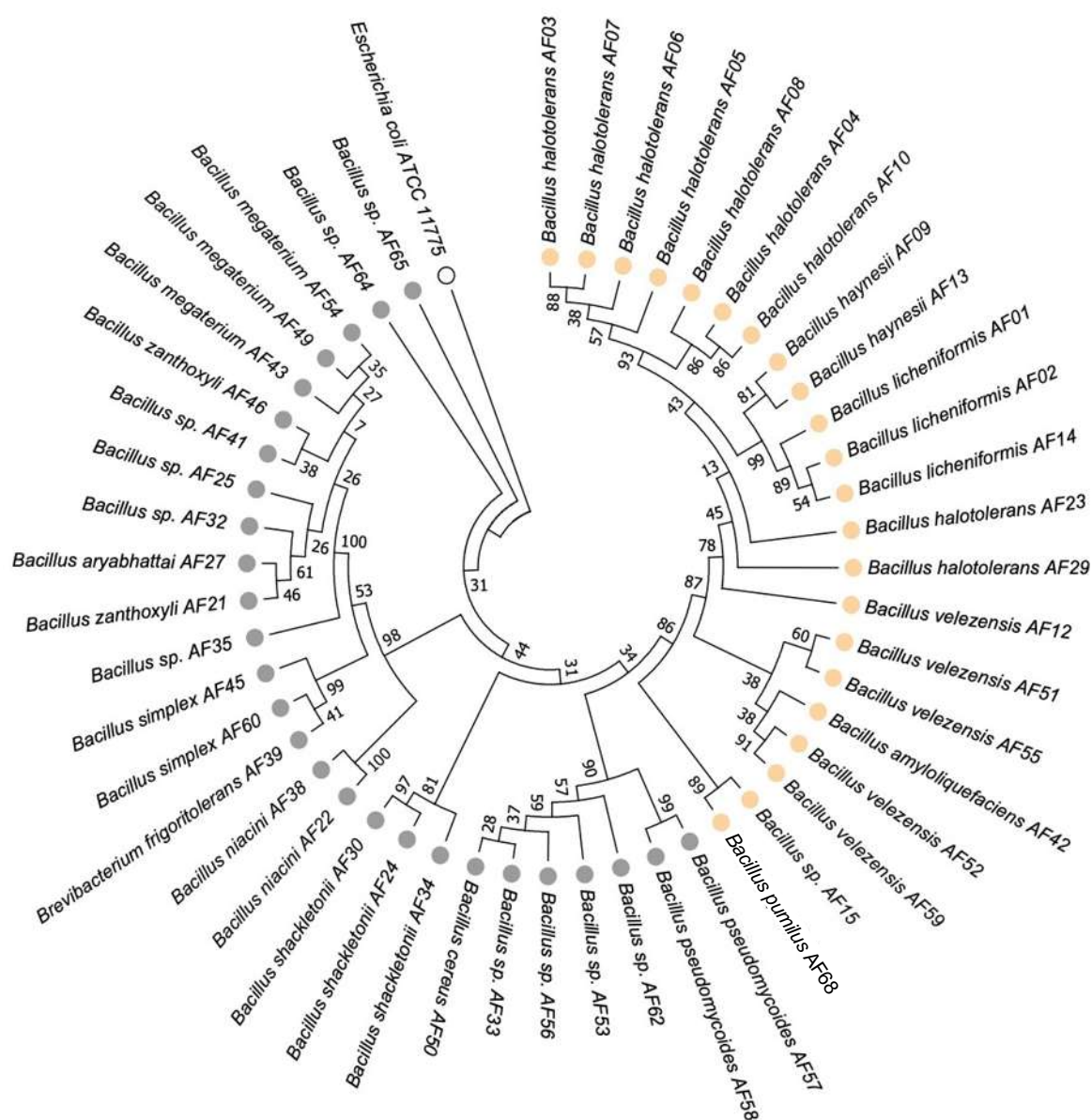


Figura 3. Árbol filogenético del gen ribosomal ARN 16S de los 49 aislados de *Bacillus*. *E. coli* ATCC 11775 se usó como grupo externo. Análisis realizado en Mega versión 7.9 con máxima verosimilitud a 1,000 bootstraps.

7.3. Escrutinio de la actividad antagónica de las 49 cepas de *Bacillus* spp.

En los ensayos de antagonismo realizados a temperatura ambiente se observó actividad antagónica por algunos de los aislados pertenecientes a *Bacillus* (**Figura 4**).

Con *G. candidum*, 5 aislados termosensibles mostraron actividad antagónica, de los cuales, los mejores antagonistas fueron *Bacillus* sp. AF56 y *Bacillus* sp. AF62, sin embargo, los aislados *Bacillus* sp. AF25, *B. aryabhattai* AF27 y *Bacillus* sp. AF53 también mostraron esta actividad. De parte de los aislados termotolerantes, 22 aislados mostraron actividad antagónica, entre ellos, *B. halotolerans* AF07, *B. velezensis* AF12 y *B. velezensis* AF52. Otros aislados termotolerantes también mostraron esta actividad, como *B. halotolerans* AF23 y *B. amyloliquefaciens* AF42, por mencionar algunos.

En el caso del hongo *F. brachygibbosum*, 3 aislados termosensibles antagonizaron a este fitopatógeno, entre ellos, *Bacillus* sp. AF56 y *Bacillus* sp. AF62, también, *Bacillus* sp. AF53 mostró antagonismo, aunque en un menor porcentaje de inhibición. Por otro lado, 8 aislados termotolerantes mostraron antagonismo, de éstos, la cepa *B. velezensis* AF52 destacó por generar un mayor porcentaje de inhibición (34.78 %). Dentro de las cepas que también mostraron antagonismo se encuentran *B. velezensis* AF12, *B. halotolerans* AF23 y *B. amyloliquefaciens* AF42, entre otros.

Con respecto a *B. cinerea*, 3 aislados termosensibles antagonizaron a este fitopatógeno destacando *Bacillus* sp. AF53 y *Bacillus* sp. AF56, mientras que la cepa *Bacillus* sp. AF62 antagonizó a este fitopatógeno con un menor porcentaje de inhibición. De los aislados termotolerantes, 12 mostraron actividad antagónica, destacando a *B. velezensis* AF52 y *B. velezensis* AF59. Otros aislados termotolerantes que mostraron antagonismo son *B. velezensis* AF12, *B. halotolerans* AF23 y *B. amyloliquefaciens* AF42 por mencionar algunos.

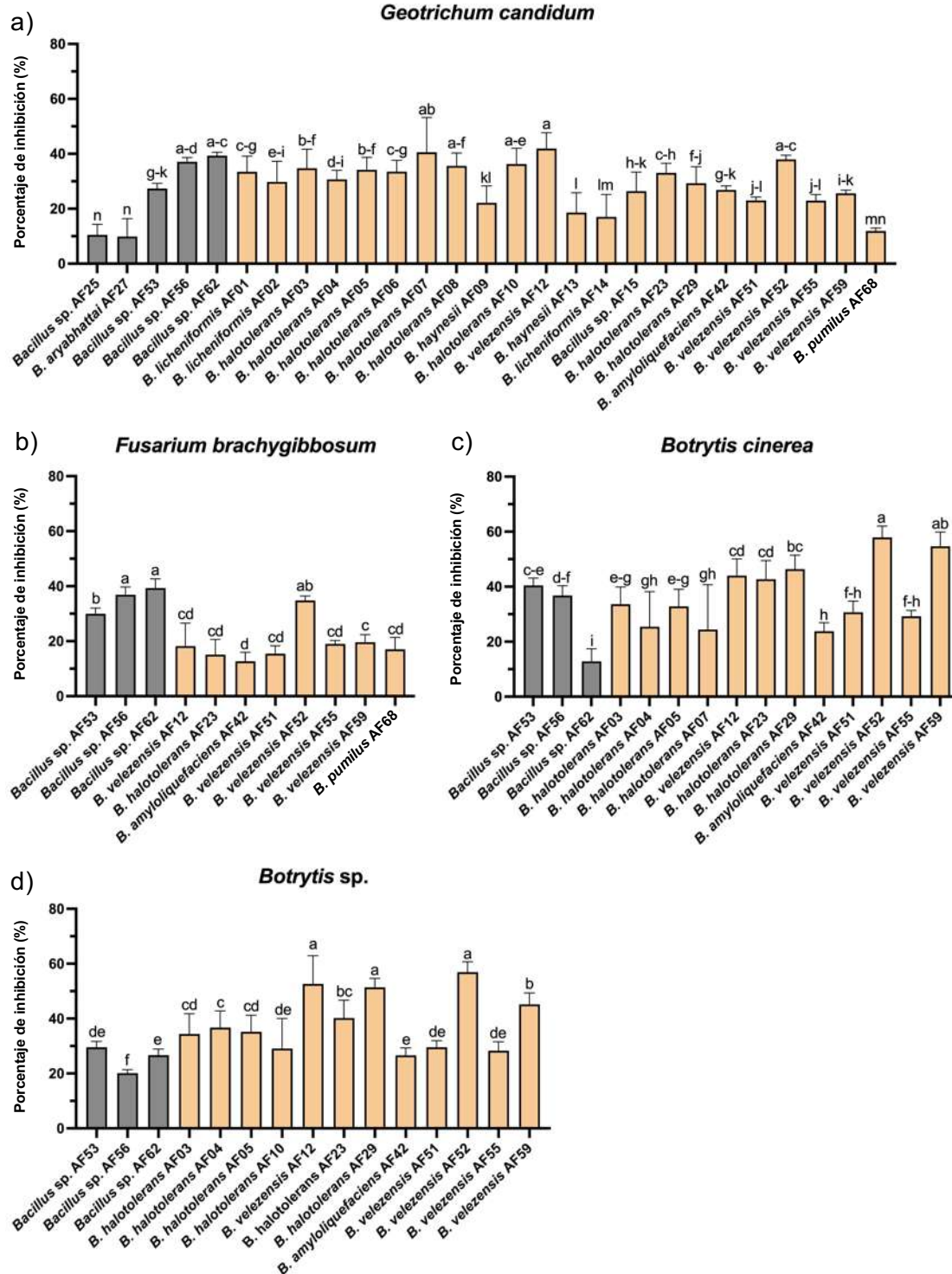


Figura 4. Aislados de *Bacillus* con actividad antagonica sobre hongos fitopatógenos. La actividad antagonica de los 49 aislados de *Bacillus* fue evaluada contra a) *Geotrichum candidum*, b) *Fusarium brachygibbosum*, c) *Botrytis cinerea* y d) *Botrytis sp.*; en color gris se muestran las cepas termosensibles y en color naranja las cepas termotolerantes, las barras muestran promedio y DE. Se realizó un análisis de comparación de medias (ANOVA) y *post hoc* Duncan con un nivel de significancia de 0.05. Los experimentos fueron por 3 días para *B. cinerea* y *F. brachygibbosum* y de 6 días para *G. candidum* y *Botrytis sp.*

Con el hongo *Botrytis* sp., 3 aislados termosensibles antagonizaron a este fitopatógeno destacando *Bacillus* sp. AF53 y *Bacillus* sp. AF62, también, *Bacillus* sp. AF56 mostró antagonismo en un menor porcentaje de inhibición. Por otra parte, 12 aislados termotolerantes mostraron antagonismo contra este fitopatógeno, destacando *B. velezensis* AF12, *B. halotolerans* AF29 y *B. velezensis* AF52. Algunas otras cepas también mostraron antagonismo, como *B. halotolerans* AF23 y *B. amyloliquefaciens* AF42, entre otros.

Para posteriores análisis solo se seleccionaron 8 aislados, de las cuales, 4 conformaron una población de aislados termosensibles (*B. aryabhattai* AF27, *Bacillus* sp. AF53, *Bacillus* sp. AF56 y *Bacillus* sp. AF62) y 4 de termotolerantes (*B. velezensis* AF12, *B. halotolerans* AF23, *B. amyloliquefaciens* AF42 y *B. velezensis* AF52).

Con las 2 poblaciones establecidas, se evaluó la actividad antagónica de estos 8 aislados hacia el fitopatógeno *Botryosphaeria rhodina*, los porcentajes de inhibición se muestran en la **Figura 5**. No se observó diferencia entre los porcentajes de inhibición de los 8 aislados evaluadas.

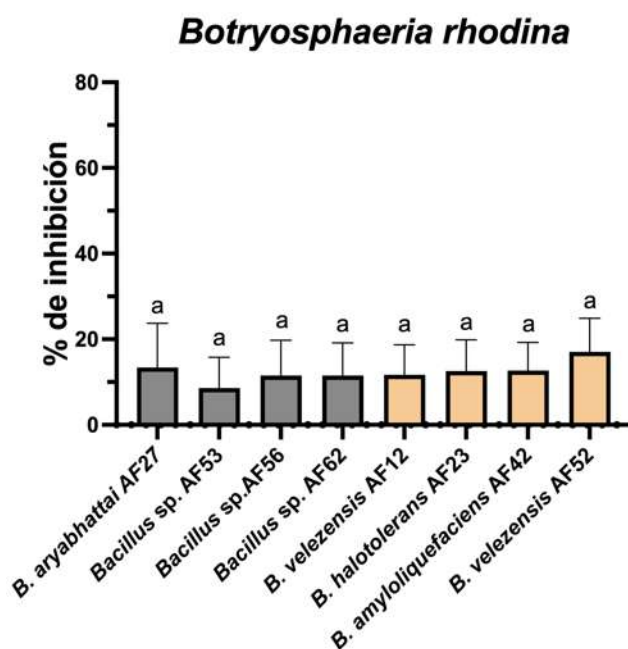


Figura 5. Evaluación de la actividad antagónica de los 8 aislados seleccionados sobre *B. rhodina*. En color gris se muestran las cepas termosensibles y en color naranja las cepas termotolerantes. las barras muestran promedio y DE. Se realizó un análisis de comparación de medias (ANOVA) y *post hoc* Duncan con un nivel de significancia de 0.05. Los experimentos fueron por 3 días.

7.4 Evaluación de termosensibilidad de los fitopatógenos fúngicos

Se incubaron los agentes fúngicos a diferentes temperaturas, En *B. cinerea* se observó que fue el hongo más resistente, siendo el único que mantuvo su crecimiento a 35 °C con respecto a 28 y 32 °C, además logró mantener un crecimiento aceptable a 37 °C (**Figura 6a**).

Con *F. brachygibbosum* se observó una reducción en su crecimiento a 32 °C, sin embargo, se reduce aún más, a los 35 y 37 °C (**Figura 6b**).

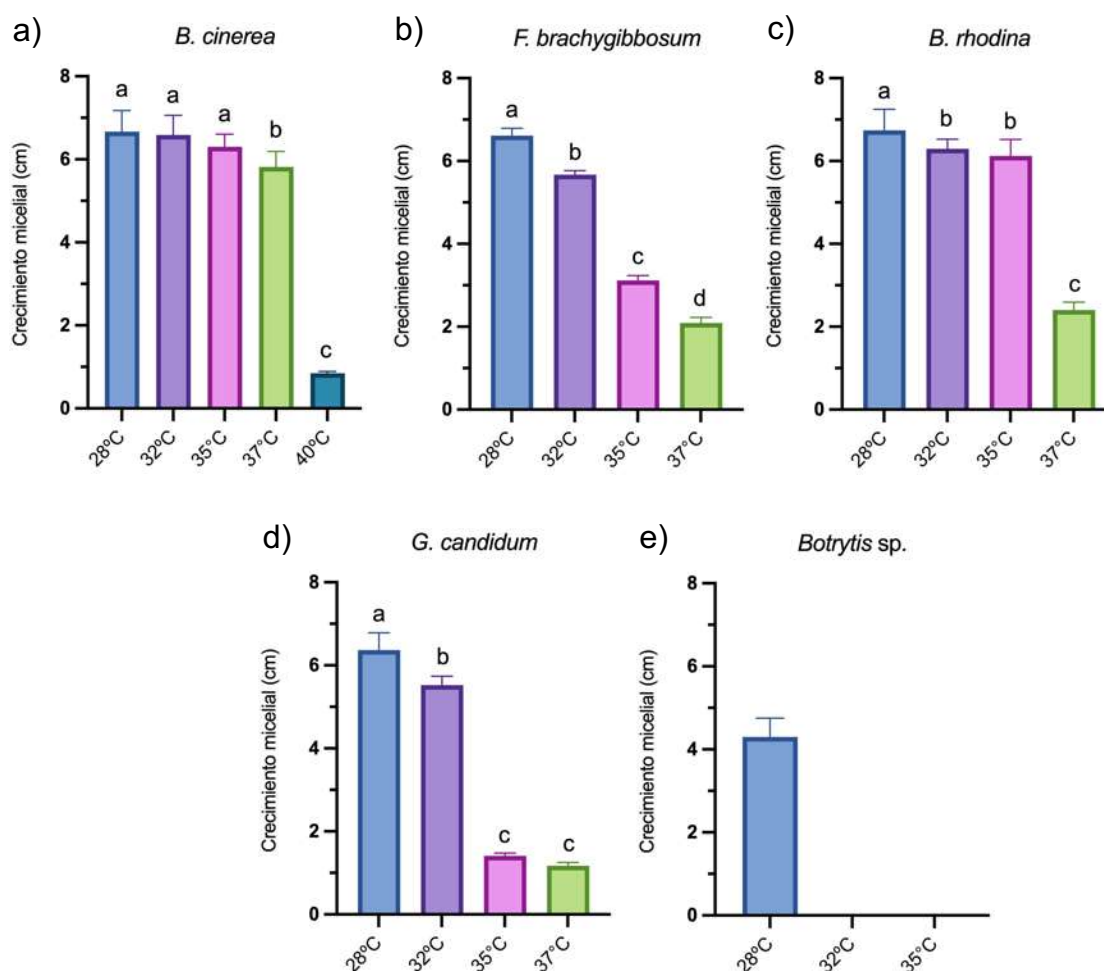


Figura 6. Termosensibilidad de agentes fúngicos. La evaluación del crecimiento micelial se realizó a temperaturas de 28, 32, 35, 37 y 40 °C. a) *B. cinerea*, b) *F. brachygibbosum*, c) *B. rhodina*, d) *G. candidum*, y e) *Botrytis* sp. se realizaron por 3 (*B. cinerea*, *F. brachygibbosum* y *B. rhodina*) y 6 días (*G. candidum* y *Botrytis* sp.). Las barras muestran promedio y DE. Los crecimientos a distintas temperaturas fueron analizados por comparación de medias (ANOVA) (n=3) y *post hoc* Duncan con un nivel de significancia de 0.05.

En *B. rhodina*, su crecimiento sufrió cambios a partir de 32 °C, por otro lado, no se observó diferencia en el crecimiento a 32 y 35 °C. Finalmente, a 37 °C su crecimiento se vio limitado por la temperatura de mayor forma (**Figura 6c**).

G. candidum, mostró un crecimiento diferente a 32 °C, a 35 °C se observa una disminución drástica en el crecimiento de este hongo (**Figura 6d**).

Finalmente, *Botrytis* sp., mostró un crecimiento lento a 28 °C, e interesantemente, no mostró crecimiento a 32 °C (**Figura 6e**). Por lo anterior, este hongo, al mostrar una alta sensibilidad a la temperatura, se descartó para los siguientes ensayos.

Los hongos *B. cinerea*, *F. brachygibbosum* y *G. candidum*, por crecer a temperaturas superiores de 32 °C, fueron seleccionados para posteriores ensayos.

7.5. Evaluación de la actividad antagónica de las cepas seleccionadas hacia hongos fitopatógenos a diferentes temperaturas

Los resultados de la termotolerancia fúngica permitieron seleccionar las temperaturas a las cuales se realizaron los ensayos de antagonismo con los 8 aislados bacterianos seleccionados. Los hongos *F. brachygibbosum*, *G. candidum* y *B. rhodina* fueron evaluados a 28 y 32 °C, mientras que *B. cinerea* fue evaluado a 28, 32, 35 y 37 °C. Adicional al porcentaje de inhibición calculado de forma individual para cada cepa, se generó el valor promedio a nivel de población, el cual se compone del promedio de los porcentajes de inhibición de las 4 cepas pertenecientes a cada población a las diferentes temperaturas evaluadas.

En el caso del patógeno *F. brachygibbosum*, las cepas termosensibles *B. aryabhattai* AF27 y *Bacillus* sp. AF62, mostraron un mejor antagonismo a 32 °C con respecto a 28 °C, las otras dos cepas termosensibles no mostraron diferencias (**Figura 7a**). Por parte de las cepas termotolerantes, *B. halotolerans* AF23, *B. amyloliquefaciens* AF42, *B. velezensis* AF52 aumentaron su actividad antagónica a 32 °C con respecto a 28 °C, mientras que en *B. velezensis* AF12 no se vio alterada (**Figura 7b**). El promedio de los porcentajes de antagonismo de las cepas termosensibles es de 28.93 % mientras que de las termotolerantes es de 36.85 %,

por lo anterior, la población termotolerante tiene un mayor antagonismo contra *F. brachygibbosum*.

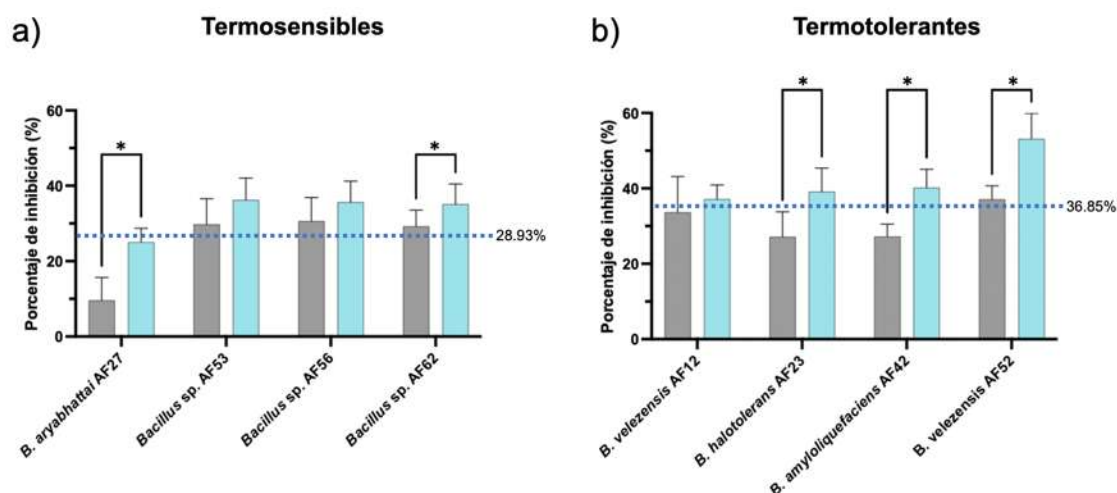


Figura 7. Antagonismo contra *F. brachygibbosum* a diferentes temperaturas. Porcentaje de inhibición de *F. brachygibbosum* de a) los aislados termosensibles y b) los aislados termotolerantes, evaluados a 28°C (gris) y 32°C (azul). Las barras grises muestran promedio y DE. La barra punteada de color azul representa el promedio de los porcentajes de inhibición de cada población. Incubación de los ensayos de 3 días. Se realizó un análisis de comparación de medias (*t-Student*) con un nivel de significancia de 0.05.

El antagonismo de las cepas termosensibles hacia *G. candidum* fue variable, en la cepa *B. aryabhattai* AF27 la actividad antagónica se perdió a 32 °C, caso contrario sucedió con la cepa *Bacillus* sp. AF62, en la cual la actividad antagónica aumentó a 32 °C con respecto a 28 °C. En las otras dos cepas no se observaron diferencias en los antagonismos en las dos temperaturas evaluadas (**Figura 8a**). En la población termotolerante no se observaron diferencias en los antagonismos a 28 y 32 °C. El promedio obtenido de la población termosensible es de 27.21 %, mientras que de la termotolerante es de 32.16 % (**Figura 8b**). Hacia este hongo fitopatógeno las cepas termosensibles antagonizan de forma similar que las cepas termotolerantes.

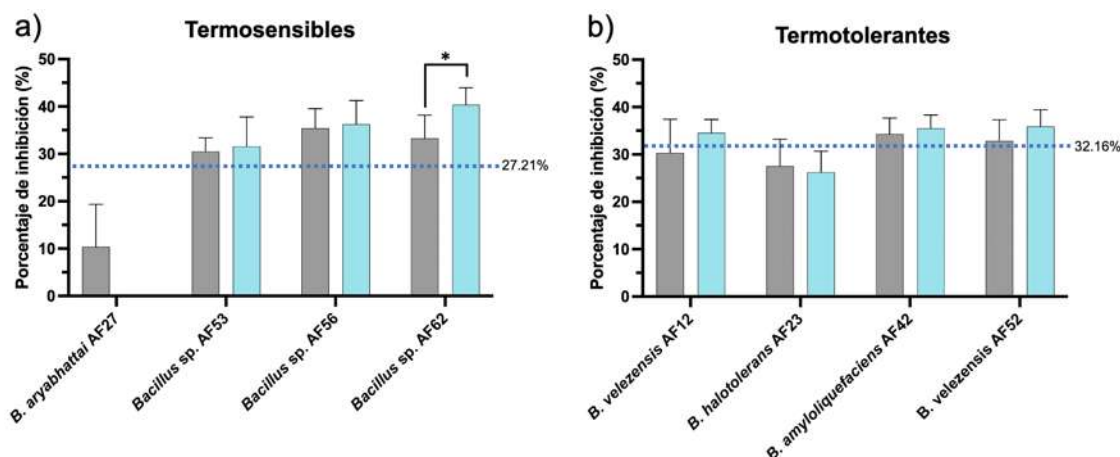


Figura 8. Antagonismo contra *G. candidum* a diferentes temperaturas. Porcentaje de inhibición de *G. candidum* de a) los aislados termosensibles y b) los aislados termotolerantes, evaluado s a 28°C (gris) y 32°C (azul). Las barras grises muestran promedio y DE. La barra punteada de color azul representa el promedio de los porcentajes de inhibición de cada población. Incubación de los ensayos de 6 días. Se realizó un análisis de comparación de medias (*t-Student*) con un nivel de significancia de 0.05.

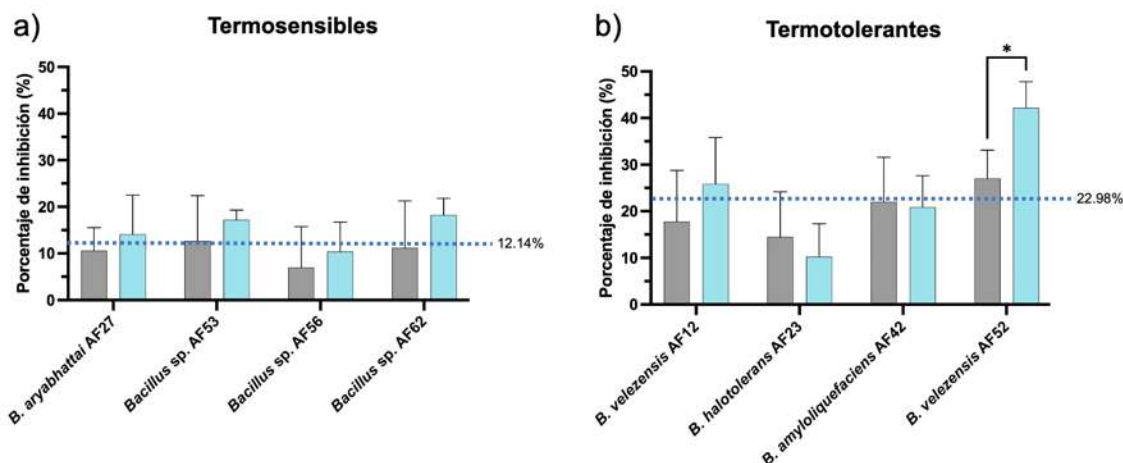


Figura 9. Antagonismo contra *B. rhodina* a diferentes temperaturas. Porcentaje de inhibición de *B. rhodina* de a) los aislados termosensibles y b) los aislados termotolerantes, evaluados a 28°C (gris) y 32°C (azul). Las barras grises muestran promedio y DE. La barra punteada de color azul representa el promedio de los porcentajes de inhibición de cada población. Incubación de los ensayos de 6 días. Se realizó un análisis de comparación de medias (*t-Student*) con un nivel de significancia de 0.05.

En la actividad antagónica de las cepas termosensibles hacia *B. rhodina* no se observó diferencia en las dos temperaturas evaluadas (**Figura 9a**). En la población termotolerante, la cepa *B. velezensis* AF52 aumentó su actividad antagónica a 32 °C con respecto a 28 °C, las 3 cepas termotolerantes restantes no mostraron diferencia entre sus actividades antagónicas en las dos temperaturas evaluadas

(Figura 9b). El promedio de los porcentajes de inhibición de la población termosensible es de 12.14 %, por otro lado, el promedio de la población termotolerante es de 22.98 %, por lo que, las cepas termotolerantes presentan mayor actividad antagónica contra *B. rhodina*.

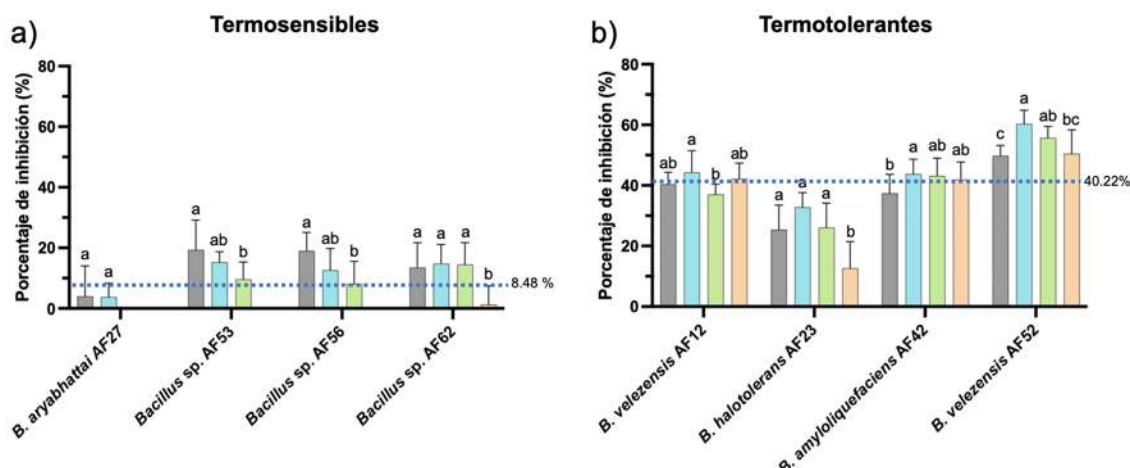


Figura 10. Antagonismo hacia *B. cinerea* a diferentes temperaturas. Porcentaje de inhibición de *B. cinerea* de a) los aislados termosensibles y b) los aislados termotolerantes, evaluados a 28°C (gris), 32°C (azul), 35°C (verde) y 37°C (naranja). Las barras grises muestran promedio y DE. La barra punteada de color azul representa el promedio de los porcentajes de inhibición de cada población. Incubación de los ensayos de 3 días. Se realizó un análisis de comparación de medias (ANOVA) y *post hoc* Duncan con un nivel de significancia de 0.05.

Finalmente, el antagonismo hacia *B. cinerea* por las cepas termosensibles mostró un comportamiento similar con las cepas *Bacillus sp.* AF53 y *Bacillus sp.* AF56, pudiendo observarse que conforme aumenta la temperatura, el antagonismo va disminuyendo hasta llegar a 37 °C, temperatura en la cual el antagonismo se pierde en ambas cepas. Para *B. aryabhattai* AF27 la actividad antagónica se pierde en la temperatura de 35 °C y para *Bacillus sp.* AF62, la actividad antagónica se mantiene de forma similar hasta 35 °C, ya que a 37 °C se observa una notable disminución en el porcentaje de inhibición (Figura 10a). En la población termotolerante el comportamiento fue variable, para la cepa *B. velezensis* AF12 se observó que mantuvo su actividad antagónica de forma similar conforme aumenta la temperatura. La cepa *B. halotolerans* AF23 mantuvo de forma similar la actividad antagónica hasta 35 °C, a 37 °C se observa una disminución en esta actividad. Para el caso de *B. amyloliquefaciens* AF42 la actividad antagónica a 35 y 37 °C fue similar

con respecto a 28 °C, sin embargo, a 32 °C se observó un aumento. Finalmente, *B. velezensis* AF52 mostró una actividad antagónica similar entre las temperaturas de 28 y 37 °C, a las temperaturas de 32 y 35 °C se observó un aumento en su capacidad para antagonizar a este fitopatógeno (**Figura 10b**). El promedio de la población termosensible es de 8.48 % mientras que el de la población termotolerante es de 40.22 %, comparando ambos promedios, se puede notar que la población termotolerante tiene mayor actividad antagónica contra *B. cinerea*.

7.6. Cinéticas de crecimiento de la población termosensible y termotolerante a diferentes temperaturas

Se encontraron diferencias entre los crecimientos de la población termosensible y la termotolerante. La población termosensible fue más susceptible a la temperatura al pasar 48 h de incubación. *B. aryabhattai* AF27, *Bacillus* sp. AF53, *Bacillus* sp. AF56 y *Bacillus* sp. AF62 mostraron la lectura más alta de D.O. en 32 °C pasadas las 48 h de incubación, en comparación con las otras temperaturas, además no se observó crecimiento en la temperatura de 50 °C (**Figura 11a**).

Por otra parte, la población termotolerante obtuvo valores más altos de densidad óptica al pasar 48 h de incubación a 37 °C para *B. halotolerans* AF23, y a 40 °C para *B. velezensis* AF12 y *B. amyloliquefaciens* AF42. Para la cepa de *B. velezensis* AF52, no hubo diferencia entre las temperaturas de 37 y 40 °C, en las cuales, en ambas alcanzó el mayor valor de densidad óptica. También, en toda la población termotolerante, se observó crecimiento a 50 °C (**Figura 11b**).

En la **Figura 12**, las densidades ópticas se ven representadas a nivel de población. Se puede observar que la temperatura óptima de crecimiento de la población termosensible es de 32 °C (**Figura 12a**), mientras que la población termotolerante, su temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre 37 y 40 °C (**Figura 12b**). Además, se puede observar una tendencia a superar el crecimiento de la población termosensible por parte de la termotolerante entre 37 y 40 °C (**Figura 12c**).

Finalmente, se observa que solo la población termotolerante muestra crecimiento a los 50 °C (**Figura 12d**).

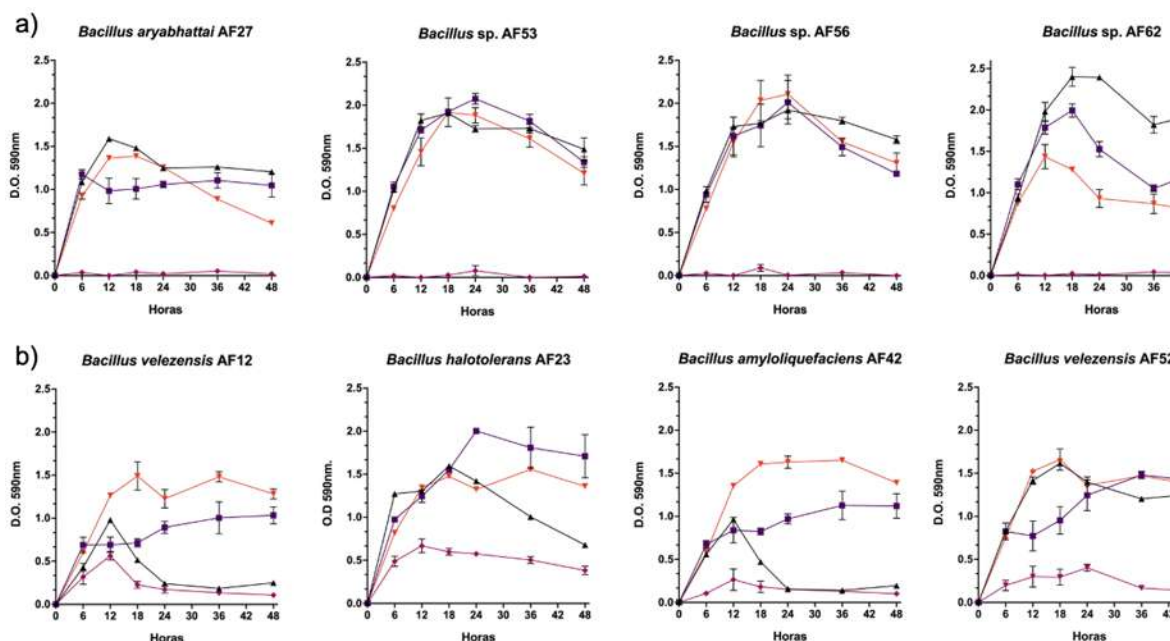


Figura 11. Cinéticas de crecimiento de las dos poblaciones de *Bacillus* spp. en diferentes temperaturas. a) población termosensible y b) población termotolerante. Las cinéticas de crecimiento realizadas en CN y la absorbancia fue medida a una longitud de onda de 590 nm. El color negro corresponde a la temperatura de 32 °C, morado a 37 °C, naranja a 40 °C y rosa a 50 °C.

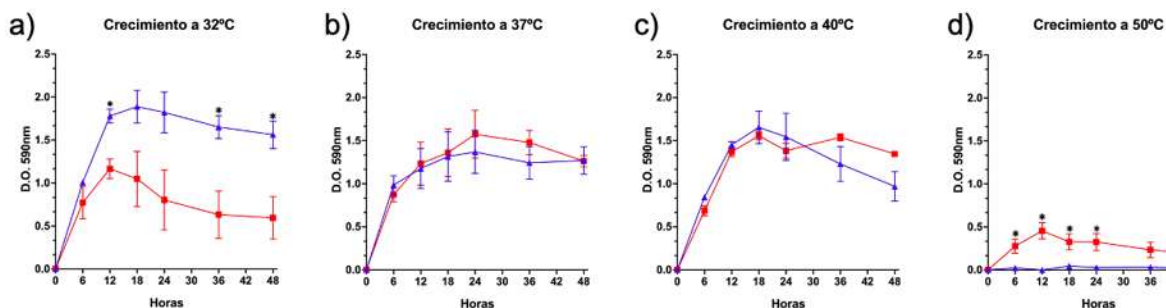


Figura 12. Crecimiento de las *Bacillus* spp. representado a nivel de población. Los datos representan a nivel de población a los a) 32 °C, b) 37 °C, c) 40 °C y d) 50 °C. De color azul la población termosensible y de color rojo la población termotolerante.

7.7. Perfil lipídico membranal de las cepas de *Bacillus* a diferentes temperaturas

Los lípidos de membrana de ambas poblaciones mostraron diferencias al ser incubados a diferentes temperaturas. La población termosensible fue evaluada a 30, 37 y 40 °C. Los lípidos de membrana en esta población mostraron variaciones a las temperaturas evaluadas de 37 y 40 °C con respecto de 30 °C (**Tabla 4**). La fosfatidiletanolamina (PE) mostró un comportamiento similar en las cepas termosensibles, ya que a 37 y 40 °C en las 4 cepas de esta población el porcentaje de este fosfolípido disminuyó.

Tabla 4. Perfil lipídico membranal de los aislados termosensibles. Las evaluaciones se realizaron a las temperaturas de 30, 37 y 40°C. Se realizó un análisis de comparación de medias (ANOVA) y *post hoc* Duncan con un nivel de significancia de 0.05.

Cepa bacteriana	PL (%)	Condiciones de crecimiento		
		30 °C	37 °C	40 °C
<i>B. aryabhattai</i> AF27	PE	38.15 ± 0.76	29.66 ± 1.00*	31.84 ± 0.67*
	PG	37.99 ± 0.54	17.22 ± 0.88*	19.67 ± 1.23*
	CL	10.25 ± 0.46	46.48 ± 0.30*	38.74 ± 0.68*
	Otros	13.61 ± 0.46	6.65 ± 0.39*	9.75 ± 0.24*
<i>Bacillus</i> sp. AF53	PE	67.54 ± 0.98	42.04 ± 0.53*	46.21 ± 0.42*
	PG	24.70 ± 0.30	41.68 ± 0.48*	38.92 ± 0.50*
	CL	3.84 ± 0.62	8.03 ± 0.28*	7.88 ± 0.13*
	Otros	3.92 ± 0.33	8.26 ± 0.59*	7.00 ± 0.12*
<i>Bacillus</i> sp. AF56	PE	62.62 ± 0.45	54.75 ± 0.63*	31.00 ± 0.19*
	PG	28.30 ± 0.57	29.53 ± 0.45*	33.25 ± 0.69*
	CL	3.72 ± 0.12	7.11 ± 0.22*	26.71 ± 0.61*
	Otros	5.36 ± 0.36	8.61 ± 0.24*	9.04 ± 0.14*
<i>Bacillus</i> sp. AF62	PE	60.67 ± 0.84	34.86 ± 1.47*	18.83 ± 0.40*
	PG	29.22 ± 0.85	23.13 ± 1.25*	32.87 ± 0.57*
	CL	5.56 ± 0.26	35.92 ± 0.82*	39.63 ± 0.87*
	Otros	4.55 ± 0.53	6.09 ± 0.86*	8.67 ± 0.29*

PL: Fosfolípido; PE: Fosfatidiletanolamina; PG: Fosfatidilglicerol; CL: Cardiolipina.

* Diferencia significativa con respecto a 30 °C.

El fosfatidilglicerol (PG) en *B. aryabhattai* AF27 disminuyó a 37 y 40 °C, caso contrario sucedió en las cepas *Bacillus* sp. AF53 y *Bacillus* sp. AF56, en las cuales aumenta a 37 y 40 °C. Finalmente, en *Bacillus* sp. AF62 disminuyó a 37°C, mientras que a 40 °C aumentó. En la cardiolipina (CL) se observó un aumento en todas las

cepas termosensibles, tanto a 37 como a 40 °C. Otros lípidos no identificados aumentaron en los aislados de *Bacillus* sp. AF53, *Bacillus* sp. AF56 y *Bacillus* sp. AF62 a 37 y 40 °C, mientras que en *B. aryabhattai* AF27 disminuyeron a estas dos temperaturas.

Tabla 5. Perfil lipídico membranar de los aislados termotolerantes. Las evaluaciones se realizaron a las temperaturas de 30, 37, 40 y 50 °C. Se realizó un análisis de comparación de medias (ANOVA) y *post hoc* Duncan con un nivel de significancia de 0.05.

Cepa bacteriana	PL (%)	Condiciones de crecimiento			
		30 °C	37 °C	40 °C	50 °C
<i>B. velezensis</i> AF12	PE	49.91 ± 0.29	34.92 ± 0.14*	37.86 ± 0.68*	14.46 ± 0.46*
	PG	23.83 ± 0.25	9.98 ± 0.47*	9.96 ± 0.40*	24.29 ± 0.23
	CL	20.61 ± 0.36	48.94 ± 0.11*	50.74 ± 0.89*	41.02 ± 0.39*
	Otros	5.65 ± 0.30	6.17 ± 0.29	1.45 ± 0.05	6.74 ± 5.96
<i>B. halotolerans</i> AF23	PE	14.20 ± 0.60	14.41 ± 0.61	6.36 ± 0.28*	8.82 ± 0.20*
	PG	28.41 ± 1.33	56.04 ± 0.24*	54.81 ± 0.83*	33.34 ± 0.78*
	CL	54.11 ± 0.71	26.69 ± 0.74*	35.86 ± 0.65*	51.77 ± 0.42*
	Otros	3.28 ± 0.11	2.86 ± 0.21*	1.48 ± 0.11*	2.02 ± 0.20*
<i>B. amyloliquefaciens</i> AF42	PE	35.52 ± 0.75	29.93 ± 0.86*	22.49 ± 0.64*	28.93 ± 0.29*
	PG	37.32 ± 0.90	10.26 ± 0.26*	6.78 ± 0.29*	20.45 ± 0.65*
	CL	19.20 ± 0.19	58.79 ± 0.81*	70.19 ± 0.97*	34.99 ± 0.16*
	Otros	7.96 ± 0.16	1.02 ± 0.03*	0.54 ± 0.06*	5.21 ± 3.04
<i>B. velezensis</i> AF52	PE	31.46 ± 1.24	28.23 ± 0.14*	29.97 ± 0.34*	19.45 ± 0.66*
	PG	35.54 ± 2.00	43.66 ± 0.05*	40.08 ± 0.68*	27.07 ± 0.66*
	CL	23.11 ± 0.71	21.31 ± 0.12*	21.25 ± 0.69*	37.46 ± 0.68*
	Otros	9.89 ± 0.62	6.80 ± 0.21	4.35 ± 1.62*	5.34 ± 3.51*

PL: Fosfolípido; PE: Fosfatidiletanolamina; PG: Fosfatidilglicerol; CL: Cardiolipina.

* Diferencia significativa con respecto a 30 °C.

La población termotolerante fue evaluada a las temperaturas de 30, 37, 40 y 50 °C. Los lípidos de membrana se comportaron de diferente forma a las temperaturas evaluadas de 37, 40 y 50 °C con respecto de 30 °C (**Tabla 5**). La fosfatidiletanolamina (PE) disminuye en las cepas termotolerantes *B. velezensis* AF12, *B. amyloliquefaciens* AF42 y *B. velezensis* AF12 a 37, 40 y 50 °C, en el caso de *B. halotolerans* AF23 únicamente disminuye a 40 y 50 °C, ya que, a 37 °C no hay diferencias con respecto a 30 °C. El fosfatidilglicerol (PG) en *B. velezensis* AF12 disminuye a 37 y 40 °C, mientras que a 50 °C se observa porcentajes similares de este compuesto con respecto a 30 °C. En *B. halotolerans* AF23, aumenta en 37, 40

y 50 °C con respecto a 30 °C. Por último, en las cepas *B. amyloliquefaciens* AF42 y *B. velezensis* AF52 disminuye en las temperaturas de 37, 40 y 50 °C.

La cardiolipina (CL) aumenta en las cepas *B. velezensis* AF12, *B. amyloliquefaciens* AF42 y *B. velezensis* AF52 a 37, 40 y 50 °C. En la cepa de *B. halotolerans* AF23, se observa una disminución en el porcentaje de este compuesto en todas las temperaturas evaluadas.

Finalmente, no se observó diferencia en otros lípidos en la cepa de *B. velezensis* AF12 a 37, 40 y 50 °C. En *B. halotolerans* AF23 existe una disminución conforme aumenta la temperatura. En *B. amyloliquefaciens* se encontró menor porcentaje de otros lípidos a 37 y 40 °C, mientras que a 50 °C no hubo diferencia. Por último, en *B. velezensis* AF52 se observaron menores porcentajes de otros lípidos a las temperaturas de 40 y 50 °C.

8. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la temperatura sobre los componentes de membrana y la acción antifúngica de cepas bacterianas aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos; ambientes que han sido caracterizados por presentar altas temperaturas (Flores-Piña, 2021). En su mayoría, estas cepas se identificaron como miembros del género *Bacillus*, lo cual resulta interesante, ya que concuerda con informes en los que se reporta que se ha llevado a cabo análisis de diversidad bacteriana en suelos cercanos a respiraderos de gas de carbón. En estos lugares, en donde las temperaturas del suelo alcanzan niveles elevados (que ocurre de forma similar en los incendios subterráneos) el phylum Firmicutes fue el más abundante, con un 71.4 % de la muestra total y estuvo representado principalmente por los géneros *Bacillus* y *Paenibacillus* (Zhang et al., 2013).

En los suelos donde los gases calientes procedentes de la combustión de la materia orgánica salen a la superficie, se pueden formar ecosistemas locales extremos, que se caracterizan por temperaturas elevadas ($>50\text{ }^{\circ}\text{C}$), sin embargo, la composición y ecología de las comunidades microbianas en dichos entornos y el potencial genético de estos microorganismos son poco conocidos (Kadnikov et al., 2023). Aquellos que sobreviven en ambientes térmicos tienen adaptaciones únicas a las altas temperaturas que pueden ser un recurso importante en la búsqueda de bioinoculantes termotolerantes.

La identificación parcial de las bacterias se realizó a través de la secuenciación del gen de ARN ribosomal 16S, se encontraron 13 especies diferentes de *Bacillus* de un total de 49 aislados, éstas son: *B. megaterium*, *B. zanthoxyli*, *B. aryabhatai*, *B. simplex*, *B. niacin*, *B. shackletonii*, *B. cereus*, *B. pseudomycooides*, *B. velezensis*, *B. halotolerans*, *B. haynesii*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*. Además, no fue posible identificar a nivel de especie 6 de estos aislados, ya que las secuencias de los genes 16S obtuvieron el mismo porcentaje de identidad con más de una especie al realizar la comparación (**Tabla 3**). Se ha demostrado que el análisis filogenético del gen 16S ARNr, frecuentemente no logra diferenciar a todas las especies dentro del complejo debido a la naturaleza conservada del gen (Rooney et al., 2009).

Hasta este punto, se conocían aspectos interesantes de las cepas utilizadas en este proyecto, primeramente su fuente de aislamiento y con esto posibles funciones adaptativas que podrían representar ventajas y recursos importantes en la promoción del crecimiento de las plantas y en segundo lugar, su asignación como miembros del género *Bacillus*, cuyas características ya han sido mencionadas. Por lo tanto, se realizó un análisis de termotolerancia de estos aislados, ya que la temperatura es uno de los factores ambientales más importantes que afectan el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos.

La termotolerancia es una adaptación biológica que permite a las bacterias sobrevivir en condiciones ambientales desafiantes, como las altas temperaturas, que podrían ser letales (Trent et al., 1994). Después de realizar la prueba de termotolerancia utilizando placas de AN y las temperaturas de 30 y 50 °C, se encontraron 27 cepas termosensibles y 22 termotolerantes, las cuales mostraron una agrupación filogenética de acuerdo con las temperaturas de crecimiento **(Figura 3)**.

Aquellas cepas en las que se registró un crecimiento límite en la temperatura de 45 °C se clasifican como mesófilas (Merino et al., 2019). En este estudio, se denominaron termosensibles, por otra parte, se denominaron termotolerantes a aquellas que mostraron crecimiento por encima de este límite (crecimiento a 50 °C). Dentro de los aislados termosensibles que no fueron capaces de crecer a 50 °C se encontraron las especies de *B. megaterium*, *B. zanthoxyli*, *B. aryabhatai*, *B. simplex*, *B. niacini*, *B. shackletonii*, *B. cereus* y *B. pseudomycoides*.

Mishra et al., (2011) evaluaron dos cepas de *B. megaterium* las cuales mostraron crecimiento de 4 a 40 °C. También *B. megaterium* HLJ7 fue reportada por crecer solo hasta 40 °C (Huang et al., 2022). Esto coincide con los resultados de este trabajo, ya que las cepas evaluadas pertenecientes a esta especie solo mostraron crecimiento a 40 °C.

La cepa *B. zanthoxyli* GKSM2 mostró crecimiento en el rango de 20 a 45 °C, reportando un crecimiento óptimo de 30 °C (Majhi et al., 2021). En la cepa de este trabajo no se evaluó el crecimiento a 45 °C, pero este valor aún pertenece al rango mesófilo, por lo que se denominó termosensible. De igual forma, Li et al., (2017),

evaluaron el crecimiento de la cepa de *B. zantoxhyli* 1433 a diferentes temperaturas, 4, 10, 15, 20, 28, 32, 37, 45, 50 y 55 °C, encontrando que la cepa 1433 puede crecer en el rango de 4 a 45 °C. Adicionalmente, los autores reportaron que la temperatura óptima de crecimiento de la cepa 1433, es de los 28 a los 32 °C. De igual forma, en este estudio, las cepas de *B. zanthoxyli* no presentaron crecimiento a 50 °C.

El crecimiento de la cepa *B. simplex* H-b fue reportado por Yang et al., (2021), ellos evaluaron el crecimiento bajo diferentes temperaturas y observaron que fue capaz de crecer en el rango de temperatura de 4 a 42 °C. Al igual que nosotros, no reportaron crecimiento mayor a 45 °C. Por otra parte, Novello et al., (2023), informaron que *B. simplex* AH24 presentó crecimiento a 28, 37 y 45 °C, aunque es incapaz de crecer a 4 °C como es el caso de la cepa H-b.

Diferentes autores han evaluado el crecimiento de cepas de *B. niacini* a diferentes rangos de temperatura, por ejemplo, Logan y Vos, (2015) después de evaluar el crecimiento de los 5 a los 65 °C, demostraron que su cepa solo puede crecer de los 10 a los 40 °C. De manera similar, con otra cepa Diomandé et al., (2015) informaron que la *B. niacini* CCTCC AB 95011 puede crecer en un rango de los 10 a 40 °C. Estos informes concuerdan con los hallazgos de este trabajo, siendo 40 °C la temperatura máxima a la que pueden crecer la cepa de *B. niacini*.

Los aislados de *B. shackletonii* que se identifican aquí no tienen la capacidad de crecer a 50 °C, sin embargo, en la literatura se han encontrado reportes donde describen que esta especie puede crecer a 50 °C. El primero a mencionar es el de Albuquerque et al., (2008), quienes establecieron que *B. shackletonii* LMG 18435 tiene una temperatura de crecimiento de 20 a 52.5 °C. Otro reporte que de igual forma mencionan que puede crecer a 50 °C es el de Logan y Vos (2015). Por su parte, Valappil et al., (2007) encontraron que *B. cereus* SPV crece en un rango de temperatura de 25 a 45 °C, además mencionan un crecimiento óptimo a los 30 °C. Otro estudio que menciona la temperatura de crecimiento de *B. cereus* es el de Batt, (2014), quienes establecieron que puede crecer de 4 hasta 48 °C con una temperatura óptima de crecimiento es de 28 a 35 °C. Los reportes coinciden con lo encontrado en este trabajo, ya que la cepa de *B. cereus* no mostró crecimiento a 50 °C.

Solmaz et al., (2018) evaluaron el crecimiento de *B. pseudomycooides* U10 a 25, 30, 37 y 45 °C, en todas se presentó crecimiento y se observó un mayor crecimiento a 37 °C. La cepa de *B. pseudomycooides* encontrada en este trabajo no mostró crecimiento a 50 °C, pero si a 40 °C, como en el reporte antes mencionado. Logan y Vos, (2015) informaron el rango de temperatura en el cual *B. pseudomycooides* puede crecer, el cual es de 20 °C a 40 °C. Por otra parte, en los aislados termotolerantes (aquellos que crecieron a 50 °C) encontramos las especies de *B. velezensis*, *B. halotolerans*, *B. haynesii*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*.

Dunlap et al., (2017) encontraron que la cepa de *B. haynesii* NRRL B-41327 crece dentro del rango de 15 a 60 °C, para esto, ellos evaluaron las temperaturas de 4, 10, 15, 25, 30, 37, 50, 55 y 60 °C, además, como en este estudio, también reportan la temperatura óptima de crecimiento de 37 °C. Se ha reportado la temperatura de crecimiento por Ağçeli, (2023) de *B. haynesii*, la cual puede crecer de 15 a 60 °C, coincidiendo una vez más en la temperatura óptima de crecimiento, de 37 °C. En este estudio, la cepa de *B. haynesii* solamente se evaluó hasta 50 °C por lo que no se descarta que pueda crecer a 60 °C.

Para *B. licheniformis*, Diomandé et al., (2015) describieron el crecimiento de esta especie de un rango de 15 a 55 °C. Otro reporte menciona que esta especie puede crecer de 20 a 50 °C, aunque existen algunas cepas de *B. licheniformis* que efectivamente, tienen la capacidad de crecer a 55 °C (Logan y Vos, 2015). En este estudio solo se evaluó hasta 50 °C, por lo que la cepa podría ser de aquellas con la capacidad de crecer a 55 °C.

Las siguientes especies forman parte de las 8 cepas seleccionadas, éstas son *B. aryabhattai* (AF27), *Bacillus* sp. (AF53, AF56 y AF62), *B. velezensis* (AF12 y AF52), *B. halotolerans* (AF23) y *B. amyloliquefaciens* (AF42), mismas que se describen enseguida.

4 cepas forman parte de la población termosensible. *B. aryabhattai* AF27 es una de ellas, ya que tanto en la evaluación en placa Petri con AN, así como en las cinéticas en CN, no se observó crecimiento a 50 °C (**Figura 11a**), esto coincide con lo reportado por Ray et al., (2012), ellos tampoco observaron crecimiento a 50 y 80 °C

de una cepa de *B. aryabhatai*. Por otro lado, al incubar a 37 °C si se observó crecimiento. El crecimiento a 37 °C también fue observado con *B. aryabhatai* BA03, así como también a 30 °C (Paz et al., 2016).

Las cepas *Bacillus* sp. AF53, *Bacillus* sp. AF56 y *Bacillus* sp. AF62 son los 3 miembros de la población termosensible restante, para los cuales no fue posible la identificación a nivel de especie, ya que obtuvieron mismos porcentajes de identidad con las cepas *B. thuringiensis* IAM12077 (99.23 %, 99.44 % y 97.41 %, respectivamente) y *B. toyonensis* BCT-7112 (99.23 %, 99.44 % y 97.41 %, respectivamente). Aunque la secuencia del gen 16S permite identificar taxonómicamente a los aislados, es frecuente que sea imprecisa debido a la baja eficiencia en diferenciación de fenotipos (Dunlap et al., 2019). Por lo anterior, las secuencias del gen 16S no son suficientes para distinguir entre especies estrechamente relacionadas del complejo de algunas especies de *Bacillus* (Wu et al., 2021). Algunos reportes de las temperaturas de las dos posibles afiliaciones taxonómicas a las cuales estas 3 cepas pueden pertenecer se mencionan enseguida.

La tasa de crecimiento de algunas cepas de *B. thuringiensis* fue evaluada por Gebremariam et al., (2021), esto se realizó a de 15 a 40 °C con intervalos de 5 °C, el mayor crecimiento se encontró a 30 °C. En las cinéticas de crecimiento de las cepas *Bacillus* sp. AF53, *Bacillus* sp. AF56 y *Bacillus* sp. AF62 de igual forma se encontró un crecimiento máximo a 32 °C, aunque, para *Bacillus* sp. AF53 esto fue observado únicamente en la última medición que corresponde a las 48 horas, previo a esto no hay diferencia entre 32 y 37 °C en el crecimiento de esta cepa (**Figura 11a**). Se ha reportado que la temperatura óptima de crecimiento de *B. thuringiensis* es de 30 °C (El-Bendary, 2006), que coincide con nuestros resultados.

Por otra parte, para la otra posible afiliación taxonómica de estas *Bacillus* sp., Luo et al., (2021) evaluaron el crecimiento de *B. toyonensis* P18 a 16, 28, 37, y 50 °C, donde el mayor crecimiento se observó a 28 °C, sin embargo, a 50 °C no se observó crecimiento de P18. Lo observado en P18 coincide con las cinéticas de crecimiento de las cepas *Bacillus* sp. AF53, *Bacillus* sp. AF56 y *Bacillus* sp. AF62 (**Figura 11a**). Por lo cual, las dos posibles afiliaciones taxonómicas de estas cepas, ya sea

Bacillus thuringiensis o *Bacillus toyonensis*, no muestran crecimiento a 50 °C y los reportes coinciden con las cinéticas de crecimiento obtenidas.

La secuenciación de genoma es la técnica más eficaz para identificar una especie (Dunlap et al., 2019), una estrategia es a través del índice general de relación del genoma (OGRI) (Chun & Rainey, 2014). Actualmente, se está trabajando en la afiliación taxonómica a nivel de especie a través de análisis genómicos de las 3 cepas *Bacillus* sp. AF53, *Bacillus* sp. AF56 y *Bacillus* sp. AF62.

Por otro lado, la población termotolerante, la cual mostró crecimiento a 50 °C se conforma por 4 cepas, dos de ellas pertenecientes a la misma especie, *B. velezensis* AF12 y *B. velezensis* AF52. Torres et al., (2020) evaluaron el crecimiento de la cepa *B. velezensis* XT1 en el rango de temperaturas de 4 a 45 °C, encontrando que XT1 tiene la capacidad de crecer únicamente de 15 a 40 °C, esto no concuerda con nuestros resultados ya que *B. velezensis* AF12 y *B. velezensis* AF52 pueden crecer hasta 50 °C (**Figura 11b**). Dikshit et al., (2020) evaluaron una cepa de *B. velezensis* a 15, 20, 25, 30, 35, 40 y 45 °C, su cepa fue capaz de crecer dentro de este rango de temperaturas, y, además, reportaron un crecimiento máximo a 30 °C, desafortunadamente no sobrepasaron el límite mesófilo. Sin embargo, también existen reportes de *B. velezensis* con crecimiento a 50 °C, como la cepa *B. velezensis* NKG-2 que puede crecer de 15 a 50 °C (Myo et al., 2019), así como la cepa *B. velezensis* 9D-6 la cual se evaluó su crecimiento a las temperaturas de 12 a 50 °C, mostrando crecimiento en todas ellas, además, también se reporta como temperatura óptima de crecimiento a 30 °C (Grady et al., 2019). Los reportes donde se menciona la temperatura óptima de crecimiento de 30 °C difieren con lo observado en la cinética de crecimiento de *B. velezensis* AF12, en la cual el máximo crecimiento se observó a 40 °C. Con respecto a *B. velezensis* AF52, no existe una diferencia notable con las temperaturas de 37 °C y 30 °C en las cuales fue se observó el máximo crecimiento (**Figura 11b**).

Otro integrante de la población termotolerante es *B. halotolerans* AF23, el cual en la cinética de crecimiento mostró un mayor crecimiento a 37 °C, así como también fue capaz de crecer a 50 °C (**Figura 11b**). Contrario a lo que reportamos, la cepa *B. halotolerans* BFOA1 mostró un mayor crecimiento a 30 °C, de las temperaturas 30,

37 y 45 °C que fue evaluada (Slama et al., 2019). Otro reporte similar al anterior es el de Song et al., (2017), en donde, de igual forma se evaluó el crecimiento de dos cepas de *B. halotolerans* a diferentes temperaturas, encontrando la capacidad de crecer de 15 a 45 °C, siendo la temperatura óptima de crecimiento los 30 °C. Wang et al., (2023), reportaron el rango de temperatura de crecimiento de la cepa *B. halotolerans* B28 de 20 a 50 °C, aunque este reporte muestra la capacidad de esta especie para crecer a 50 °C, nuevamente se reporta un óptimo de temperatura de crecimiento de 30 °C, diferente a lo encontrado en *Bacillus halotolerans* AF23. Patil et al., (2021) mencionan que la temperatura óptima de crecimiento de *Bacillus halotolerans* es de 37 °C.

B. amyloliquefaciens AF42 fue capaz de crecer hasta 50 °C, mostrando el mayor crecimiento a los 40 °C (**Figura 11b**). la capacidad de crecimiento a 50 °C coincide con la cepa *B. amyloliquefaciens* WF2020 reportada por Chen et al., (2022), en la cual se observa que puede crecer desde 25 hasta 50 °C, sin embargo, la temperatura óptima de crecimiento de WF2020 fue de 37 °C, temperatura cercana a 40 °C. Olajuyigbe (2017) evaluó el crecimiento de la cepa *B. amyloliquefaciens* PFB-02 bajo cuatro diferentes temperaturas, 30, 40, 50 y 60 °C, se observó que PFB-02 fue capaz de crecer hasta 60 °C, además, la temperatura con mayor crecimiento observado fue a 40 °C, al igual que lo observado con *Bacillus amyloliquefaciens* AF42.

Las variaciones en las temperaturas de crecimiento de una misma especie se pueden deber principalmente al ambiente en el cual estén habitando, esto lo demostró Hurtado-Bautista et al., (2021) al evaluar algunos aislados de *B. subtilis* proveniente de dos distintos ambientes con condiciones ambientales diferentes, un ambiente nombrado laguna templada con un rango de temperatura de 17 a 40 °C y un ambiente nombrado aguas termales, con un rango de temperatura de 48 a 70 °C. Evaluaron la tasa de crecimiento de cepas de *Bacillus subtilis* a 17, 27, 37, 43, 46, 49, 55 °C y observaron que los aislados provenientes del ambiente con mayor temperatura (aguas termales) tenían una mayor mayor tasa de crecimiento a 49 y 55 °C con respecto a los aislados provenientes del ambiente de la laguna templada. También realizaron la misma comparación en las mismas temperaturas con aislados

de *B. cereus* encontrando un comportamiento similar, mayor tasa de crecimiento en temperaturas de 46 y 49 °C por los aislados provenientes de las aguas termales (ambiente con mayor temperatura).

Las temperaturas de crecimiento de los miembros del género *Bacillus* es variable, se establece que las temperaturas óptimas de crecimiento oscilan entre 25 y 37 °C, aunque algunas cepas psicrófilas pueden crecer a temperaturas tan bajas como 3 °C y algunas cepas termófilas pueden crecer a 75 °C (Schoeni y Wong, 2005).

La evaluación de la termotolerancia en bacterias que se proponen como PGPR resulta especialmente relevante en el contexto de la tendencia del aumento global en la temperatura (IPCC, 2023). Este aspecto adquiere importancia debido a la necesidad de comprender cómo estas bacterias pueden adaptarse y funcionar eficientemente en condiciones de calor crecientes en el entorno, lo que tiene implicaciones significativas para su aplicabilidad en la promoción del crecimiento de las plantas en un escenario de cambio climático (Khan et al., 2020a).

Las plantas pueden verse afectadas por estrés de tipo biótico causado por organismos vivos, incluidos nematodos, insectos, bacterias y hongos, principalmente. Mientras que el estrés abiótico incluye sequías, contaminantes ambientales, salinidad y temperaturas extremas (Santoyo et al., 2021). De manera natural, los factores bióticos como la infección por patógenos fúngicos y los factores abióticos como el aumento en la temperatura, coexisten de forma simultánea y afectan la salud de las plantas.

Un aspecto importante que pueden exhibir las PGPR, es la capacidad para antagonizar patógenos. Por ejemplo, *B. amyloliquefaciens* DHA6 suprime la marchitez por *Fusarium*, causada por *F. oxysporum* f. sp. *niveum* (Fon) que afecta sandía. Se encontró que DHA6 produce diversos compuestos antimicrobianos, como iturina, surfactina, bacilomicina, syringfactina y pumilacidina. Algunos de estos exhibieron una actividad antifúngica significativa contra Fon al inducir estrés oxidativo y alterar la integridad estructural, inhibiendo el crecimiento micelial y la germinación de esporas (Al-Mutar et al., 2023).

Se evaluó el antagonismo de las 8 cepas seleccionadas (4 termosensibles y 4 termotolerantes) mencionadas anteriormente hacia los patógenos fúngicos (*B. cinerea*, *G. candidum*, *F. brachygibbosum* y *B. rhodina*) a diferentes temperaturas. De forma preliminar, se evaluó la termotolerancia de los hongos a los 28, 32, 35, 37 y 40 °C.

B. cinerea fue el hongo que presentó un crecimiento a una mayor temperatura, 37°C (**Figura 6a**). Curiosamente, según lo informado por Romanazzi y Feliziani (2014), la temperatura mínima para el crecimiento de *B. cinerea* es 0 °C, la óptima es 20°C y la máxima es 30 °C, aunque probablemente esto difiere entre cepas e influya la fuente de aislamiento. Por otra parte, el crecimiento de *F. brachygibbosum* disminuyó de forma drástica a los 35 °C y fue casi nulo a los 37 °C (**Figura 6b**). Esto coincide con otros autores, que establecen que *F. brachygibbosum* crece desde los 10°C hasta los 35°C y la temperatura óptima de crecimiento es de 25°C (Ezrari et al., 2021), esta última podría explicar el poco crecimiento que presentó a los 35 y 37 °C. *B. rhodina* logró crecer hasta 37 °C, sin embargo, su crecimiento comienza a disminuir con respecto a las temperaturas inferiores (**Figura 6c**).

De acuerdo con Eliskases-Lechner (2002), *G. candidum* crece a temperaturas que oscilan entre 5 y 38 °C; la temperatura óptima es de 25 °C. No obstante, la cepa evaluada tuvo un crecimiento muy inferior a los 35 y 37 °C, respecto al crecimiento en 28 °C (**Figura 6d**), lo que sugiere que su crecimiento óptimo puede oscilar entre los 25 y 28°C. *Botrytis* sp. fue el hongo más susceptible a la temperatura, ya que únicamente creció a los 28 °C y de una forma deficiente, desafortunadamente, no se tiene una afiliación taxonómica a nivel de especie de esta cepa sensible a la temperatura (**Figura 6e**).

En la revisión escrita por Mouchacca (2007), se menciona que un hongo termófilo es aquel que crece a una temperatura máxima de 50 °C o más, y a una mínima de 20 °C o más; un hongo termotolerante es aquel que tiene un máximo térmico cercano a los 50 °C y un mínimo muy por debajo de los 20 °C. Algunos de los géneros termófilos más comunes son, *Thermomyces*, *Aspergillus*, *Thermoascus*, *Rhizomucor*, *Chaetomium*, y *Mycothermus*. Los hongos *A. fumigatus* y *R. pusillus* fueron aislados de maíz recolectado en silos, estos hongos fueron cultivados a 50

°C e identificados por PCR utilizando oligonucleótidos con secuencias de los genes ITS. Es importante mencionar que estos hongos provenientes del maíz tienen importancia en la salud humana. *A. fumigatus*, es la causa principal de la aspergilosis, una micosis humana común y a menudo mortal, mientras que, *R. pusillus*, causa enfermedades pulmonares, enfermedades rinofaciales y endocarditis micótica en pacientes inmunocomprometidos (Sandona et al., 2019). Ninguno de los hongos evaluados en el presente estudio tuvo un crecimiento cercano a los 50 °C (**Figura 6**).

Las temperaturas a las cuales se realizaron los ensayos de antagonismo fueron establecidas y son 28 y 32 °C para *F. brachygibbosum*, *G. candidum* y *B. rhodina*, de 28, 32, 35 y 37 °C para *B. cinerea* y con respecto a *Botrytis* sp., este fitopatógeno fúngico fue descartado por su alta susceptibilidad a la temperatura, ya que incluso a 28 °C su crecimiento fue limitado. De manera uniforme, se encontró que las bacterias termotolerantes presentaron una mayor actividad antifúngica respecto a las termosensibles. Destacando principalmente contra *B. cinerea*, ensayo en el cual se observó una actividad antagónica de 4.7 veces más por parte de la población termotolerante con respecto a la termosensible. En el caso de *F. brachygibbosum*, la población termotolerante tiene una actividad antagónica de 1.27 veces más a la población termosensible, para *G. candidum* la población termotolerante tiene una actividad antagónica de 1.18 veces más a la población termosensible y para *B. rhodina* la población termotolerante tiene una actividad antagónica de 1.89 veces más a la población termosensible.

Los estudios de *B. aryabhattai* se ha centrado principalmente en la biorremediación, la biosíntesis y la promoción del crecimiento de las plantas. Nuestra cepa *B. aryabhattai* AF27 muestra antagonismo contra *F. brachygibbosum*. Algunos reportes de esta especie donde se describe su capacidad de biocontrol son los siguientes.

B. aryabhattai AYG1023 mostró actividad antagonista contra *Penicillium expansum* (≈80%), causante del moho azul en pera Huangguan. Así como como también mostró actividad antagónica por compuestos orgánicos volátiles contra los hongos *A. alternata* (≈70%), *B. dothidea* (≈60%) y *B. cinerea* (≈50%). A esta actividad se le

atribuye principalmente a la liberación del compuesto orgánico volátil 2-nonanol (Song et al., 2024). El reporte anterior difiere con nuestros resultados ya que AF27 no tiene antagonismo hacia *B. cinerea*, por lo que existen cepas de esta especie que cuentan diferentes funciones. Otro estudio donde evalúan la capacidad de biocontrol de *B. aryabhattai* es el de la cepa MAS400, en la cual Soliman (2020) la reporta como antagonista de *Ralstonia solanacearum*, una de bacteria fitopatógena que habita el suelo y coloniza el xilema de las plantas produciendo marchitamiento, así como también se reportó la capacidad por MAS400 de disminuir la incidencia de enfermedad por *Ralstonia solanacearum* en plantas de tomate en un 40%.

Además, también se ha reportado actividad nematicida por *B. aryabhattai*. Esto por Antil et al., (2021), donde evalúan esta actividad de su cepa KMT-4 contra *Meloidogyne javanica*, un nematodo que infecta tomate causando una reducción en el crecimiento y rendimiento en cultivos. A través de un experimento en maceta con berenjena se observó una notable reducción de la población final de nemátodos en las plantas tras 45 días.

Las cepas *Bacillus* sp. AF53, *Bacillus* sp. AF56 y *Bacillus* sp. AF62 mostraron antagonismo contra *F. brachygibbosum* y *G. candidum*. Una de las posibles afiliaciones taxonómicas es *B. thuringiensis*, Zheng et al., (2013) observaron que la cepa *B. thuringiensis* TB72 mostró antagonismo contra *Colletotrichum gloeosporioides*, inhibiendo su crecimiento en un 87 %, identificaron algunos compuestos volátiles con efecto de inhibición sobre este patógeno, los cuales son 2-nonanona, b-benceno-tanamina y 2-decanona, timol. En el grupo de trabajo, anteriormente se ha evaluado la actividad antagónica de *B. thuringiensis* CR71, esto lo reportó Morales-Cedeño et al., (2023), diferente a lo encontrado con AF53, AF56 y AF62, CR71 no mostró antagonismo contra *F. brachygibbosum* y *G. candidum*, por otra parte, si mostró antagonismo contra *B. cinerea* en un 19.7 % mientras que nuestras cepas no antagonizaron a este fitopatógeno, además, el mejor efecto antagonista de CR71 fue observado contra *A. alternata* (22%). Akintokun et al., (2020) encontraron una cepa de *B. thuringiensis* con actividad antagónica al género *Fusarium*. Su cepa logró antagonizar a *F. oxysporum* f. sp. en un 92 %. Por lo que

nuestras cepas pudiesen tener actividad antagónica contra diferentes especies de *Fusarium*.

Con respecto a la otra posible afiliación taxonómica de estas tres *Bacillus* sp. hacia *B. toyonensis*, (Morales-Cedeño et al., 2023) evaluaron la actividad antagónica de *B. toyonensis* COPE52 contra distintos fitopatógenos, encontraron que tiene antagonismo contra *Botrytis* sp., además, también evaluaron su actividad contra *F. brachygibbosum* y *G. candidum*, pero a diferencia del antagonismo que nosotros observamos, COPE52 no logró antagonizar a estos fitopatógenos. La cepa *B. toyonensis* FORT22 logró inhibir el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. lycopersici raza II en un 29.9 %, también evaluaron las razas I y III, en las cuales se observó un menor porcentaje de inhibición (17 y 11 % respectivamente). Además, controló el 100% de la enfermedad ocasionada por la raza II en plantas de tomate (Rocha et al., 2017). Nuestras cepas también logran antagonizar a una especie del género *Fusarium*, por lo que pudiesen presentar esta actividad contra otras especies.

B. velezensis AF12 y *B. velezensis* AF52 mostraron antagonismo contra *Botrytis cinerea*, *F. brachygibbosum*, *G. candidum* y *B. rhodina*. Nifakos et al., (2021) también describen a la cepa de *B. velezensis* Bvel1 con actividad antagónica hacia *B. cinerea*, a través de cromatografía líquida de ultra alto rendimiento encontraron los componentes iturina A2, surfactina-C13 y -C15, oxidifidicina, bacilibactina, L-dihidroanticapsina y ácido azelaico relacionados al metabolismo secundario de Bvel1, así como también observaron el biocontrol del moho gris en uvas heridas. *B. velezensis* FX-6 está reportado por tener antagonismo contra diversos hongos fitopatógenos, entre ellos *F. oxysporum*, FX-6 logró inhibir el crecimiento micelial en un ≈65 %, demostrando que *B. velezensis* es una bacteria con un amplio espectro antifúngico (Li et al., 2023). Otro estudio donde se evalúa el antagonismo de *B. velezensis* cepa G341 contra múltiples agentes fúngicos es el realizado por (Lim et al., 2017), dentro de su colección de hongos evaluados se encuentra a *B. cinerea* y *F. oxysporum*. A través de espectrometría de masas se identificaron dos compuestos antifúngicos de la cepa G341 y se identificaron como bacilomicina L y fengicina A. Recordemos que en *B. velezensis* AF12 se identificó *in silico* a la fengicina, un compuesto con actividad antifúngica.

La cepa KLBC XJ-5 de *B. halotolerans* mostró antagonismo contra *B. cinerea* de un 78 %, además, controló el moho gris en fresas inoculadas con este hongo, en las fresas infectadas con *B. cinerea* e inoculadas con *B. halotolerans* KLBC XJ-5 fue menor la incidencia de la enfermedad en comparación con el de la fruta infectada después de 4 días de incubación (Wang et al., 2021). Además, también se reporta a *B. halotolerans* como un agente de biocontrol de múltiples hongos, Li et al., (2022) reportan a *B. halotolerans* QTH8 con actividad antagonista hacia *Hainesia lythri*, *Pestalotiopsis* sp. *Curvularia lunata*, *Phyllosticta theaeefolia*, *Phytophthora nicotianae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, así como hacia *B. cinerea* y *F. graminearum* con un diámetro de inhibición promedio de 31.25 y 30.97 mm respectivamente. Nuestra cepa AF23 mostró antagonismo contra todos los 4 hongos fitopatógenos evaluados, entre ellos se encuentra *B. cinerea* y *F. brachygibbosum*, géneros evaluados en los reportes mencionados.

Chen et al., (2018) evaluaron la actividad antagónica de *B. amyloliquefaciens* DH-4 contra varios fitopatógenos distintos, entre ellos se encontraba *G. citri-aurantii* y *Botryosphaeria dothidea*, mostrando antagonismo contra estos dos fitopatógenos fúngicos, inhibiendo 18.9 y 30.4 mm de su crecimiento. En nuestro estudio, AF42 fue capaz de antagonizar a un integrante del género *Geotrichum* y otro de *Botryosphaeria*, por lo que nuestra cepa podría antagonizar a otras especies de estos géneros, además mostró antagonismo contra *B. cinerea* y *F. brachygibbosum*. El estudio de Ye et al., (2021) demuestra el antagonismo contra amplio espectro de hongos fitopatógenos por *B. amyloliquefaciens* B4, se reporta antagonismo por B4 contra *Penicillium expansum*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, así como contra 3 géneros fúngicos evaluados con AF42, *F. oxysporum*, *B. cinerea* y *Botryosphaeria* sp.. Además, B4 logra biocontrolar a *P. expansum* en frutos de manzana, el cual es uno de los principales patógenos postcosecha en manzana, níspero y kiwi. La inoculación de B4 en frutos de manzana reduce la tasa de incidencia de *P. expansum* a un 33.33 %. Los autores realizaron pruebas de toxicidad oral sugiriendo que *B. amyloliquefaciens* B4 no es tóxico, lo que lo convierte en un agente de biocontrol adecuado en frutos postcosecha.

Aunque hasta nuestro conocimiento, no existen reportes de ensayos de antagonismo a diferentes temperaturas, cepas termotolerantes como *B. amyloliquefaciens* S185 que puede crecer hasta los 50 °C, presentó actividad antifúngica hacia *F. oxysporum* f. sp. cubense (Foc) que afecta al plátano. Adicionalmente, S185 produjo iturina A5 un compuesto antifúngico que causó graves cambios morfológicos durante la germinación de las esporas y el crecimiento de las hifas de Foc (Singh et al., 2021). Este papel antagonista podría estar presente contra hongos termotolerantes que puedan crecer en temperaturas >35 °C.

Los ensayos de antagonismo a diferente temperatura muestran que este factor tiene efecto en la capacidad de antagonizar de los aislados *Bacillus*. Con *F. brachygibbosum*, los aislados *B. aryabhattai* AF27, *Bacillus* sp. AF62, *B. halotolerans* AF23, *Bacillus amyloliquefaciens* AF42 y *B. velezensis* AF52, mostraron un mayor antagonismo a 32 °C con respecto a 28 °C (**Figura 7**).

Con *G. candidum*, solo se observaron dos aislados con cambios en su efecto antagonista, en *B. aryabhattai* AF27 con la ausencia de antagonismo y *Bacillus* sp. AF62 que el porcentaje de inhibición fue mayor a 32 °C con respecto a 28 °C (**Figura 8**).

Los resultados en los ensayos con *B. rhodina* muestran que solo *B. velezensis* AF52, muestra cambio en su efecto antagonista, siendo el porcentaje de inhibición mayor a 32 °C con respecto a 28 °C (**Figura 9**). Finalmente, los ensayos con *B. cinerea* fueron en los cuales más cambios se observaron. La población termosensible conformada por *B. aryabhattai* AF27 no mostró antagonismo a 35 y 37 °C, *Bacillus* sp. AF53 y *Bacillus* sp. AF56 disminuyeron el porcentaje de inhibición a 35 y a 37 °C ya no se observa esta función, mientras que para *Bacillus* sp. AF62, se observa una disminución del porcentaje de inhibición a 37 °C.

La población termotolerante conformada por *B. velezensis* AF12, no mostró diferencia en su efecto antagonista en las temperaturas evaluadas, *B. halotolerans* AF23 redujo su efecto a 37 °C, *B. amyloliquefaciens* AF42 aumentó su actividad antagónica a 32 °C y *B. velezensis* AF52, aumentó su actividad a 32 y 35 °C (**Figura 10**).

Los ensayos a diferentes temperaturas permiten observar una variación dependiendo de la especie, así como termotolerancia en el efecto antagonista hacia hongos fitopatógenos.

Ali et al., (2023), investigaron cómo el estrés por temperatura afecta la funcionalidad de genes clave tolerantes al estrés y de promoción del crecimiento vegetal (PGP) de *Bacillus* sp. IHBT-705, una cepa aislada de la rizosfera de azafrán. IHBT-705 se cultivó bajo diversos regímenes de temperatura, sus rasgos PGP se evaluaron desde un rango de temperatura muy bajo a muy alto y se analizó la tendencia de expresión de genes PGP y tolerantes al estrés específicos. Los resultados mostraron que *Bacillus* sp. IHBT-705 es una cepa tolerante al estrés por temperatura, ya que sobrevivió y se multiplicó en temperaturas que oscilaban entre 4 y 50°C. Se encontró que ciertos genes como *cspB*, *cspD*, *hslO*, *grpE*, *rimM*, *trpA*, *trpC*, *trpE*, *fhuC*, *fhuD*, *acrB5* eran sensibles a la temperatura, mientras que otros eran tolerantes al frío (*nhaX*) y (*cspC*). El gen (*pstB1*) implicado en la solubilización de fosfato fue tolerante al calor, la producción de sideróforos (*fhuB* y *fhuG*) y la colonización de raíces (*xerC1* y *xerC2*) resultaron ser muy versátiles, ya que podían expresarse bien tanto en temperaturas bajas como altas. De una forma similar, es posible que las 8 bacterias evaluadas tanto termotolerantes como termosensibles, que presentaron antagonismo, tengan activos algunos genes implicados en la promoción del crecimiento vegetal, así como en el antagonismo, que les hayan permitido mantener su actividad antagonista a las diferentes temperaturas evaluadas.

Los microorganismos termófilos y termotolerantes resultan de interés debido a sus procesos celulares y metabólicos únicos que les permiten permanecer viables y prosperar a altas temperaturas. Si bien existen numerosos y diversos mecanismos que confieren tolerancia a altas temperaturas, normalmente se agrupan en categorías conceptuales como: a) propiedades enzimáticas (por ejemplo, mayor número de enlaces disulfuro para mejorar la estabilidad de las proteínas); b) el procesamiento postraduccion de la biosíntesis de proteínas (fosforilación para regular la actividad de las enzimas); c) la regulación postranscripcional del metabolismo del ARN (chaperonas moleculares que incluyen ciertas proteínas de

choque térmico y de choque frío); y d) metabolismo de membrana (cambio en los componentes de membrana) (Zhou et al., 2021).

Existen pocos reportes de la composición de los lípidos de membrana en función de la temperatura, y son más escasos los reportes que involucran al género de *Bacillus*, además, no realizan evaluaciones en temperaturas superiores al rango mesófilo (Merino et al., 2019). En la presente investigación los resultados del análisis de los lípidos de membrana en función de la temperatura de dos poblaciones, una termosensible (temperatura máxima de crecimiento a 40 °C) y una termotolerante (temperatura máxima de crecimiento a 50 °C), permite descubrir su importancia en la tolerancia a temperaturas altas.

La composición de lípidos de membrana de bacterias se modifica en respuesta de factores ambientales a las cual están expuestas, esto como un mecanismo de adaptación (Luchini et al., 2021). En los experimentos de este trabajo, se evaluaron los lípidos de membrana de dos poblaciones de bacterias, una termosensible y una termotolerante expuestas a estrés por temperatura. Los resultados mostraron una disminución en la abundancia de PE y un incremento de CL a mayores temperaturas con respecto a la temperatura de 30°C (temperatura más baja evaluada) para ambas poblaciones. Por otra parte, El PG y otros lípidos no identificados se comportaron de forma variable (**Tabla 4 y 5**).

Uno de los estudios que trabajan con el género *Bacillus* es el realizado por Haque y Russell (2004), ellos evaluaron los lípidos de membrana a las temperaturas de 15 °C y 37 °C de distintas cepas de *B. cereus*. El comportamiento de la PE es similar a nuestros resultados, ya que en la temperatura mayor que ellos evalúan (37 °C), la abundancia disminuye, por otro lado, la CL se encuentra en mayor abundancia a la temperatura de 15 °C, esto difiere a lo encontrado en nuestro estudio y, a pesar de que se trata del mismo género, puede explicarse con las temperaturas que se evaluaron, ya que, aunque *B. cereus* puede crecer de 4 °C hasta 48 °C, su temperatura óptima de crecimiento es de 28 °C a 35 °C (Batt, 2014), por lo que a 15 °C podría estar expuesta a estrés por temperatura, reflejándose en el aumento de la CL.

Un comportamiento similar de la CL sucedió en una cepa de la población termotolerante, la cepa *B. halotolerans* AF23 mostró una abundancia inferior de CL en las temperaturas de 37 y 40 °C con respecto a las temperaturas de 30 y 50 °C (**Tabla 5**). Se ha reportado un crecimiento máximo a 37 °C esta misma especie (Patil et al., 2021) y eso concuerda con la cinética de crecimiento obtenida en el presente estudio, en la cual, la mayor densidad óptica registrada fue en la temperatura de 37 °C, seguido de 40 °C después de 36 horas de incubación. Por lo que *Bacillus halotolerans* AF23 a las temperaturas de 30 y 50 °C se encuentra bajo estrés por este factor, resultando en una mayor abundancia de CL.

Kaneko et al., (2000), evaluaron los fosfolípidos de membrana de *Pseudomonas* sp. BT1 en función de las temperaturas 20, 30 y 37 °C, encontrando un incremento de CL conforme la temperatura incrementa, por lo que podemos decir que la CL incrementa bajo estrés por temperatura en diversos géneros bacterianos, aunque esto dependerá directamente de la especie con la cual se evalúe, debido a que los factores estresantes son variables y afectan de forma particular. Paulucci et al., (2015) evaluaron los lípidos de membrana de la cepa L115 de *Ochrobactrum intermedium* bajo condiciones de salinidad a 300 mM a dos temperaturas diferentes, 28 y 37°C, encontrando que la CL no modifica de forma significativa su presencia debido a estos dos factores, sin embargo, similar a nuestro estudio, la PE disminuye en la temperatura de 37 °C con respecto a 28 °C, así como se ve más reducida cuando se combina 37 °C y NaCl. Por lo anterior, la PE también disminuye a mayor temperatura y condiciones estresantes entre diferentes géneros bacterianos.

La CL desempeña un papel esencial en la adaptación de una gran variedad de bacterias ante diferentes tipos de estrés ambiental, entre ellos el estrés por sal. Rojas-Solis et al., (2023) realizaron dos mutantes de los genes *clsA* y *clsB* que codifican a CL en cepa UM270 de *Pseudomonas fluorescens*, observaron que ambas mutantes, producían menos CL a una concentración de 200 mM de NaCl (58% y 53% respectivamente) con respecto a la cepa silvestre. Con relación a su crecimiento, encontraron que solamente existe una disminución cuando se cultiva a 100 mM (a partir de las 20 horas de incubación) y 200 mM de NaCl (a partir de las 15 horas de incubación). Por otra parte, López et al., (2006) también realizaron

mutantes en el gen *clsA* de *B. subtilis* el cual resultó en una completa deficiencia de CL, esta mutante mostró un crecimiento inferior con respecto a la cepa silvestre cuando fue crecida en condiciones de salinidad a 1.2 M y 1.5 M de NaCl, indicando la importancia de la CL en el crecimiento bacteriano al ser expuestos bajo condiciones de estrés por salinidad.

Además del cambio en los lípidos de membrana, otro mecanismo de adaptación empleado por bacterias bajo situaciones de estrés es la modificación de los ácidos grasos (Yoon et al., 2015). Por ejemplo, a medida que aumenta la temperatura, es común observar un incremento en la proporción de ácidos grasos saturados y de cadena larga dentro de la membrana ya que tienen un papel importante al mantener la fluidez membranal en función del factor estresante al cual se encuentren expuestos, como la temperatura (Mrozik et al., 2004).

En la cepa SEMIA 6144 de *Bradyrhizobium* se observa una disminución de ácidos grasos insaturados y un aumento de ácidos grasos saturados a 37 °C con respecto a 28 °C, aunque los autores sólo evalúan estas dos temperaturas, permite comprobar la importancia de estas modificaciones en función de la temperatura (Paulucci et al., 2011). En el presente estudio se está llevando a cabo el procesamiento de la composición de ácidos grasos de las poblaciones termosensibles y termotolerantes, para de esta forma conocer la variación de estos compuestos en la membrana bacteriana al encontrarse bajo estrés por temperatura. *Bacillus* spp. ha sido reconocido por su capacidad para potenciar el crecimiento de los cultivos, tanto de manera directa como indirecta. Estos microorganismos no solo exhiben la habilidad de fortalecer la resistencia de las plantas hacia fitopatógenos, sino que también contribuyen a mejorar las propiedades del suelo, consolidándose como un candidato relevante para promover prácticas agrícolas sostenibles (Khan et al., 2022). Por lo que el uso de *Bacillus* spp. tolerantes a la temperatura es una atractiva herramienta para el uso de fungicidas y fertilizantes químicos, bajo el escenario de calentamiento global y aumento poblacional para garantizar la seguridad alimentaria.

9. RESUMEN DE RESULTADOS

Se identificó la posible afiliación taxonómica de grupos de aislados termosensibles y termotolerantes.

Existe una separación de clados que incluyen aislados termosensibles y termotolerantes; así como sus temperaturas óptimas de crecimiento.

Los aislados termotolerantes mantienen su antagonismo a temperaturas elevadas, en particular, contra *B. cinerea*.

Los aislados termosensibles y termotolerantes modulan diferencialmente sus lípidos de membrana para resistir el estrés térmico.

La cardiolipina podría tener un papel importante en la sobrevivencia al estrés térmico en *Bacillus* spp..

10. CONCLUSIÓN

Los aislados termotolerantes de *Bacillus* spp. modulan diferencialmente sus lípidos de membrana y son capaces de mantener el efecto antifúngico bajo estrés térmico.

11. PERSPECTIVAS

Determinar la acción estimuladora del crecimiento vegetal en las especies de bacterias termotolerantes bajo diferentes temperaturas de incubación, así como evaluar su efecto promotor del crecimiento en plantas estresadas por temperatura y en plantas infectadas con un fitopatógeno.

La formación de dos clados con base en la termosensibilidad y termotolerancia es dato relevante. Los análisis a través de los genomas de los 8 aislados distribuidas en ambas poblaciones permitirán realizar un análisis de genómica comparativa a nivel de población, e indagar sobre los determinantes genéticos involucrados en la resistencia al estrés por temperatura.

12. BIBLIOGRAFÍA

- Aabed, K., Almutairi, A., Al-shwuair, A., Al-otaibi, A., Alhazzani, A., Al-shbi, A., Almoegelh, H., Al-assaf, L., & Al-omri, S. (2021). Diversity and distribution of thermophiles and thermotolerant bacteria in the soil samples obtained from different regions in Saudi Arabia. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 18(1), 163–172. <https://doi.org/10.13005/bbra/2904>
- Ağçeli, K. G. (2023). Similarities and differences of nano-sized levan synthesized by *Bacillus haynesii* at low and high temperatures: Characterization and bioactivity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 253, 126804. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126804>
- Ahmad, M. S., Abdel-Fattah, M., Othman, A. M., & Saad, W. F. (2018). L-asparaginase production by a thermotolerant *Bacillus* sp. WF67: Nutritional and cultural parameters optimization. *Bioscience Research*, 15(2), 1390–1400.
- Akintokun, P. O., Okuwa, A. O., Oloyede, A. R., Adebajo, S. O., & Akintokun, A. K. (2020). Potentials of indigenous *Bacillus thuringiensis* Isolates from the soil in controlling *Fusarium* wilt of cucumber cause by *Fusarium oxysporum* f.sp *cucumerinum*. *Nigerian Journal of Biotechnology*, 37(1), 129–137. <https://doi.org/10.4314/njb.v37i1.14>
- Albuquerque, L., Tiago, I., Taborda, M., Nobre, M. F., Veríssimo, A., & da Costa, M. S. (2008). *Bacillus isabeliae* sp. nov., a halophilic bacterium isolated from a sea salt evaporation pond. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 226–230. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65217-0>
- Alburqueque, D & Gusqui, R. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control *in vitro* de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25(2), 489–498.
- Ali, H. Z., Hameed, M. S., Abdulrahman, A. A., & Saood, H. M. (2020). First report on *Fusarium brachygibbosum* isolate FIR 16 ITS isolated from iraqi wheat plant. *Journal of Ecological Engineering*, 21(3), 81–86. <https://doi.org/10.12911/22998993/118295>
- Ali, N., Swarnkar, M. K., Veer, R., Kaushal, P., & Pati, A. M. (2023). Temperature-induced modulation of stress-tolerant PGP genes bioprospeted from *Bacillus* sp. IHBT-705 associated with saffron (*Crocus sativus*) rhizosphere: A natural -

- treasure trove of microbial biostimulants. *Frontiers in Plant Science*, 14(1141538), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1141538>
- Al-Mutar, D. M. K., Noman, M., Abduljaleel Alzawar, N. S., Azizullah, Li, D., & Song, F. (2023). Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* DHA6 are the determinants to suppress watermelon *Fusarium* wilt by direct antifungal activity and host defense modulation. *Journal of Fungi*, 9(6), 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof9060687>
- Amiri, A., Zuniga, A. I., Cordova, L. G., & Peres, N. A. (2019). The importance of selecting appropriate rotation and tank-mix partners for novel SDHIs to enhance botrytis fruit rot control in strawberry. *Plant Disease*, 103(4), 729–736. <https://doi.org/10.1094/PDIS-07-18-1276-RE>
- Antil, S., Kumar, R., Pathak, D. V., Kumar, A., Panwar, A., Kumari, A., & Kumar, V. (2021). On the potential of *Bacillus aryabhattai* KMT-4 against *Meloidogyne javanica*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00417-2>
- Antony, S., Billones-Baaijens, R., Stodart, B. J., Steel, C. C., Lang, M. D., & Savocchia, S. (2023). Incidence and distribution of Botryosphaeriaceae species associated with dieback in walnut orchards in Australia. *Plant Pathology*, 72(3), 610–622. <https://doi.org/10.1111/ppa.13685>
- Baard, V., Bakare, O. O., Daniel, A. I., Nkomo, M., Gokul, A., Keyster, M., & Klein, A. (2023). Biocontrol potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus tequilensis* against four *Fusarium* species. *Pathogens*, 12(2), 254. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020254>
- Backer, R., Rokem, J. S., Ilangumaran, G., Lamont, J., Praslickova, D., Ricci, E., Subramanian, S., & Smith, D. L. (2018). Plant growth-promoting rhizobacteria: context, mechanisms of action, and roadmap to commercialization of biostimulants for sustainable agriculture. *Frontiers in Plant Science*, 9(1473), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01473>
- Baghbani-Arani, Abolfazl., Poureisa, Mona., Alekajbaf, Hossein., Borz-Abad, R. Karami., & Khodadadi-Dashtaki, Khodadad. (2021). Investigating the status of transgenic crops in Iran in terms of cultivation, consumption, laws and rights in

- comparison with the world. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88713-7>
- Bai, N., He, Y., Zhang, H., Zheng, X., Zeng, R., Li, Y., Li, S., & Lv, W. (2022). γ -polyglutamic acid production, biocontrol, and stress tolerance: multifunction of *Bacillus subtilis* A-5 and the complete genome analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(13). <https://doi.org/10.3390/ijerph19137630>
- Barnawal, D., Bharti, N., Pandey, S. S., Pandey, A., Chanotiya, C. S., & Kalra, A. (2017). Plant growth-promoting rhizobacteria enhance wheat salt and drought stress tolerance by altering endogenous phytohormone levels and TaCTR1/TaDREB2 expression. *Physiologia Plantarum*, 16(4), 502–514. <https://doi.org/10.1111/ppl.12614>
- Batista, B. D., Dourado, M. N., Figueredo, E. F., Hortencio, R. O., Marques, J. P. R., Piotto, F. A., Bonatelli, M. L., Settles, M. L., Azevedo, J. L., & Quecine, M. C. (2021). The auxin-producing *Bacillus thuringiensis* RZ2MS9 promotes the growth and modifies the root architecture of tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). *Archives of Microbiology*, 203(7), 3869–3882. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02361-z>
- Batt, C. A. (2014). *Bacillus cereus*. In *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed., pp. 119–149).
- Béjar-Pulido, S. J., Cantú-Silva, Israel., González-Rodríguez, Humberto., Marmolejo-Moncivais, J. G., Yáñez-Díaz, M. I., & Luna-Robles, E. O. (2020). Effect of land use change and agricultural management on physical and hydrological properties of an Andosol in Uruapan, Michoacán. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y Del Ambiente*, 27(2), 323–335. <https://doi.org/10.5154/R.RCHSCFA.2020.04.032>
- Belair, M., Grau, A. L., Chong, J., Tian, X., Luo, J., Guan, X., & Pensec, F. (2022). Pathogenicity factors of Botryosphaeriaceae associated with grapevine trunk diseases: New developments on their action on grapevine defense responses. *Pathogens*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/pathogens11080951>

- Bhat, M. A., Kumar, V., Bhat, M. A., Wani, I. A., Dar, F. L., Farooq, I., Bhatti, F., Koser, R., Rahman, S., & Jan, A. T. (2020). Mechanistic insights of the interaction of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) with plant roots toward enhancing plant productivity by alleviating salinity stress. *Frontiers in Microbiology*, 11(1952), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01952>
- Bokhari, A., Essack, M., Lafi, F. F., Andres-Barrao, C., Jalal, R., Alamoudi, S., Razali, R., Alzubaidy, H., Shah, K. H., Siddique, S., Bajic, V. B., Hirt, H., & Saad, M. M. (2019). Bioprospecting desert plant *Bacillus* endophytic strains for their potential to enhance plant stress tolerance. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54685-y>
- Brauer, E. K., Subramaniam, R., & Harris, L. J. (2020). Regulation and dynamics of gene expression during the life cycle of *Fusarium graminearum*. *Phytopathology*, 110(8), 1368–1374. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-20-0080-IA>
- Bruno, L. B., Karthik, C., Ma, Y., Kadirvelu, K., Freitas, H., & Rajkumar, M. (2020). Amelioration of chromium and heat stresses in *Sorghum bicolor* by Cr6+ reducing-thermotolerant plant growth promoting bacteria. *Chemosphere*, 244, 125521. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125521>
- Caccamo, M. T., Gugliandolo, C., Zammuto, V., & Magazù, S. (2020). Thermal properties of an exopolysaccharide produced by a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* by ATR-FTIR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 145, 77–83. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.163>
- Cao, Y., Pi, H., Chandrangu, P., Li, Y., Wang, Y., Zhou, H., Xiong, H., Helmann, J. D., & Cai, Y. (2018). Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22782-z>
- Carmona-Hernandez, S., Reyes-Pérez, J. J., Chiquito-Contreras, R. G., Rincon-Enriquez, G., Cerdan-Cabrera, C. R., & Hernandez-Montiel, L. G. (2019). Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. *Agronomy*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>

- Chávez-Avila, Salvador. (2021). Evaluación de la actividad antifúngica de bacterias aisladas de suelos afectados por incendios subterráneos e inferencias genómicas de la cepa termotolerante *Bacillus* sp. AF12. *Tesis de Licenciatura*.
- Chen, D., Mubeen, B., Hasnain, A., Rizwan, M., Adrees, M., Naqvi, S. A. H., Iqbal, S., Kamran, M., El-Sabrout, A. M., Elansary, H. O., Mahmoud, E. A., Alaklabi, A., Sathish, M., & Din, G. M. U. (2022). Role of promising secondary metabolites to confer resistance against environmental stresses in crop plants: Current scenario and future perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.881032>
- Chen, G., Fang, Q., Liao, Z., Xu, C., Liang, Z., Liu, T., Zhong, Q., Wang, L., Fang, X., & Wang, J. (2022). Detoxification of aflatoxin B1 by a potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* WF2020. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.891091>
- Chen, K., Tian, Z., He, H., Long, C. an, & Jiang, F. (2020). *Bacillus* species as potential biocontrol agents against citrus diseases. *Biological Control*, 151. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104419>
- Chen, K., Tian, Z., Luo, Y., Cheng, Y., & Long, C. A. (2018). Antagonistic activity and the mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* DH-4 against citrus green mold. *Phytopathology*, 108(11), 1253–1262. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-17-0032-R>
- Chen, L., Heng, J., Qin, S., & Bian, K. (2018). A comprehensive understanding of the biocontrol potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight. *PLoS ONE*, 13(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198560>
- Chen, X. H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W. R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P. R., Vater, J., Süssmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., & Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 25(9), 1007–1014. <https://doi.org/10.1038/nbt1325>

- Chen, Y., Kistler, H. C., & Ma, Z. (2019). Annual review of phytopathology *Fusarium graminearum* trichothecene mycotoxins: Biosynthesis, regulation, and management. *Annual Review of Phytopathology*, 57, 15–39. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718>
- Chen, Y., Li, S., Liu, N., He, H., Cao, X., Lv, C., Zhang, K., & Dai, J. (2021). Effects of different types of microbial inoculants on available nitrogen and phosphorus, soil microbial community, and wheat growth in high-P soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 23036–23047. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-12203-y>/Published
- Chen, Y., Yang, H., Shen, Z., & Ye, J. (2022). Whole-genome sequencing and potassium-solubilizing mechanism of *Bacillus aryabhattai* SK1-7. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.722379>
- Cheng, H., Tang, W., Wang, H., Liu, Q., Li, H., & Liu, Y. (2021). First report of *Geotrichum candidum* causing postharvest sour rot on kiwifruits in China. *Plant Disease*, 105(05), 1566.
- Chenniappan, C., Narayanasamy, M., Daniel, G. M., Ramaraj, G. B., Ponnusamy, P., Sekar, J., & Vaiyapuri Ramalingam, P. (2019). Biocontrol efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric. *Biological Control*, 129, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.07.002>
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X. W., & Borriss, R. (2015). Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - A review. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>
- Chu, D., Ilyas, N., Peng, L., Wang, X., Wang, D., Xu, Z., Gao, Q., Tan, X., Zhang, C., Li, Y., & Yuan, Y. (2022). Genomic insights on fighting bacterial wilt by a novel *Bacillus amyloliquefaciens* strain Cas02. *Microbial Biotechnology*, 15(4), 1152–1167. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13925>
- Chun, J., & Rainey, F. A. (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the bacteria and archaea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 316–324. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.054171-0>
- Coffel, E. D., Horton, R. M., & de Sherbinin, A. (2018). Temperature and humidity based projections of a rapid rise in global heat stress exposure during the 21st

- century. *Environmental Research Letters*, 13(1). <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aaa00e>
- Cui, K., Zhao, Y., He, L., Ding, J., Li, B., Mu, W., & Liu, F. (2020). Comparison of transcriptome profiles of the fungus *Botrytis cinerea* and insect pest *Bradysia odoriphaga* in response to benzothiazole. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01043>
- Cutuli, M. T., Gibello, A., Rodriguez-Bertos, A., Blanco, M. M., Villarroel, M., Giraldo, A., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2015.06.002>
- Dai, Y., Wang, W., Lu, L., Yan, L., & Yu, D. (2020). Utilization of biochar for the removal of nitrogen and phosphorus. *Journal of Cleaner Production*, 257. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.120573>
- Danhorn, T., & Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 61, 401–422. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093316>
- Darge, W. A., & Woldemariam, S. S. (2021). Botryosphaeria tree fungal pathogens and their diversity. *International Journal of Phytopathology*, 10(1), 49–56. <https://doi.org/10.33687/phytopath.010.01.3447>
- De Angelis, G., Simonetti, G., Chronopoulou, L., Orekhova, A., Badiali, C., Petruccelli, V., Portoghesi, F., D'Angeli, S., Brasili, E., Pasqua, G., & Palocci, C. (2022). A novel approach to control *Botrytis cinerea* fungal infections: uptake and biological activity of antifungals encapsulated in nanoparticle based vectors. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-11533-w>
- de la Fuente, C. P., Valdés-Gómez, H., Roudet, J., Verdugo-Vásquez, N., Mirabal, Y., Laurie, V. F., Goutouly, J. P., Acevedo-Opazo, C., & Fermaud, M. (2020). Vigor thresholded NDVI is a key early risk indicator of *Botrytis* bunch rot in vineyards. *Oeno One*, 54(2), 279–297. <https://doi.org/10.20870/oenone.2020.54.2.2954>

- Dean, R., van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dèné, L., & Valiuškaitė, A. (2021). Sensitivity of *Botrytis cinerea* isolates complex to plant extracts. *Molecules*, 26(15). <https://doi.org/10.3390/molecules26154595>
- Di Francesco, A., Ugolini, L., D'Aquino, S., Pagnotta, E., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.007>
- Dikshit, R., Jain, A., Dey, A., & Kumar, A. (2020). Microbially induced calcite precipitation using *Bacillus velezensis* with guar gum. *PLoS ONE*, 15(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236745>
- Diomandé, S. E., Nguyen-The, C., Guinebretière, M. H., Broussolle, V., & Brillard, J. (2015). Role of fatty acids in *Bacillus* environmental adaptation. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00813>
- Dmitrović, S., Pajčin, I., Vlajkov, V., Grahovac, M., Jokić, A., & Grahovac, J. (2022). Dairy and wine industry effluents as alternative media for the production of *Bacillus*-based biocontrol agents. *Bioengineering*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/bioengineering9110663>
- Dunlap, C. A., Bowman, M. J., & Rooney, A. P. (2019). Iturinic lipopeptide diversity in the *Bacillus subtilis* species group – important antifungals for plant disease biocontrol applications. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01794>
- Dunlap, C. A., Schisler, D. A., Perry, E. B., Connor, N., Cohan, F. M., & Rooney, A. P. (2017). *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(8), 2720–2725. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002007>

- El-Bendary, M. A. (2006). *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production. *Journal of Basic Microbiology*, 46(2), 158–170. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510585>
- Eliskases-Lechner, F. (2002). *Geotrichum candidum*. In H. Roginski (Ed.), *Encyclopedia of Dairy Sciences* (pp. 1229–1234). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B0-12-227235-8/00184-X>
- Ezrari, S., Radouane, N., Tahiri, A., Amiri, S., Lazraq, A., & Lahlali, R. (2021). Environmental effects of temperature and water potential on mycelial growth of *Neocosmospora solani* and *Fusarium* spp. causing dry root rot of citrus. *Current Microbiology*, 78(8), 3092–3103. <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02570-1>
- Fatima, Zartash., Ahmed, Mukhtar., Hussain, Mubshar., Abbas, Ghulam., Ul-Allah, Sami., Ahmad, Shakeel., Ahmed, Niaz., Ali, M. Arif., Sarwar, Ghulam., Haque, E. ul., Iqbal, Pakeeza., & Hussain, Sajjad. (2020). The fingerprints of climate warming on cereal crops phenology and adaptation options. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74740-3>
- Femenias, A., Gatus, F., Ramos, A. J., Sanchis, V., & Marín, S. (2020). Use of hyperspectral imaging as a tool for *Fusarium* and deoxynivalenol risk management in cereals: A review. *Food Control*, 108. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106819>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Flores, A., Diaz-Zamora, J. T., Orozco-Mosqueda, M. del C., Chávez, A., de los Santos-Villalobos, S., Valencia-Cantero, E., & 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(5). <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02209-1>
- Flores-Piña, Aurora. (2021). Análisis de la estructura y diversidad de las comunidades microbianas en suelo a través de un gradiente de temperatura. *Tesis de Maestría*.

- Folberth, Christian., Khabarov, Nikolay., Balkovič, Juraj., Skalský, Rastislav., Visconti, Piero., Ciais, Philippe., Janssens, I. A., Peñuelas, Josep., & Obersteiner, Michael. (2020). The global cropland-sparing potential of high-yield farming. *Nature Sustainability*, 3(4), 281–289. <https://doi.org/10.1038/s41893-020-0505-x>
- Gamalero, E., & Glick, B. R. (2022). Recent advances in bacterial amelioration of plant drought and salt stress. *Biology*, 11(437), 1–26. <https://doi.org/10.3390/biology11030437>
- Garfinkel, A. R. (2021). The history of *Botrytis* taxonomy, the rise of phylogenetics, and implications for species recognition. *Phytopathology*, 111(3), 437–454. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-06-20-0211-IA>
- Gatto, M. A., Ippolito, A., Linsalata, V., Cascarano, N. A., Nigro, F., Vanadia, S., & Di Venere, D. (2011). Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 61(1), 72–82. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.02.005>
- Gebremariam, A., Chekol, Y., & Assefa, F. (2021). Isolation, characterization, and bio-insecticidal efficiency of Ethiopian isolates of *Bacillus thuringiensis* against *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae) and tomato whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(1). <https://doi.org/10.1186/s41938-021-00375-9>
- Geiger, O., González-Silva, N., López-Lara, I. M., & Sohlenkamp, C. (2010). Amino acid-containing membrane lipids in bacteria. *Progress in Lipid Research*, 49(1), 46–60. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2009.08.002>
- Gouda, S., Kerry, R. G., Das, G., Paramithiotis, S., Shin, H. S., & Patra, J. K. (2018). Revitalization of plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture. *Microbiological Research*, 206, 131–140. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
- Grady, E. N., MacDonald, J., Ho, M. T., Weselowski, B., McDowell, T., Solomon, O., Renaud, J., & Yuan, Z. C. (2019). Characterization and complete genome analysis of the surfactin-producing, plant-protecting bacterium *Bacillus*

- velezensis* 9D-6. *BMC Microbiology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1380-8>
- Gu, X., Zeng, Q., Wang, Y., Li, J., Zhao, Y., Li, Y., & Wang, Q. (2021). Comprehensive genomic analysis of *Bacillus subtilis* 9407 reveals its biocontrol potential against bacterial fruit blotch. *Phytopathology Research*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s42483-021-00081-2>
- Guevara-Avendaño, E., Bravo-Castillo, K. R., Monribot-Villanueva, J. L., Kiel-Martínez, A. L., Ramírez-Vázquez, M., Guerrero-Analco, J. A., & 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. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00249-6>
- Halfeld-Vieira, B. de A., Terao, D., & Nechet, K. de L. (2020). First report of *Geotrichum candidum* causing sour-rot of melon in Brazil. *Plant Disease*, 104(5), 1537.
- Hameed, A., Alam, M. W., Rehman, A., Naveed, K., Atiq, M., Rajput, N. A., Sarfraz, S., Liaqat, N., & Tahir, F. A. (2019). First report of *Geotrichum candidum* causing postharvest sour rot of carrot in Punjab, Pakistan. *Journal of Plant Pathology*, 101(3), 763. <https://doi.org/10.1007/s42161-018-00227-w>
- Han, L., Wang, Z., Li, N., Wang, Y., Feng, J., & Zhang, X. (2019). *Bacillus amyloliquefaciens* B1408 suppresses *Fusarium* wilt in cucumber by regulating the rhizosphere microbial community. *Applied Soil Ecology*, 136, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.12.011>
- Haque, M. A., & Russell, N. J. (2004). Strains of *Bacillus cereus* vary in the phenotypic adaptation of their membrane lipid composition in response to low water activity, reduced temperature and growth in rice starch. *Microbiology*, 150(5), 1397–1404. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26767-0>
- Hatfield, J. L., & Prueger, J. H. (2015). Temperature extremes: Effect on plant growth and development. *Weather and Climate Extremes*, 10, 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.wace.2015.08.001>

- Hattori, Y., Ando, Y., Sasaki, A., Uechi, N., & Nakashima, C. (2021). Taxonomical study of noteworthy species of *Botryosphaeria* in Japan. *Mycobiology*, 49(2), 122–132. <https://doi.org/10.1080/12298093.2021.1895486>
- Hedreyda, Cynthia., & Monsalud, Rosario. (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.
- Hernández-León, R., Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., Orozco-Mosqueda, M. del C., Macías-Rodríguez, L. I., Reyes-de la Cruz, H., Valencia-Cantero, E., & Santoyo, G. (2015). Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*, 81, 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.11.011>
- Holland, L. A., Travadon, R., Lawrence, D. P., Nouri, M. T., & Trouillas, F. (2021). Evaluation of pruning wound protection products for the management of almond canker diseases in California. *Plant Disease*, 105(11), 3368–3375. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-20-2371-RE>
- Horita, H., & Hatta, Y. (2016). Sour rot of carrot caused by *Geotrichum candidum* in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 82(1), 65–68. <https://doi.org/10.1007/s10327-015-0638-3>
- Horváth, I., Glatz, A., Nakamoto, H., Mishkind, M. L., Munnik, T., Saidi, Y., Goloubinoff, P., Harwood, J. L., & Vigh, L. (2012). Heat shock response in photosynthetic organisms: Membrane and lipid connections. *Progress in Lipid Research*, 51(3), 208–220. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2012.02.002>
- Huang, X., Wang, J., Ma, C., Ma, L., & 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 and Biodegradation*, 137, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.11.004>
- Huang, Y., Chen, W.-J., Li, J., Ghorab, M. A., Alansary, N., El-Hefny, D. E., El-Sayyad, G. S., Mishra, S., Zhang, X., Bhatt, P., & Chen, S. (2022). Novel mechanism and degradation kinetics of allethrin using *Bacillus megaterium*

- strain HLJ7 in contaminated soil/water environments. *Environmental Research*, 214, 113940. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113940>
- Hurtado-Bautista, E., Pérez Sánchez, L. F., Islas-Robles, A., Santoyo, G., & Olmedo-Alvarez, G. (2021). Phenotypic plasticity and evolution of thermal tolerance in bacteria from temperate and hot spring environments. *PeerJ*, 9. <https://doi.org/10.7717/peerj.11734>
- IPCC - Intergovernmental Panel on Climate Change. (2023). *Climate Change 2023. Synthesis report*. .
- Jayakumar, A., Nair, I. C., & Radhakrishnan, E. K. (2021). Environmental adaptations of an extremely plant beneficial *Bacillus subtilis* Dcl1 identified through the genomic and metabolomic analysis. *Microbial Ecology*, 81(3), 687–702. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01605-7>
- Jeyanthi, V., & Kanimozhi, S. (2018). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR)-prospective and mechanisms: A review. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(2), 733-749. <https://doi.org/10.22207/JPAM.12.2.34>
- Kadnikov, V. V., Mardanov, A. V., Beletsky, A. V., Karnachuk, O. V., & Ravin, N. V. (2023). Prokaryotic life associated with coal-fire gas vents revealed by metagenomics. *Biology*, 12(723), 1–18. <https://doi.org/10.3390/biology12050723>
- Kalra, G., & Bhatla, S. C. (2018). Cytokinins in *plant physiology, development and metabolism* (pp. 603–615). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2023-1_16
- Kamali, M., Guo, D., Naeimi, S., & Ahmadi, J. (2022). Perception of biocontrol potential of *Bacillus inaquosorum* KR2-7 against tomato *Fusarium* wilt through merging genome mining with chemical analysis. *Biology*, 2022, 137. <https://doi.org/10.3390/biology>
- Kaneko, H., Takami, H., Inoue, A., & Horikoshi, K. (2000). Effects of hydrostatic pressure and temperature on growth and lipid composition of the inner membrane of barotolerant *Pseudomonas* sp. BT1 isolated from the deep-sea. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 64(1), 72–79. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.72>

- Keene, S., Sarao, M. S., McDonald, P. J., & Veltman, J. (2019). Cutaneous geotrichosis due to *Geotrichum candidum* in a burn patient. *Access Microbiology*, 1(1). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000001>
- Kenfaoui, J., Radouane, N., Mennani, M., Tahiri, A., Ghadraoui, L. El, Belabess, Z., Fontaine, F., Hamss, H. El, Amiri, S., Lahlali, R., & Barka, E. A. (2022). A panoramic view on grapevine trunk diseases threats: Case of eutypa dieback, *Botryosphaeria* dieback, and esca disease. *Journal of Fungi*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/jof8060595>
- Keswani, C., Singh, S. P., García-Estrada, C., Mezaache-Aichour, S., Glare, T. R., Borriss, R., Rajput, V. D., Minkina, T. M., Ortiz, A., & Sansinenea, E. (2021). Biosynthesis and beneficial effects of microbial gibberellins on crops for sustainable agriculture. *Journal of Applied Microbiology*, 132(3), 1597-1615. <https://doi.org/10.1111/jam.15348>
- Khan, A. R., Mustafa, A., Hyder, S., Valipour, M., Rizvi, Z. F., Gondal, A. S., Yousuf, Z., Iqbal, R., & Daraz, U. (2022). *Bacillus* spp. as bioagents: Uses and application for sustainable agriculture. *Biology*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/biology11121763>
- Khan, M. A., Asaf, S., Khan, A. L., Jan, R., Kang, S. M., Kim, K. M., & Lee, I. J. (2020a). Extending thermotolerance to tomato seedlings by inoculation with SA1 isolate of *Bacillus cereus* and comparison with exogenous humic acid application. *PLoS ONE*, 15(4), 1–25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232228>
- Khan, M. A., Asaf, S., Khan, A. L., Jan, R., Kang, S. M., Kim, K. M., & Lee, I. J. (2020b). Thermotolerance effect of plant growth-promoting *Bacillus cereus* SA1 on soybean during heat stress. *BMC Microbiology*, 20(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01822-7>
- Khan, M. A., Asaf, S., Khan, A. L., Jan, R., Kang, S. M., Kim, K. M., & Lee, I. J. (2020c). Thermotolerance effect of plant growth-promoting *Bacillus cereus* SA1 on soybean during heat stress. *BMC Microbiology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01822-7>

- Khan, N., Martínez-Hidalgo, P., Ice, T. A., Maymon, M., Humm, E. A., Nejat, N., Sanders, E. R., Kaplan, D., & Hirsch, A. M. (2018). Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02363>
- Khoury, C. K., Brush, Stephen., Costich, D. E., Curry, H. Anne., de Haan, Stef., Engels, J. M. M., Guarino, Luigi., Hoban, Sean., Mercer, K. L., Miller, A. J., Nabhan, G. P., Perales, H. R., Richards, Chris., Riggins, Chance., & Thormann, Imke. (2022). Crop genetic erosion: understanding and responding to loss of crop diversity. *New Phytologist*, 233(1), 84–118. <https://doi.org/10.1111/nph.17733>
- Kidd, S. E., Abdolrasouli, A., & Hagen, F. (2023). Fungal nomenclature: Managing change is the name of the game. *Open Forum Infectious Diseases*, 10(1). <https://doi.org/10.1093/ofid/ofac559>
- Kiersek-Pearson, K., & Karatan, E. (2005). Biofilm development in bacteria. *Advances in Applied Microbiology*, 57, 79–111. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(05\)57003-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(05)57003-5)
- Koňuchová, M., & Valík, L. (2021). Modelling the radial growth of *Geotrichum candidum*: Effects of temperature and water activity. *Microorganisms*, 9(3), 1–12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030532>
- Kumar, K., Gambhir, G., Dass, A., Tripathi, A. K., Singh, A., Jha, A. K., Yadava, P., Choudhary, M., & Rakshit, S. (2020). Genetically modified crops: current status and future prospects. *Planta*, 251(4). <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03372-8>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets* Downloaded from. <http://mbe.oxfordjournals.org/>
- Kumawat, K. C., Sharma, B., Nagpal, S., Kumar, A., Tiwari, S., & Nair, R. M. (2023). Plant growth-promoting rhizobacteria: Salt stress alleviators to improve crop productivity for sustainable agriculture development. *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–27. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1101862>

- Ledesma, Nadine., & Sugiyama, Nobuo. (2005). Pollen quality and performance in strawberry plants exposed to high-temperature stress. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 130(3), 341–347.
- Leghari, S. J., Ahmed, N., Mustafabhabhan, G., Hussain, K., Lashari, A. A., Wahocho, N. A., Laghari, G. M., Hussaintalpur, A. K., Bhutto, T. A., & Wahocho, S. A. (2016). *Advances in Environmental Biology*, 10, 209-219.
- Lemaitre-Guillier, C., Fontaine, F., Roullier-Gall, C., Harir, M., Magnin-Robert, M., Christophe Clément, Trouvelot, S., Gougeon, R. D., Schmitt-Kopplin, P., & Adrian, M. (2020). Cultivar- and wood area-dependent metabolomic fingerprints of grapevine infected by *Botryosphaeria dieback*. *Phytopathology*, 110(11), 1821–1837. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-20-0055-R>
- Li, G., Li, X., Zhang, T., Yu, J., Hou, H., & Yi, L. (2023). Controlling soft rot of postharvest chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) by an antagonist *Bacillus amyloliquefaciens* S917: Efficacy and action mode. *Biological Control*, 178. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105133>
- Li, Jun., Fu, Pengbin., Zhu, Qiren., Mao, Yandong., & Yang, Cheng. (2018). A lab-scale experiment on low-temperature coal oxidation in context of underground coal fires. *Applied Thermal Engineering*, 141, 333–338. <https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2018.05.128>
- Li, M., Hong, C. Y., Yan, W. X., Chao, Z. S., Gang, Y. C., Ling, D. J., Kui, Z. X., Qin, X. J., Liang, Z. M., & He, M. M. (2017). *Bacillus zanthoxyli* sp. nov., a novel nematocidal bacterium isolated from Chinese red pepper (*Zanthoxylum bungeanum* Maxim) leaves in China. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 110(9), 1179–1187. <https://doi.org/10.1007/s10482-017-0890-y>
- Li, S., Xu, J., Fu, L., Xu, G., Lin, X., Qiao, J., & Xia, Y. (2022). Biocontrol of wheat crown rot using *Bacillus halotolerans* QTH8. *Pathogens*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens11050595>
- Li, T. T., Zhang, J. Di, Tang, J. Q., Liu, Z. C., Li, Y. Q., Chen, J., & Zou, L. W. (2020). Combined use of *Trichoderma atroviride* CCTCCSBW0199 and brassinolide to

- control *Botrytis cinerea* infection in Tomato. *Plant Disease*, 104(5), 1298–1304.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-07-19-1568-RE>
- Li, X., Zhang, M., Qi, D., Zhou, D., Qi, C., Li, C., Liu, S., Xiang, D., Zhang, L., Xie, J., & Wang, W. (2021). Biocontrol ability and mechanism of a broad-spectrum antifungal strain *Bacillus safensis* sp. QN1NO-4 against strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum fragariae*. *Frontiers in Microbiology*, 12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.735732>
- Li, Z., Li, J., Yu, M., Quandahor, P., Tian, T., & Shen, T. (2023). *Bacillus velezensis* FX-6 suppresses the infection of *Botrytis cinerea* and increases the biomass of tomato plants. *PLoS ONE*, 18(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0286971>
- Lim, S. M., Yoon, M. Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Shin, T. S., Park, H. W., Yu, N. H., Kim, Y. H., & Kim, J. C. (2017). Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi. *Plant Pathology Journal*, 33(5), 488–498.
<https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.04.2017.0073>
- Liu, J., Deng, S., Chang, W., & Wang, H. (2023). First report of tomato wilt caused by *Fusarium brachygibbosum* in China. *Plant Disease*.
<https://doi.org/10.1094/pdis-01-23-0076-pdn>
- Logan, N. A., & Vos, P. De. (2015). *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1–163). John Wiley & Sons, Ltd.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00530>
- López, C. S., Alice, A. F., Heras, H., Rivas, E. A., & Sánchez-Rivas, C. (2006). Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Microbiology*, 152(3), 605–616. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28345-0>
- López-Lara, I. M., Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2003). Membrane lipids in plant-associated bacteria: Their biosyntheses and possible functions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(7), 567–579.
- Luchini, A., Cavasso, D., Radulescu, A., D'Errico, G., Paduano, L., & Vitiello, G. (2021). Structural organization of cardiolipin-containing vesicles as models of the bacterial cytoplasmic membrane. *Langmuir*, 37(28), 8508–8516.
<https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.1c00981>

- Luo, J. C., Long, H., Zhang, J., Zhao, Y., & Sun, L. (2021). Characterization of a deep sea *Bacillus toyonensis* isolate: Genomic and pathogenic features. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.629116>
- Ma, J., Wang, C., Wang, H., Liu, K., Zhang, T., Yao, L., Zhao, Z., Du, B., & Ding, Y. (2018). Analysis of the complete genome sequence of *Bacillus atrophaeus* GQJK17 reveals its biocontrol characteristics as a plant growth-promoting rhizobacterium. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9473542>
- Mahmud, K., Makaju, S., Ibrahim, R., & Missaoui, A. (2020). Current progress in nitrogen fixing plants and microbiome research. *Plants*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/plants9010097>
- Mahuku, G. S. (2004). A simple extraction method suitable for PCR- based analysis of plant, fungal, and bacterial DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22, 71–81.
- Majhi, K., Halder, U., & Bandopadhyay, R. (2021). Isolation and characterization of copper tolerant bacterial species habituating in copper mines and study of their potentiality as a plant growth stimulator. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-705506/v1>
- Makled, S. O., Hamdan, A. M., & El-Sayed, A. F. M. (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. <https://doi.org/10.1111/anu.12899>
- Manoj, S. R., Karthik, C., Kadirvelu, K., Arulselvi, P. I., Shanmugasundaram, T., Bruno, B., & Rajkumar, M. (2020). Understanding the molecular mechanisms for the enhanced phytoremediation of heavy metals through plant growth promoting rhizobacteria: A review. *Journal of Environmental Management*, 254. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109779>
- Marquez-Santacruz, H. A., Hernandez-Leon, R., Orozco-Mosqueda, M. C., Velazquez-Sepulveda, I., & Santoyo, G. (2010). Diversity of bacterial

- endophytes in roots of mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 9(4), 2372–2380. <https://doi.org/10.4238/vol9-4gmr921>
- McCouch, Susan., Navabi, Z. Katy., Abberton, Michael., Anglin, N. L., Barbieri, R. Lia., Baum, Michael., Bett, Kirstin., Booker, Helen., Brown, G. L., Bryan, G. J., Cattivelli, Luigi., Charest, David., Eversole, Kellye., Freitas, Marcelo., Ghamkhar, Kioumars., Grattipaglia, Dario., Henry, Robert., Valadares Inglis, M. Cleria., Islam, Tofazzal., ... Rieseberg, L. H. (2020). Mobilizing crop biodiversity. *Molecular Plant*, 13(10), 1341–1344. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.08.011>
- Meena, V. S., Maurya, B. R., Verma, J. P., Aeron, A., Kumar, A., Kim, K., & Bajpai, V. K. (2015). Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): Isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering*, 81, 340–347. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.04.065>
- Merima, Jasarevic., Alessia, Catalani., Carmen, M.-Rodríguez., Marta, Tatì., & Gabriele, Chilosi. (2022). First report of *Fusarium brachygibbosum* causing rots on potato tubers in Italy. *Journal of Plant Pathology*, 104, 1591.
- Merino, N., Aronson, H. S., Bojanova, D. P., Feyhl-Buska, J., Wong, M. L., Zhang, S., & Giovannelli, D. (2019). Living at the extremes: Extremophiles and the limits of life in a planetary context. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00780>
- Mikhaylov, A., Moiseev, N., Aleshin, K., & Burkhardt, T. (2020). Global climate change and greenhouse effect. *Entrepreneurship and Sustainability Issues*, 7(4), 2897–2913. [https://doi.org/10.9770/jesi.2020.7.4\(21\)](https://doi.org/10.9770/jesi.2020.7.4(21))
- Miljaković, D., Marinković, J., & Balešević-Tubić, S. (2020). The significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. *Microorganisms*, 8(7), 1-19. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
- Mishra, R. R., Prajapati, S., Das, J., Dangar, T. K., Das, N., & Thatoi, H. (2011). Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from *Bhitarkanika mangrove* soil and

- characterization of reduced product. *Chemosphere*, 84(9), 1231–1237. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.05.025>
- Moghannem, S. A. M., Farag, M. M. S., Shehab, A. M., & Azab, M. S. (2018). Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(3), 452–462. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.012>
- Mohankumar, V., Dann, E. K., & Akinsanmi, O. A. (2023). Seasonal dynamics of inoculum of Botryosphaeriaceae in macadamia orchards in Australia. *Plant Pathology*, 72(6), 1160–1170. <https://doi.org/10.1111/ppa.13730>
- Molotoks, Amy., Smith, Pete., & Dawson, T. P. (2021). Impacts of land use, population, and climate change on global food security. *Food and Energy Security*, 10(1). <https://doi.org/10.1002/fes3.261>
- Moral, J., Morgan, D., & Michailides, T. J. (2019). Management of *Botryosphaeria* canker and blight diseases of temperate zone nut crops. *Crop Protection*, 126. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2019.104927>
- Morales-Cedeño, L. R., Barajas-Barrera, I. A., Parra-Cota, F. I., Valenzuela-Ruiz, V., de los Santos-Villalobos, S., Loeza-Lara, P. D., Herrera-Pérez, A., del Carmen Orozco-Mosqueda, Ma., & Santoyo, G. (2023). Evaluation of biocontrol potential of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas fluorescens* UM270 against postharvest fungal pathogens. *Microbiology Research*, 14(4), 1511–1523. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14040103>
- Morales-Cedeño, L. R., de los Santos-Villalobos, S., & Santoyo, G. (2021). Functional and genomic analysis of *Rouxiiella badensis* SER3 as a novel biocontrol agent of fungal pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709855>
- Morales-Cedeño, L. R., Orozco-Mosqueda, M. del C., Loeza-Lara, P. D., Parra-Cota, F. I., de los Santos-Villalobos, S., & Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacterial endophytes as biocontrol agents of pre- and post-harvest diseases: Fundamentals, methods of application and future perspectives. *Microbiological Research*, 242. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126612>

- Moreau, D., Bardgett, R. D., Finlay, R. D., Jones, D. L., & Philippot, L. (2019). A plant perspective on nitrogen cycling in the rhizosphere. *Functional Ecology*, 33(4), 540-552. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13303>
- Mouchacca, J. (2007). Heat tolerant fungi and applied research: Addition to the previously treated group of strictly thermotolerant species. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(12), 1755–1770. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9426-3>
- Mrozik, A., Piotrowska-Seget, Z., & Łabużek, S. (2004). Cytoplasmic bacterial membrane response to environmental perturbations. *Polish Journal of Environmental Studies*, 13(5), 487–494.
- Mullins, A. J., Li, Y., Qin, L., Hu, X., Xie, L., Gu, C., Mahenthiralingam, E., Liao, X., & Webster, G. (2020). Reclassification of the biocontrol agents *Bacillus subtilis* by-2 and tu-100 as *Bacillus velezensis* and insights into the genomic and specialized metabolite diversity of the species. *Microbiology* 166(12), 1121–1128. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000986>
- Myo, E. M., Liu, B., Ma, J., Shi, L., Jiang, M., Zhang, K., & Ge, B. (2019). Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. *Biological Control*, 134, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.03.017>
- Naing, A. H., & Kim, C. K. (2021). Abiotic stress-induced anthocyanins in plants: Their role in tolerance to abiotic stresses. *Physiologia Plantarum*, 172(3), 1711–1723. <https://doi.org/10.1111/ppl.13373>
- Niem, J. M., Billones-Baaijens, R., Stodart, B., & Savocchia, S. (2020). Diversity profiling of grapevine microbial endosphere and antagonistic potential of endophytic *Pseudomonas* against grapevine trunk diseases. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00477>
- Nifakos, K., Tsalgatidou, P. C., Thomloui, E. E., Skagia, A., Kotopoulis, D., Baira, E., Delis, C., Papadimitriou, K., Markellou, E., Venieraki, A., & Katinakis, P. (2021). Genomic analysis and secondary metabolites production of the endophytic *Bacillus velezensis* bvel1: A biocontrol agent against *Botrytis*

- cinerea* causing bunch rot in post-harvest table grapes. *Plants*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/plants10081716>
- Novello, G., Bona, E., Toumatia, O., Vuolo, F., Bouras, N., Titouah, H., Zitouni, A., Gorrasi, S., Massa, N., Cesaro, P., Todeschini, V., Lingua, G., & Gamalero, E. (2023). Rhizosphere bacterial isolation from indigenous plants in arid and semi-arid Algerian soils: Implications for plant growth enhancement. *Processes*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/pr11102907>
- Olajuyigbe, F. M. (2017). Optimization of extracellular phytase production from *Bacillus amyloliquefaciens* PFB-02 grown on selected agricultural wastes. *Applied Tropical Agriculture*, 20, 92–97.
- Omeike, S. O., Kareem, S. O., & Lasisi, A. A. (2019). Potential antibiotic-producing fungal strains isolated from pharmaceutical waste sludge. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s43088-019-0026-8>
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 6(3), 115-125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Ons, L., Bylemans, D., Thevissen, K., & Cammue, B. P. A. (2020). Combining biocontrol agents with chemical fungicides for integrated plant fungal disease control. *Microorganisms*, 8(12), 1930. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8121930>
- Orozco-Mosqueda, M. del C., Fadiji, A. E., Babalola, O. O., Glick, B. R., & Santoyo, G. (2022). Rhizobiome engineering: Unveiling complex rhizosphere interactions to enhance plant growth and health. *Microbiological Research*, 263. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127137>
- Orozco-Mosqueda, M. del C., Flores, A., Rojas-Sánchez, B., Urtis-Flores, C. A., Morales-Cedeño, L. R., Valencia-Marin, M. F., Chávez-Avila, S., Rojas-Solis, D., & Santoyo, G. (2021). Plant growth-promoting bacteria as bioinoculants: Attributes and challenges for sustainable crop improvement. *Agronomy*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/agronomy11061167>

- Paes, S. A., Rosado, A. W. C., Reis, A., & Pereira, O. L. (2021). Molecular phylogeny and morphological characterization of the aetiological agent of sour rot on fruits and vegetables in Brazil. *Plant Pathology*, 71(2), 386–399. <https://doi.org/10.1111/ppa.13473>
- Patil, S. P., Shirsath, L. P., & Chaudhari, B. L. (2021). A halotolerant hyaluronidase from newly isolated *Brevibacterium halotolerans* DC1: Purification and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 166, 839–850. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.240>
- Paulucci, N. S., Gallarato, L. A., Reguera, Y. B., Vicario, J. C., Cesari, A. B., García de Lema, M. B., & Dardanelli, M. S. (2015). *Arachis hypogaea* PGPR isolated from Argentine soil modifies its lipids components in response to temperature and salinity. *Microbiological Research*, 173, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.12.012>
- Paulucci, N. S., Medeot, D. B., Dardanelli, M. S., & De Lema, M. G. (2011). Growth temperature and salinity impact fatty acid composition and degree of unsaturation in peanut-nodulating rhizobia. *Lipids*, 46(5), 435–441. <https://doi.org/10.1007/s11745-011-3545-1>
- Paz, A., Carballo, J., Pérez, M. J., & Domínguez, J. M. (2016). *Bacillus aryabhattai* BA03: a novel approach to the production of natural value-added compounds. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(10). <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2113-5>
- Petrash, S., Knapp, S. J., van Kan, J. A. L., & Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), 877–892. <https://doi.org/10.1111/mpp.12794>
- Plett, D. C., Ranathunge, K., Melino, V. J., Kuya, N., Uga, Y., & Kronzucker, H. J. (2020). The intersection of nitrogen nutrition and water use in plants: New paths toward improved crop productivity. *Journal of Experimental Botany*, 71(15), 4452–4468). <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa049>

- Prakash, J., & Arora, N. K. (2019). Phosphate-solubilizing *Bacillus* sp. enhances growth, phosphorus uptake and oil yield of *Mentha arvensis* L. 3 *Biotech*, 9(4). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1660-5>
- Pranaw, K., Pidlisnyuk, V., Trögl, J., & 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. <https://doi.org/10.3390/biology9090305>
- Rawat, P., Das, S., Shankhdhar, D., & Shankhdhar, S. C. (2021). Phosphate-solubilizing microorganisms: Mechanism and their role in phosphate solubilization and uptake. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21(1), 49–68. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00342-7>
- Ray, S., Datta, R., Bhadra, P., Chaudhuri, B., & Mitra, A. K. (2012). From space to Earth: *Bacillus aryabhatai* found in the Indian sub-continent. *Bioscience Discovery*, 3(1), 2229–3469. <http://www.biosciencediscovery.com>
- Rhouma, A., Hajji-Hedfi, L., Kouadri, M., Atallaoui, K., Matrood, A., & Khriebe, M. (2023). *Botrytis cinerea*: The cause of tomatoes gray mold. *Egyptian Journal of Phytopathology*, 51(2), 68–75. <https://doi.org/10.21608/ejp.2023.224842.1101>
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., & Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil*, 321(2), 305–339. <https://doi.org/10.1007/s11104-009-9895-2>
- Robledo-Leal, E., Elizondo-Zertuche, M., Treviño-Rangel, R. de J., Hernández-Luna, C., & Huerta-González, N. (2016). Aislamiento de levaduras killer a partir de hormigas del género *Atta* y su efecto sobre el hongo patógeno del tomate rojo *Geotrichum candidum*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 34(3), 258–269. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1605-3>
- Rocha, F. Y. O., Oliveira, C. M. de, da Silva, P. R. A., Melo, L. H. V. de, Carmo, M. G. F. do, & Baldani, J. I. (2017). Taxonomical and functional characterization of *Bacillus* strains isolated from tomato plants and their biocontrol activity against

- races 1, 2 and 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Applied Soil Ecology*, 120, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.07.025>
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(2), 15–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>.
- Rojas-Solis, D., Zetter-Salmón, E., Contreras-Pérez, M., Rocha-Granados, M. del C., Macías-Rodríguez, L., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.11.007>
- Rojas-Solis, D., Vences-Guzmán, M. Á., Sohlenkamp, C., & Santoyo, G. (2020a). Antifungal and plant growth–promoting *Bacillus* under saline stress modify their membrane composition. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 20(3), 1549–1559. <https://doi.org/10.1007/s42729-020-00246-6>
- Rojas-Solis, D., Vences-Guzmán, M. A., Sohlenkamp, C., & Santoyo, G. (2020b). *Bacillus toyonensis* COPE52 modifies lipid and fatty acid composition, exhibits antifungal activity, and stimulates growth of tomato plants under saline conditions. *Current Microbiology*, 77(10), 2735–2744. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02069-1>
- Rojas-Solis, D., Vences-Guzmán, M. Á., Sohlenkamp, C., & Santoyo, G. (2023). Cardiolipin synthesis in *Pseudomonas fluorescens* UM270 plays a relevant role in stimulating plant growth under salt stress. *Microbiological Research*, 268. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127295>
- Romanazzi, G., & Feliziani, E. (2014). Chapter 4 - *Botrytis cinerea* (Gray Mold). In S. Bautista-Baños (Ed.), *Postharvest Decay* (pp. 131–146). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00004-1>
- Rooney, A. P., Price, N. P. J., Ehrhardt, C., Sewzey, J. L., & Bannan, J. D. (2009). Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov. *International*

- Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(10), 2429–2436.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.009126-0>
- Russell, A. D. (2003). Lethal effects of heat on bacterial physiology and structure. *Science Progress*, 86(2). <https://doi.org/10.3184/003685003783238699>
- Saeed, Q., Xiukang, W., Haider, F. U., Kučerik, J., Mumtaz, M. Z., Holatko, J., Naseem, M., Kintl, A., Ejaz, M., Naveed, M., Brtnicky, M., & Mustafa, A. (2021). Rhizosphere bacteria in plant growth promotion, biocontrol, and bioremediation of contaminated sites: A comprehensive review of effects and mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910529>
- Salwan, R., & Sharma, V. (2020). Genome wide underpinning of antagonistic and plant beneficial attributes of *Bacillus* sp. SBA12. *Genomics*, 112(4), 2894–2902. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.03.029>
- Samaras, A., Hadjipetrou, C., & Karaoglanidis, G. (2021). *Bacillus amyloliquefaciens* strain QST713 may contribute to the management of SDHI resistance in *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science*, 77(3), 1316–1327. <https://doi.org/10.1002/ps.6145>
- Sandona, K., Billingsley Tobias, T. L., Hutchinson, M. I., Natvig, D. O., & Porras-Alfaro, A. (2019). Diversity of thermophilic and thermotolerant fungi in corn grain. *Mycologia*, 111(5), 719–729. <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1631137>
- Santos, A., Núñez-Montero, K., Lamilla, C., Pavez, M., Quezada-Solís, D., & Barrientos, L. (2020). Antifungal activity screening of antarctic Actinobacteria against phytopathogenic fungi. *Acta Biologica Colombiana*, 25(2), 353–358. <https://doi.org/10.15446/abc.v25n2.76405>
- Santoyo, G. (2022). How plants recruit their microbiome? New insights into beneficial interactions. *Journal of Advanced Research*, 40, 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2021.11.020>
- Santoyo, G., Guzmán-Guzmán, P., Parra-Cota, F. I., de los Santos-Villalobos, S., Orozco-Mosqueda, M. D. C., & Glick, B. R. (2021). Plant growth stimulation by

- microbial consortia. *Agronomy*, 11(219), 1–24.
<https://doi.org/10.3390/agronomy11020219>
- Santoyo, G., Sánchez-Yáñez, J. M., & de los Santos-Villalobos, S. (2019). *Methods for detecting biocontrol and plant growth-promoting traits in rhizobacteria* (pp. 133–149). https://doi.org/10.1007/978-981-13-5767-1_8
- Santoyo, G., Orozco-Mosqueda, M. del C., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 855–872. doi:10.1080/09583157.2012.694413
- Schoeni, J. L., & Wong, A. C. L. (2005). *Bacillus cereus* food poisoning and its toxins. *Journal of Food Protection*, 68(3), 636–648.
- Shaffique, S., Khan, M. A., Wani, S. H., Pande, A., Imran, M., Kang, S. M., Rahim, W., Khan, S. A., Bhatta, D., Kwon, E. H., & Lee, I. J. (2022). A review on the role of endophytes and plant growth promoting rhizobacteria in mitigating heat stress in plants. *Microorganisms*, 10(7).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10071286>
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 31(3), 446–459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Shan, L. Y., Cui, W. Y., Zhang, D. D., Zhang, J., Ma, N. N., Bao, Y. M., Dai, X. F., & Guo, W. (2017). First report of *Fusarium brachygibbosum* causing maize stalk rot in China. *Plant Disease*, 101(5), 837. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1465-PDN>
- Sher-Khan, R., Iqbal, A., Malak, R., Shehryar, K., Attia, S., Ahmed, T., Ali, M., Arif, M., & Mii, Masahiro. (2019). Plant defensins: types, mechanism of action and prospects of genetic engineering for enhanced disease resistance in plants. 3 *Biotech*, 9(5). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1725-5>
- Shuping, D. S. S., & Eloff, J. N. (2017). The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: a review. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines: AJTCAM*, 14(4), 120–127.
<https://doi.org/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. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1455995>
- Singh, P., Xie, J., Qi, Y., Qin, Q., Jin, C., Wang, B., & Fang, W. (2021a). A thermotolerant marine *Bacillus amyloliquefaciens* s185 producing iturin a5 for antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. Sp. cubense. *Marine Drugs*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/MD19090516>
- Singh, R. K., Singh, P., Li, H. B., Song, Q. Q., Guo, D. J., Solanki, M. K., Verma, K. K., Malviya, M. K., Song, X. P., Lakshmanan, P., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2020). Diversity of nitrogen-fixing rhizobacteria associated with sugarcane: A comprehensive study of plant-microbe interactions for growth enhancement in *Saccharum* spp. *BMC Plant Biology*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02400-9>
- Singh, V., & Deverall, B. J. (1984). *Bacillus subtilis* as a control agent against fungal pathogens of citrus fruit. *Transactions of the British Mycological Society*, 83(3), 487–490. [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(84\)80045-5](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(84)80045-5)
- Skendžić, S., Zovko, M., Živković, I. P., Lešić, V., & Lemić, D. (2021). The impact of climate change on agricultural insect pests. *Insects*, 12(5). <https://doi.org/10.3390/insects12050440>
- Slama, H. B., Cherif-Silini, H., Bouket, A. C., Qader, M., Silini, A., Yahiaoui, B., Alenezi, F. N., Luptakova, L., Triki, M. A., Vallat, A., Oszako, T., Rateb, M. E., & Belbahri, L. (2019). Screening for *Fusarium* antagonistic bacteria from contrasting niches designated the endophyte *Bacillus halotolerans* as plant warden against *Fusarium*. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03236>
- Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2015). Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(1), 133–159. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>
- Soliman, M. (2020). *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus aryabhattai* as biocontrol agents against *Ralstonia solanacearum* *in vitro* and *in plant*. *Journal of Plant*

- Protection and Pathology*, 11(3), 197–203.
<https://doi.org/10.21608/jppp.2020.87024>
- Solmaz, K. B., Ozcan, Y., Dogan, N. M., Bozkaya, O., & Ide, S. (2018). Characterization and production of extracellular polysaccharides (EPS) by *Bacillus pseudomyoides* U10. *Environments*, 5(6), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/environments5060063>
- Song, C., Zhang, Y., Zhao, Q., Chen, M., Zhang, Y., Gao, C., Jia, Z., Song, S., Guan, J., & Shang, Z. (2024). Volatile organic compounds produced by *Bacillus aryabhattai* AYG1023 against *Penicillium expansum* causing blue mold on the Huangguan pear. *Microbiological Research*, 278.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127531>
- Song, J., Wang, Y., Song, Y., Zhao, B., Wang, H., Zhou, S., Kong, D., Guo, X., Li, Y., He, M., Ma, K., Ruan, Z., & Yan, Y. (2017). *Brevibacillus halotolerans* sp. nov., isolated from saline soil of a paddy field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(4), 772–777.
<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001579>
- Song, Zeyang., & Kuenzer, Claudia. (2014). Coal fires in China over the last decade: A comprehensive review. *International Journal of Coal Geology*, 133, 72–99.
<https://doi.org/10.1016/j.coal.2014.09.004>
- Song, Zeyang., Wu, Dejian., Jiang, Juncheng., & Pan, Xuhai. (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.
<https://doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2019.113948>
- Souibgui, E., Bruel, C., Choquer, M., de Vallée, A., Dieryckx, C., Dupuy, J. W., Latorse, M. P., Rasclé, C., & Poussereau, N. (2021). Clathrin is important for virulence factors delivery in the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.668937>
- Soumare, Abdoulaye., Boubekri, Kenza., Lyamlouli, Karim., Hafidi, Mohamed., Ouhdouch, Yedir., & Kouisni, Lamfeddal. (2020). From isolation of phosphate solubilizing microbes to their formulation and use as biofertilizers: Status and

- needs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00425>
- Srivastava, D. Aditya., Harris, Raviv., Breuer, Gilli., & Levy, Maggie. (2021). Secretion-based modes of action of biocontrol agents with a focus on *Pseudozyma aphidis*. *Plants*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/plants10020210>
- Summerell, B. A. (2019). *Annual review of phytopathology resolving Fusarium: Current status of the genus*. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082718>
- Swain, M. R., Laxminarayana, K., & Ray, R. C. (2012). Phosphorus solubilization by thermotolerant *Bacillus subtilis* isolated from cow dung microflora. *Agricultural Research*, 1(3), 273–279. <https://doi.org/10.1007/s40003-012-0022-x>
- Talakayala, A., Katta, S., & Garladinne, M. (2020). Genetic engineering of crops for insect resistance: An overview. *Journal of Biosciences*, 45(1). <https://doi.org/10.1007/s12038-020-00081-y>
- Tamariz-Angeles, C., Lázaro-Palomino, J., Olivera-Gonzales, P., Castañeda-Barreto, A., & Villena, G. K. (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), 67–78. <https://doi.org/10.15381/rpb.v27i1.17582>
- Terrones-Salgado, J., Nieto-Angel, D., Nava-Díaz, C., Téliz-Ortiz, D., García-Velasco, R., Vallejo-Pérez, M. R., & Sánchez-García, P. (2019). *Botrytis cinerea* causante del moho gris en frutos de zarzamora en México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-1>
- Thomidis, T., Prodromou, I., Farmakis, A., & Zambounis, A. (2021). Effect of temperature on the growth of *Geotrichum candidum* and chemical control of sour rot on tomatoes. *Tropical Plant Pathology*, 46, 545–552.
- Thomloudi, E. E., Tsalgatiidou, P. C., Baira, E., Papadimitriou, K., Venieraki, A., & Katinakis, P. (2021). Genomic and metabolomic insights into secondary metabolites of the novel bacillus halotolerans hil4, an endophyte with promising

- antagonistic activity against gray mold and plant growth promoting potential. *Microorganisms*, 9(12). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122508>
- Tian, D., Song, X., Li, C., Zhou, W., Qin, L., Wei, L., Di, W., Huang, S., Li, B., Huang, Q., Long, S., He, Z., & Wei, S. (2021). Antifungal mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* strain GKT04 against *Fusarium* wilt revealed using genomic and transcriptomic analyses. *MicrobiologyOpen*, 10(3). <https://doi.org/10.1002/mbo3.1192>
- Torres, M., Llamas, I., Torres, B., Toral, L., Sampedro, I., & Béjar, V. (2020). Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1. *Applied Soil Ecology*, 150. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103453>
- Tozlu, E. (2016). Bazı Bakteriyel Biyokontrol Ajanlar ile Havuç Acı Çürüklük Hastalığı (*Geotrichum candidum* Link)'nın Biyolojik Mücadelesi. *J. Of The Agricultural Faculty*, 47(1), 1–9.
- Trent, J. D., Gabrielsen, M., Jensen, B., Neuhard, J., & Olsen, J. (1994). Acquired thermotolerance and heat shock proteins in thermophiles from the three phylogenetic domains. *Journal of Bacteriology*, 176(19), 6148–6152. <https://doi.org/10.1128/jb.176.19.6148-6152.1994>
- Tripathi, A. D., Mishra, Richa., Maurya, K. K., Singh, R. B., & Wilson, D. W. (2019). Estimates for world population and global food availability for global health. In *The Role of Functional Food Security in Global Health* (pp. 3–24). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813148-0.00001-3>
- Tsalgatidou, P. C., Thomludi, E. E., Baira, E., Papadimitriou, K., Skagia, A., Venieraki, A., & Katinakis, P. (2022). Integrated genomic and metabolomic analysis illuminates key secreted metabolites produced by the novel endophyte *Bacillus halotolerans* Cal.I.30 involved in diverse biological control activities. *Microorganisms*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10020399>
- Türkkan, M. (2019). Effect of various salts on the growth and development of *Geotrichum candidum*, the causal agent of carrot sour rot. *Journal of Phytopathology*, 167(4), 230–239. <https://doi.org/10.1111/jph.12790>
- Uddin, M. E., Ahmad, T., Ajam, M. M., Moniruzzaman, M., Mandal, D., Ray, S. K., Sufian, A., Rahman, M. A., Hossain, E., & Ahammed, R. (2017). Thermotolerant

- extracellular proteases produced by *Bacillus subtilis* isolated from local soil that representing industrial applications. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 11(2), 733–741. <https://doi.org/10.22207/JPAM.11.2.12>
- UN - United Nations. (2019). *Department of economic and social affairs. World population prospects 2019: Ten key findings*. United Nations. https://population.un.org/wpp/Publications/Files/wpp2019_10KeyFindings.pdf
- Vaishnav, A., Shukla, A. K., Sharma, A., Kumar, R., & Choudhary, D. K. (2019). Endophytic bacteria in plant salt stress tolerance: Current and future prospects. *Journal of Plant Growth Regulation*, 38(2), 650–668. <https://doi.org/10.1007/s00344-018-9880-1>
- Valappil, S. P., Misra, S. K., Boccaccini, A. R., Keshavarz, T., Bucke, C., & Roy, I. (2007). Large-scale production and efficient recovery of PHB with desirable material properties, from the newly characterised *Bacillus cereus* SPV. *Journal of Biotechnology*, 132(3), 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.03.013>
- Valencia-Marín, M. Fernanda. (2021). Evaluación del efecto antagonista de bacterias termotolerantes hacia los fitopatógenos *Botrytis cinerea* 62BCV y *Geotrichum candidum* F.R.B. *Tesis de Licenciatura*.
- Valenzuela-Ruiz, V., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., & de los Santos-Villalobos, S. (2022). Potential biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp. TSO2 against *Bipolaris sorokiniana*, spot blotch in wheat. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 40(2). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2201-1>
- Valenzuela-Ruiz, V., Robles-Montoya, R. I., Parra-Cota, F. I., Santoyo, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., Rodríguez-Ramírez, R., & de los Santos-Villalobos, S. (2019). Draft genome sequence of *Bacillus paralicheniformis* TRQ65, a biological control agent and plant growth-promoting bacterium isolated from wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum) rhizosphere in the Yaqui Valley, Mexico. *3 Biotech*, 9(11). <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1972-5>
- Velasco-Jiménez, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., Aarland, R. C., & Rodríguez-Sahagún, A. (2020). Rhizospheric bacteria with

- potential benefits in agriculture. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 343–355.
<https://doi.org/10.28940/terra.v38i2.470>
- Venieraki, A., Chorianopoulou, S. N., Katinakis, P., & Bouranis, D. L. (2021). Multi-trait wheat rhizobacteria from calcareous soil with biocontrol activity promote plant growth and mitigate salinity stress. *Microorganisms*, 9(1588), 1–22.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9081588>
- Verma, P. P., Shelake, R. M., Das, S., Sharma, P., & Kim, J.-Y. (2019). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and fungi (PGPF): potential biological control agents of diseases and pests. *Microbial Interventions in Agriculture and Environment: Volume 1: Research Trends, Priorities and Prospects*, 281–311.
- Villa-Rodriguez, E., Moreno-Ulloa, A., Castro-Longoria, E., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2021). Integrated omics approaches for deciphering antifungal metabolites produced by a novel *Bacillus* species, *B. cabrialesii* TE3T, against the spot blotch disease of wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum). *Microbiological Research*, 251.
<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126826>
- Wahid, F., Fahad, S., Danish, S., Adnan, M., Yue, Z., Saud, S., Siddiqui, M. H., Brtnicky, M., Hammerschmiedt, T., & Datta, R. (2020). Sustainable management with mycorrhizae and phosphate solubilizing bacteria for enhanced phosphorus uptake in calcareous soils. *Agriculture (Switzerland)*, 10(8), 1–14. <https://doi.org/10.3390/agriculture10080334>
- Wang, D., Li, Y., Yuan, Y., Chu, D., Cao, J., Sun, G., Ai, Y., Cui, Z., Zhang, Y., Wang, F., & Wang, X. (2022). Identification of non-volatile and volatile organic compounds produced by *Bacillus siamensis* LZ88 and their antifungal activity against *Alternaria alternata*. *Biological Control*, 169.
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104901>
- Wang, D., Sun, L., Yu, H., Zhang, C., Guan, X., Wang, M., Cheng, R., Wang, C., & Xie, Z. (2023). Whole-genome analysis of the benzoic acid-degrading bacterium *Bacillus halotolerans* B28 to reveal its phytoprobiotic effects. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 185, 105668.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2023.105668>

- Wang, F., Xiao, J., Zhang, Y., Li, R., Liu, L., & Deng, J. (2021). Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus halotolerans* against *Botrytis cinerea* causing grey mould in postharvest strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 174. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111456>
- Wang, H., Liu, R., You, M. P., Barbetti, M. J., & Chen, Y. (2021). Pathogen biocontrol using plant growth-promoting bacteria (PGPR): Role of bacterial diversity. *Microorganisms*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms9091988>
- Wang, H., Shi, Y., Wang, D., Yao, Z., Wang, Y., Liu, J., Zhang, S., & 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(5). <https://doi.org/10.3390/ijms19051371>
- Wang, Zhaohua., Yang, Zhiying., Zhang, Bin., Li, Hao., & He, Weijun. (2022). How does urbanization affect energy consumption for central heating: Historical analysis and future prospects. *Energy and Buildings*, 255. <https://doi.org/10.1016/j.enbuild.2021.111631>
- Wei, Y., Zhang, L., Zhou, Z., & Yan, X. (2018). Diversity of gene clusters for polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis revealed by metagenomic analysis of the yellow sea sediment. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00295>
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697–703.
- Wenyue, Ma., Zhang, Y., Wang, C., Liu, S., & Liao, X. (2018). A new disease of strawberry, fruit rot, caused by *Geotrichum candidum* in China. *Plant Protection Science*, 54(2), 92–100. <https://doi.org/10.17221/76/2017-PPS>
- Willdigg, J. R., & Helmann, J. D. (2021). Mini review: Bacterial membrane composition and its modulation in response to stress. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.634438>
- Wu, G., Jurick, W. M., Lichtner, F. J., Peng, H., Yin, G., Gaskins, V. L., Yin, Y., Hua, S. S., Peter, K. A., & Bennett, J. W. (2019). Whole-genome comparisons of

- Penicillium* spp. reveals secondary metabolic gene clusters and candidate genes associated with fungal aggressiveness during apple fruit decay. *PeerJ*, 2019(1). <https://doi.org/10.7717/peerj.6170>
- Wu, L., Shang, H., Gu, H., & Zheng, J. (2019). Bacterial iturins mediate biocontrol activity of *Bacillus* sp. against postharvest pear fruit-rotting fungi. *Journal of Phytopathology*, 167(9), 501–509. <https://doi.org/10.1111/jph.12837>
- Wu, L., Wu, H. J., Qiao, J., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01395>
- Wu, X., Wu, H., Wang, R., Wang, Z., Zhang, Y., Gu, Q., Farzand, A., Yang, X., Semenov, M., Borriss, R., Xie, Y., & Gao, X. (2021). Genomic features and molecular function of a novel stress-tolerant *Bacillus halotolerans* strain isolated from an extreme environment. *Biology*, 10(10). <https://doi.org/10.3390/biology10101030>
- Xu, W. fang, Ren, H. shuang, Ou, T., Lei, T., Wei, J. hong, Huang, C. shu, Li, T., Strobel, G., Zhou, Z. yang, & Xie, J. (2019). Genomic and functional characterization of the endophytic *Bacillus subtilis* 7PJ-16 strain, a potential biocontrol agent of mulberry fruit sclerotiniase. *Microbial Ecology*, 77(3), 651–663. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1247-4>
- Xu, W., Yang, Q., Xie, X., Goodwin, P. H., Deng, X., Zhang, J., Sun, R., Wang, Q., Xia, M., Wu, C., & Yang, L. (2022). Genomic and phenotypic insights into the potential of *Bacillus subtilis* YB-15 isolated from rhizosphere to biocontrol against crown rot and promote growth of wheat. *Biology*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/biology11050778>
- Yaghmour, M. A., Bostock, R. M., Morgan, D. P., & Michailides, T. J. (2012). Biology and sources of inoculum of *Geotrichum candidum* causing sour rot of peach and nectarine fruit in California. *Plant Disease*, 96(2), 204–210. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-11-0391>
- Yan, J. Y., Zhao, W. S., Chen, Z., Xing, Q. K., Zhang, W., Chethana, K. W. T., Xue, M. F., Xu, J. P., Phillips, A. J. L., Wang, Y., Liu, J. H., Liu, M., Zhou, Y., Jayawardena, R. S., Manawasinghe, I. S., Huang, J. B., Qiao, G. H., Fu, C. Y.,

- Guo, F. F., ... Li, X. H. (2018). Comparative genome and transcriptome analyses reveal adaptations to opportunistic infections in woody plant degrading pathogens of Botryosphaeriaceae. *DNA Research*, 25(1), 87–102. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsx040>
- Yang, Q., Yang, T., Shi, Y., Xin, Y., Zhang, L., Gu, Z., Li, Y., Ding, Z., & Shi, G. (2021). The nitrogen removal characterization of a cold-adapted bacterium: *Bacillus simplex* H-b. *Bioresource Technology*, 323. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124554>
- Yang, W., Zhao, Y., Yang, Y., Zhang, M., Mao, X., Guo, Y., Li, X., Tao, B., Qi, Y., Ma, L., Liu, W., Li, B., & Di, H. J. (2022). A genomic analysis of *Bacillus megaterium* HT517 reveals the genetic basis of its abilities to promote growth and control disease in greenhouse tomato. *Genetics Research*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2093029>
- Yao, T. (2020). Cloning and functional analysis of *pqq* genes phosphorus solubilizing from *Bacillus Mycoides* Gny1. *Agricultural University*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-41467/v1>
- Ye, W. Q., Sun, Y. F., Tang, Y. J., & Zhou, W. W. (2021). Biocontrol potential of a broad-spectrum antifungal strain *Bacillus amyloliquefaciens* B4 for postharvest loquat fruit storage. *Postharvest Biology and Technology*, 174. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111439>
- Yoon, Y., Lee, H., Lee, S., Kim, S., & Choi, K. H. (2015). Membrane fluidity-related adaptive response mechanisms of foodborne bacterial pathogens under environmental stresses. *Food Research International*, 72, 25–36. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.016>
- Yuan, J., Zhao, M., Li, R., Huang, Q., Rensing, C., Raza, W., & Shen, Q. (2016). Antibacterial compounds-macrolactin alters the soil bacterial community and abundance of the gene encoding PKS. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01904>
- Yusoff, S. F., Haron, F. F., Mohamed, M. T. M., Asib, N., Sakimin, S. Z., Kassim, F. A., & Ismail, S. I. (2020). Antifungal activity and phytochemical screening of *Vernonia amygdalina* extract against *Botrytis cinerea* causing gray mold

- disease on tomato fruits. *Biology*, 9(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/biology9090286>
- Zhai, L., Zhang, M., Lv, G., Chen, X., Jia, N., Hong, N., & Wang, G. (2014). Biological and molecular characterization of four *Botryosphaeria* species isolated from pear plants showing stem wart and stem canker in China. *Plant Disease*, 98(6), 716–726. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1060-RE>
- Zhang, T., Xu, J., Zeng, J., & Lou, K. (2013). Diversity of prokaryotes associated with soils around coal-fire gas vents in MaNasi county of Xinjiang, China. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 103(1), 23–36. <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9782-3>
- Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q., & Li, Y. (2013). Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biological Control*, 65(2), 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.02.004>
- Zhou, H., Guog, T., Dai, H., Yu, Y., Zhang, Y., & Ma, L. (2020). Deoxynivalenol: Toxicological profiles and perspective views for future research. *World Mycotoxin Journal*, 13(2), 179–188. <https://doi.org/10.3920/WMJ2019.2462>
- Zhou, Z., Tang, H., Wang, W., Zhang, L., Su, F., Wu, Y., Bai, L., Li, S., Sun, Y., Tao, F., & Xu, P. (2021). A cold shock protein promotes high-temperature microbial growth through binding to diverse RNA species. *Cell Discovery*, 7(15), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41421-021-00246-5>
- Zhu, Enyan., Qi, Qiuyu., Chen, Lisu., & Wu, Xianhua. (2022). The spatial-temporal patterns and multiple driving mechanisms of carbon emissions in the process of urbanization: A case study in Zhejiang, China. *Journal of Cleaner Production*, 358. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.131954>
- Zouari, I., Masmoudi, F., Medhioub, K., Tounsi, S., & Trigui, M. (2020). Biocontrol and plant growth-promoting potentiality of bacteria isolated from compost extract. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(12), 2107–2122. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01481-8>

13. MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla 1S. Análisis BLAST de los aislados no identificados a nivel especie. Se muestran que obtiene el mismo porcentaje de identidad para más de una especie.

Aislado	Cepa de referencia	Puntaje máximo	Puntaje total	Cobertura	Porcentaje de identidad	No. Acceso
AF41	<i>Bacillus megaterium</i> strain ATCC 14581	1770	1770	95%	98.14%	NR_117473.1
	<i>Bacillus aryabhatai</i> strain B8W22	1770	1770	95%	98.14%	NR_115953.1
AF53	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	1864	1864	96%	99.42%	NR_043403.1
	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	1864	1864	96%	99.42%	NR_121761.1
AF56	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	1698	1698	92%	97.87%	NR_043403.1
	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	1698	1698	92%	97.87%	NR_121761.1
AF62	<i>Bacillus thuringiensis</i> strain IAM 12077	1919	1919	99%	99.16%	NR_043403.1
	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112	1919	1919	99%	99.16%	NR_121761.1
AF64	<i>Bacillus jeotgali</i> strain YKJ-10	1916	1916	99%	99.15%	NR_025060.1
	<i>Bacillus subterraneus</i> strain COOI3B	1916	1916	99%	99.15%	NR_104749.1
AF65	<i>Bacillus jeotgali</i> strain YKJ-10	1938	1938	99%	99.44%	NR_025060.1
	<i>Bacillus subterraneus</i> strain COOI3B	1938	1938	99%	99.44%	NR_104749.1