



**UNIVERSIDAD DE ORIENTE
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
CENTRO DE ESTUDIOS DE BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL**



**BIOTECNOLOGIA
INDUSTRIAL**

**Tesis Presentada en Opción al Título Académico de
Master en Biotecnología
Mención Biotecnología Ambiental**

Evaluación del efecto antagónico *in vitro* de cepas *bacilli* sobre fitopatógenos del cultivo de la de caña de azúcar (*Saccharum* spp.)

Autor: Lic. Zenia González Giro

**Tutores: Dra C. Suyén Rodríguez Pérez
MSc. Teresa de los Milagros Orberá Ratón**

*Santiago de Cuba
2010
“Año 52 de la Revolución”*

No es posible hablar de tus logros sin que sean debidamente reconocidas las personas que estando o no presentes estuvieron siempre contigo, son ellos los que con amor y profesionalidad hacen que el resultados más simple sea todo un éxito.

- *A mi Dios y salvador porque estuvo y siempre está presente.*
- *A mis tutores Suyén Rodríguez y Teresa Orberá, ejemplos de consagración y voluntad.*
- *Al excelente claustro de profesores de la Maestría en Biotecnología. A ti Catalina*
- *A mis compañeros y amigos Leonor, Miladis, Janet, Emilia, Almenares, Yamila, Gabriel, Teresa, Valery y José Luis.*
- *A mis amados compañeros del CEBI, Migdalia, Odalys, Norita, Morris, Isabel, Rosa, Daisa, Ana, Roberto, Serrat, Irasema, Maikel, Daniel, Abelardo, Yailletis y Adis.*
- *A mi amigas Yaquelin, Vivian y Mónica por su valiosa ayuda*
- *Al mis compañeros de la V Edición de la Maestría en Biotecnología*
- *A todos los que están en mi corazón y que bien lo saben*
- *A mi Revolución ¡Gracias!*

*A mi padres y hermano Leandro,
a ti Julio por ser tan especial*

RESUMEN

La gran variabilidad de compuestos con actividad antifúngica, que excretan al medio las bacterias aerobias formadoras de endosporas (BAFE), es una de las causas por la que son aprovechadas en el control biológico de muchos patógenos vegetales. En este trabajo, se determinó el efecto antagónico *in vitro* de cinco aislados identificados como BAFE de la clase bacilli, frente a tres fitopatógenos del cultivo de la caña de azúcar, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Curvularia gudauskasii*. El ensayo de antibiosis en placa de estos aislados (CCEBI-1063, CCEBI-1064, CCEBI-1065, CCEBI-1066 y CCEBI-1067) mostró diferencias en cuanto al efecto inhibidor del crecimiento de los fitopatógenos, destacándose la cepa CCEBI-1065 con valores superiores al 65% de inhibición, frente a los tres hongos ensayados. La identificación de las bacterias antagonistas, se realizó por el análisis de las secuencias parciales del gen ADNr 16S, confirmando su ubicación dentro de la familia Basillaceae, género *Bacillus*. Se estudió el filtrado libre de células del mejor antagonista y se evaluó su efecto sobre el crecimiento de uno de los fitopatógenos. Se determinó que al menos una de las causas de la inhibición, estaba relacionada con la excreción de metabolitos antifúngicos. El filtrado activo fue separado en dos fases, con una mezcla de cloroformo-metanol, sometiendo ambas fracciones (orgánica y acuosa) a la prueba de antibiosis por el método de los pocillos. Sólo la fracción orgánica resultó positiva, demostrando la presencia de lípidos en la estructura de los compuestos bioactivos.

ABSTRACT

The great variability of compounds with antifungal activity that are excreted by aerobic endospore forming bacterium (AEFB), it is one of the causes which one that they are used in the biological control against many plant pathogens. In this work, the antagonistic effect of five isolated of the class bacilli classified as AEFB was determined *versus* three pathogens fungi of the cane of sugar cultures: *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* and *Curvularia gudauskasii*. The inhibitory effect of the five antagonistics (CCEBI-1063, CCEBI-1064, CCEBI-1065, CCEBI-1066 and CCEBI-1067) showed differences. The strain CCEBI-1065 was of better results, with values highest to 65 inhibition%, in front of the three fungi assayed. The identification of the antagonistic bacteria, was carried out for the analysis of the partial sequences of the ADNr 16S, confirming its location inside the genus *Bacillus*. The filtrate free cell of the best antagonist was studied and its effect was evaluated about the growth of one of the pathogens (*Curvularia gudauskasii*). It was determined that at least one of the causes of the inhibition, was related with the excretion of secondary metabolites antifungal. The active filtrate was separated in two phases, with a chloroform-methanol mixture, subjecting both fractions (organic and watery) to the antibiosis test for the method of the sumps. The organic fraction was only positive, demonstrating the acid fatty presence in the structure of the active compound.

LEYENDA

BAFE: bacterias aerobias formadoras de endosporas

RPCV: rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

TBE: tampón trisborato EDTA

RDP II: Ribosomal Database Project

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

NCBI: National Centre of Biotechnology Information

ELC: extracto libre de células

INDICE	Página
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	4
II.1 El control Biológico: una forma de aprovechar las potencialidades de los microorganismos.	4
II.2 Características del género <i>Bacillus</i>	5
II.2.1 Identificación de bacterias del género <i>Bacillus</i> por secuenciación del gen ADNr 16S.....	6
II.3. Potencial del género <i>Bacillus</i> en la producción de metabolitos con actividad antifúngica.	7
II.3.1 Productos comerciales elaborados con cepas del género <i>Bacillus</i> para el control de microorganismos.....	8
II.4. Enfermedades de la caña de azúcar en Cuba.....	9
CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS.....	11
III.1 Cultivos microbianos.....	11
III.2 Evaluación del efecto de las BAFE sobre el crecimiento radial de los fitopatógenos de caña de azúcar.....	11
III.2.1 Ensayo del crecimiento de los fitopatógenos en Agar Nutriente y obtención de los inóculos para la antibiosis.....	11
III.2.2 Prueba de antibiosis en placas.....	11
III.3 Análisis parcial de las secuencias del ADNr 16S de las bacterias aerobias formadoras de endosporas.....	12
III.3.1 Extracción de ADN total.....	12
III.3.2. Visualización y determinación de la concentración de ADN.....	13
III.3.3 Purificación del producto de PCR.....	14
III.3.4. Secuenciación parcial del producto amplificado del gen ADNr 16S	14
III.3.5 Alineamiento de las secuencias parciales del gen ADNr 16S de las BAFE.....	14
III.4 Evaluación del crecimiento de la cepa bacteriana con mayor actividad antagonista.....	15
III.4.1 Preparación del pre-inóculo.....	15

III.4.2 Estudio cinético.....	15
III.5 Obtención del extracto libre de células (E.L.C).....	15
III.5.1 Caracterización del extracto libre de células (E.L.C).....	15
III.5.2 Concentración parcial del extracto libre de células.....	16
III.5.3 Evaluación del E.L.C y sus fracciones. Pruebas de antagonismo in vitro.....	16
III.7 Análisis Estadístico de los datos.....	17
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
IV.1 Determinación del efecto antagónico de las bacterias aerobias formadoras de endosporas frente a los hongos fitopatógenos.....	18
IV.2 Análisis de las secuencias parciales del ADNr 16S de los aislados bacterianos estudiados.....	22
IV.3 Evaluación del crecimiento del antagonista seleccionado en Caldo Nutriente y caracterización del extracto libre de células (E.L.C).....	24
IV.4 Evaluación del E.L.C. Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i>	25
IV.5 Pruebas de antagonismo in vitro de las fracciones obtenidas a partir del extracto libre de células.....	27
CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	29
CAPITULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ANEXOS	

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

La pérdida de la diversidad biológica así como, la contaminación de ríos y aguas subterráneas, la aparición de microorganismos indeseables, resistentes a los agroquímicos, los altos costos de adquisición en el mercado internacional y las graves consecuencias para la salud del hombre y los animales, fueron entre otras, las principales consecuencias asociadas al uso de fertilizantes químicos (Christiansen *et al.*, 2005). Esta práctica, resultado en nuestro país de la puesta en marcha de una agricultura totalmente tradicional, se ha ido transformando en otra progresivamente ecológica, donde prima el aprovechamiento de residuos, los policultivos, el empleo de medios biológicos, el uso de biofertilizantes y otros procesos que contribuyan a su vez a la disminución de la importación de recursos externos (Hernández *et al.*, 1994).

El uso de inoculantes biológicos como forma de control de las plagas y enfermedades que dañan a los cultivos, ha demostrado ser una alternativa económica y factible desde el punto de vista ambiental y sanitario. La posibilidad de obtener elevados rendimientos agrícolas y al mismo tiempo preservar el medio ambiente, está irremediablemente ligada al uso generalizado de estos productos (Sanjuán, 2008). Por lo general, estas formulaciones tienen como principio activo los metabolitos y/o los microorganismos responsables de la actividad promotora del crecimiento (Valenciaga, 1999). Estos metabolitos son resultado de las distintas formas que tienen los microorganismos para competir en su ambiente y mediante la cual logran mantener a las poblaciones fitopatógenas controladas. Existe una amplia gama de compuestos con estas características, entre los que se encuentran: los antibióticos clásicos, algunos productos del metabolismo, agentes líticos, numerosos tipos de exotoxinas proteicas y bacteriocinas (Lavermicocca *et al.*, 2003; Compant *et al.*, 2005).

Los mecanismos mediante los cuales puede lograrse el biocontrol de fitopatógenos son varios, de ellos la antibiosis ha sido uno de los más estudiados. La posibilidad de reproducir este mecanismo *in vitro*, ha facilitado el conocimiento de las potencialidades de los agentes de control biológico frente a sus blancos fundamentales, los patógenos vegetales. Estos microorganismos considerados saprófitos, son habitantes de la rizosfera de las plantas y es aquí donde establecen de manera natural, complejas interacciones con otras especies de microorganismos (Fernández-Larrea, 2001; Hernández *et al.*, 2007). Dentro de las poblaciones rizosféricas que han sido estudiadas por la relación

que establecen con las plantas, se encuentran las bacterias aerobias formadoras de endosporas (BAFE) ó (AEFB, del inglés *aerobic endospore forming bacteria*). Es conocido que este grupo de bacterias, además de promover el crecimiento vegetal, por varias mecanismos (mineralización de sustancias orgánicas, síntesis de fitohormonas, etc), son capaces de afectar el crecimiento de varias especies de fitopatógenos, ocasionando daños morfológicos diversos (Mc. Spandden, 2004; De-Bashan *et al.*, 2007).

Actualmente nuestro país emprende con bastante éxito la producción de inoculantes a partir de hongos micorrizógenos y bacterias del suelo, entre ellas las (BAFE). Algunos de estos productos han sido probados con éxito en la agricultura cubana y en países de Latinoamérica en la producción de posturas de café, cítricos y frutales, semilleros de hortalizas y en la fase de adaptación de vitroplantas de piña, banano y caña de azúcar (Fernández *et al.*, 1997; Vázquez *et al.*, 2007). Lo anteriormente expuesto reafirma la importancia del control biológico como alternativa para lograr una agricultura sustentable con cultivos más saludables.

Problema

En el cultivo de la caña de azúcar, las enfermedades de origen fúngico han constituido una de las causas de sustitución de las principales variedades en explotación comercial, fenómeno que se manifiesta en Cuba y en el resto de los países que cultivan esta gramínea; teniendo como principal estrategia de control el tratamiento hidrotérmico y el uso de agroquímicos.

Hipótesis de Trabajo:

Si se demuestra el efecto inhibitor de cultivos de bacterias aerobias formadoras de endosporas, así como de sus filtrados celulares, sobre hongos fitopatógenos; entonces será posible asociar este efecto a la producción de sustancias bioactivas de interés fitosanitario.

Objetivo general:

Evaluar las potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas (BAFE), así como del extracto libre de célula de estos aislados en la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de la caña de azúcar.

Objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto inhibidor de bacterias aerobias formadoras de endosporas de la clase *bacilli*, sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos de caña de azúcar.
2. Identificar los aislados bacterianos mediante el análisis de secuencias parciales del gen ADNr 16S.
3. Seleccionar las bacterias con mayor actividad inhibitoria del crecimiento *in vitro* de los hongos fitopatógenos.
4. Evaluar el efecto antifúngico de extractos libres de células, de los aislados seleccionados.

Aportes de la Tesis

- Amplia los conocimientos que se tienen acerca de la capacidad de las bacterias del género *Bacillus* para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos del suelo.
- Aporta el empleo de la cepa de *Bacillus* CCEBI-1065 para el control biológico de hongos fitopatógenos de los géneros *Curvularia* y *Fusarium*.
- Confirma la utilidad de los métodos moleculares para la ubicación taxonómica de grupos microbianos estrechamente relacionados.

CAPITULO II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.

II.1. El control biológico: una forma de aprovechar las potencialidades de los microorganismos.

El control biológico puede definirse como el “uso de organismos naturales o modificados, genes o productos de genes, para reducir los efectos de organismos indeseados y favorecer a organismos deseables como cultivos vegetales, animales o microorganismos”. Los microorganismos pueden desarrollar diversas estrategias para garantizar la supervivencia dentro de un ambiente determinado, natural o artificial; dentro de estas se incluyen la competencia por un mismo sustrato o nicho ecológico y la síntesis de compuestos inhibitorios como sideróforos, antibióticos y enzimas líticas (Matiru y Dakora, 2004; Trujio *et al.*, 2007). La antibiosis, es de los mecanismos de control biológico, el que más ha llamado la atención de especialistas en todo el mundo. Precisamente la posibilidad de reproducirlo *in vitro*, constituye una de sus ventajas, aspecto que ha facilitado el conocimiento de las potencialidades de los agentes de control biológico frente a sus blancos fundamentales, los patógenos vegetales.

Por lo general, los microorganismos antagonistas habitan en la rizosfera de las plantas o en las superficies de las hojas (filoplano), es aquí donde establecen de manera natural complejas interacciones con otras especies de microorganismos (Zhou *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2007) Dentro de las poblaciones rizosféricas que han sido estudiadas se encuentran las bacterias aerobias formadoras de endosporas, denominadas también como Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR, del inglés *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*: Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal), pues también desarrollan otras funciones de gran beneficio para las plantas como son: la producción de fitohormonas, disponibilidad de nutrientes como el fósforo y el nitrógeno y la inducción de resistencia (Kloepper y Schroth, 1978; Mc. Spandden, 2004; De-Bashan, 2007). Para la selección estos microorganismos hay que tener en cuenta varios aspectos, dentro de ellos se destacan por su importancia: la habilidad para colonizar rápidamente las superficies vegetales y persistir en ellas en niveles efectivos, estabilidad genética, efectividad a bajas concentraciones y frente a una amplia gama de microorganismos patógenos, capacidad de sobrevivir y desarrollarse bajo condiciones ambientales diversas y la facilidad para reproducirse en medios de bajo costo (Hernández *et al.*, 2007).

El género *Bacillus*, cuyo potencial en la inhibición del crecimiento de microorganismos fitopatógenos ha sido reconocido por más de 50 años, es un buen candidato para la formulación de biocontroles de alta efectividad. Por esta razón, la búsqueda de cepas autóctonas de este género, que puedan promover el crecimiento vegetal por cualquiera de las vías antes mencionadas resulta muy provechosa (Fernández-Larrea, 2001; Stein, 2005; Hernández *et al.*, 2007).

II.2. Características del género *Bacillus*.

Las bacterias del género *Bacillus* están clasificadas dentro de los microorganismos aerobios o anaerobios facultativos, productores de catalasa y Gram positivos. El nombre del género se debe a Ferdinand Cohn (1872). La mayoría de las especies son móviles por flagelos de inserción peritrica (excepto *B. anthracis* que es inmóvil), aunque en principio, cuando las células están creciendo activamente en un medio rico en nutrientes, carecen de flagelos. Bajo determinadas condiciones pueden formar cápsulas; así como, pigmentos de color rojo, negro, amarillo y anaranjado. Por lo general, se les encuentra en el suelo que es su hábitat principal, pero también pueden hallarse ampliamente difundidos en las aguas, sedimentos marinos, fango, alimentos, productos farmacéuticos, etc. Las temperaturas de crecimiento están comprendidas entre -5 y 55 °C; es decir existen especies psicrófilas, mesófilas y termófilas. Los valores de pH apropiados para su crecimiento son de 6.5-7, aunque existen especies que soportan pH muy ácidos (Hernández y Dubón, 1992; Schlegel, 1997).

En general, estos organismos son productores de endosporas, a excepción de *B. halodenitrificans* que es incapaz de esporular, las que pueden estar localizadas en posición central, subterminal, terminal o lateral en el interior de la célula vegetativa. La resistencia térmica de las endosporas de *Bacillus* varía considerablemente según la especie y parece depender de la temperatura óptima de crecimiento del microorganismo (Wulff *et al.*, 2002; Handelsman y Stabb, 1996). Estas bacterias también resisten ante agentes perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos (Kennedy *et al.*, 1997; Guerrero y Berlanga, 2000).

Muchas bacterias de este género, presentan enzimas hidrolíticas extracelulares que permiten la descomposición de polisacáridos, ácidos nucleicos y lípidos, posibilitando así que el organismo emplee todos estos compuestos como fuentes de carbono y donadores de

electrones. Ellas crecen bien en medios sintéticos que contienen azúcares, ácidos orgánicos y alcoholes, como las únicas fuentes de carbono; y el amonio como única fuente de nitrógeno. Estos microorganismos se caracterizan además por la síntesis de varios antibióticos, que son responsables de su acción inhibidora contra algunos fitopatógenos y son ejemplos de estos: la bacitracina, polimixina, tirocidina, subtilisina, bacilina, gramicidina y circulina (Harwood, 1989; Hernández y Dubón, 1992; Muhammad y Amusa, 2003).

II.2.1. Identificación de bacterias del género *Bacillus* por secuenciación del gen ADNr 16S.

La comparación entre secuencias del gen ADNr 16S, ha resultado ser una poderosa herramienta para establecer deducciones y relaciones filogenéticas entre bacterias, archeabacteria y organismos eucariotas. Este gen, fue seleccionado como un candidato molecular por varias razones: está presente en todos los organismos y desempeña en ellos la misma función; es suficientemente conservado y contiene en su secuencia, además de las regiones conservadas, regiones variables e hipervariables; tiene una talla que permite su fácil secuenciación (1500 bases) y lo bastante larga como para contener suficiente información para la identificación y análisis filogenético (Spratt, 2005). Esta tecnología involucra una serie de pasos que terminan con la identificación comparativa de las secuencias analizadas, usando como referencia las que ya se encuentran depositadas en la base de datos Ribosómica o del Banco de Genes del Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI del inglés: National Center for Biotechnology Information). Para realizar el estudio se parte de la extracción del ADN de un cultivo puro, que luego es amplificado (ADNr 16S) mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa PCR (PCR del inglés: polymerase chain reaction); el producto es chequeado posteriormente mediante una electroforesis utilizando para ello un soporte compacto (agarosa o poliacrilamida), seguidamente se realiza la purificación, secuenciación y posterior comparación entre las secuencias obtenidas y las depositadas en las bases de datos antes mencionadas (Yeates *et al.*, 1998; Siqueira *et al.*, 2003; Spratt, 2005). El análisis filogenético puede realizarse por varios métodos, uno de ellos, el Neighbor Joining (NJ), construye árboles filogenéticos a partir de una matriz de distancia de acuerdo con el principio de evolución mínima, es por esto que se considera como una aplicación muy útil cuando se hacen comparaciones entre grupos muy estrechamente relacionados (Hall, 2001; Tamura *et al.*, 2007) .

En el caso particular de las bacterias aerobias formadoras de endosporas, derivadas taxonómicamente del género *Bacillus*, estos estudios permitieron revelar la diversidad sistemática existente en el grupo. Precisamente esta fue la base para su reclasificación a partir del año 1991 y la razón por la cual actualmente la clase Bacilli comprende además de la familia *Bacillaceae*, otras dos familias, *Alicyclobacillaceae* y *Paenibacillaceae*, con 25 géneros entre los cuales se encuentra *Bacillus* (Fritze, 2004). A pesar de las ventajas que ha proporcionado este método dentro del grupo, no arroja muchas luces en la identificación a nivel de especie debido a la naturaleza altamente conservada del gen en grupos bacterianos muy cercanamente relacionados. No obstante otros genes han sido utilizados con este fin, sin que por ello se reste importancia a este gen como marcador molecular, algunos de estos genes son: *nifH*, *spas* y *spaBTC* el primero relacionado con los procesos de fijación del nitrógeno y los dos últimos, relacionados con la biosíntesis de la subtilisina en *B. subtilis* (Rooney *et al.* 2009; Stein, 2005, Spadden, 2004)

II.3. Potencial del género *Bacillus* en la producción de metabolitos con actividad antifúngica.

El potencial de *Bacillus* sp. para sintetizar metabolitos con actividad antifúngica y antibacteriana se ha utilizado en diversos países de la región Latinoamericana para el control biológico de fitopatógenos. Los primeros reportes del empleo de cepas de *Bacillus* sp. como agente de control biológico aparecen en los trabajos publicados por Phae *et al.* (1992) y Hiraoka *et al.* (1992). El grupo de Hiraoka logró aislar una cepa de *Bacillus subtilis*, la RB14, demostrando su capacidad de excretar al medio dos sustancias con actividad biocida: la iturina, un fungicida que produce lisis de la pared celular y la membrana citoplasmática de hongos filamentosos, ocasionando malformaciones en las hifas y cambios en la morfología del hongo y la subtilisina o surfactina, un bactericida con acción superficial sobre la membrana citoplasmática de las bacterias fitopatógenas. Los antibióticos peptídicos de *Bacillus subtilis* poseen una región altamente hidrofóbica y/o estructuras cíclicas con una inusual constitución de D-aminoácidos y son generalmente resistentes a la hidrólisis por peptidasas y proteasas (Stein, 2005). Su importancia desde el punto de vista ecológico radica en que los microorganismos que son susceptibles, tienen una menor probabilidad de generar resistencia frente a ellos comparándolos con los antibióticos convencionales (Orad *et al.* 2004; Stein, 2005).

Junto a la iturina también se han descrito en los últimos años una serie de lipopéptidos cíclicos, algunos de los cuales son potentes agentes fungicidas. Estos agentes consisten en un heptapéptido cerrado por un β - aminoácido con una cadena lateral alifática y dentro de esta familia se encuentran la Iturina C, Bacilomicina D, Bacilomicina L, Bacilomicina F y Micosubtilina. Otros grupos de lipopéptidos cíclicos aislados de cepas de *Bacillus* son las plipastatinas de *B. cereus*. Estos compuestos son una familia de decapeptidos acilados que se aislaron originalmente como inhibidores de la fosfolipasa pancreática porcina A2; pero luego se constató que inhibían algunos hongos patógenos de plantas, incluyendo *Botrytis*, *Pyricularia* y *Alternaria*. El tamaño de estos polipéptidos generalmente no superan los 2000 Da. Se ha descrito que el modo de acción de estos lipopéptidos cíclicos es mediante la interacción con las membranas fúngicas, creando poros voltaje-independiente (Stein, 2005; Heins *et al.*, 2007).

También se ha demostrado que la producción de enzimas hidrolíticas es una parte importante dentro de los mecanismos de acción de los agentes antagonistas. El género *Bacillus* ha sido señalado en diversos estudios como productor de estas enzimas, aspecto que ha posibilitado formular biopreparados con las propias cepas o con sus sobrenadantes. Dentro de las enzimas involucradas destacan la familia de las hidrolasas donde se puede citar a las quitinasas, proteasas, β -1,3-glucanasas y las celulasas (Morales de la Vega *et al.*, 2006).

Por ejemplo, la producción de quitinasas por algunas especies de *Bacillus* es ya un aspecto comprobado que ha permitido dilucidar el mecanismo mediante el cual estas bacterias logran buenos resultados en el control biológico de microorganismos fitopatógenos (Aktuganov *et al.*, 2007). Se ha observado que algunas cepas de *B. thuringiensis* producen quitinasas las cuales son utilizadas contra hongos fitopatógenos del suelo (Morales de la Vega *et al.*, 2006). Las quitinasas producidas por *B. cereus* pueden inhibir eficazmente el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Pythium ultimum*. Se ha demostrado que especies como *B. alvei* y *B. lentus* como también segregan quitinasas durante su crecimiento (Liu *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003).

Por otro lado, existen estudios que señalan al género *Bacillus* con un gran potencial en la producción de proteasas. Estas pueden ser metaloproteasas que trabajan a pH óptimo de 7.0; esterasas, enzimas con alta actividad esterolítica y baja actividad proteolítica, y serinproteasas (proteasas alcalinas). (Rojas-Avelizapa, 1999; Saez-Vera, 2006).

II.3.1. Productos comerciales elaborados con cepas del género *Bacillus* para el control de microorganismos.

Varios reportes indican que la efectividad de las cepas del género *Bacillus* en el control de microorganismos fitopatógenos, va más allá del uso de la propia célula como principio activo. Al respecto se ha demostrado, que los filtrados de caldos libres de células de especies como *B. pumilis*, *B. subtilis* y *B. polymyxa* (actualmente *Paenibacillus polymyxa*) son activos contra los hongos *Botrytis* y *Alternaria* en pruebas *in vitro*; esto se debe a la presencia de antibióticos producidos en el filtrado de cultivo libre de células y su actividad a diferentes valores de pH (Beatty y Jensen, 2002; Heins *et al.*, 2007). Todas estas características han posibilitado el desarrollo de biopreparados con excelentes propiedades antimicrobianas y estimuladoras del crecimiento vegetal (Fernández-Larrea, 2001; Bautista-Baños, 2006; Heins *et al.*, 2007).

Existen numerosos productos comerciales que tienen dentro de sus componentes metabolitos activos pertenecientes a dichas cepas o las cepas en sí; tal es el caso del producto Laminar[®] (*Bacillus subtilis*), cuya comercialización comenzó a finales de la década del 90. Este es capaz de controlar especies fúngicas de los géneros *Phytophthora* y *Rhizoctonia*. Otro producto con actividad similar es el Probacil[®], confeccionado a partir de la cepa de *B. subtilis* BEB-8bs y comercializado por la empresa mexicana LAPISA; el cual posee entre sus ventajas, el permitir un control prolongado de enfermedades del suelo producidas por *Rhizoctonia* y *Fusarium* (Jiménez *et al.*, 2003). El MD-1 es otro de los productos con aplicación microbiana que incluye dentro de su formulación a bacterias de este género (*B. subtilis* B. *licheniformis*). Lo mismo ocurre con el BS, biopreparado a base de *B. subtilis* destinado a la limpieza de locales, tratamiento de aguas residuales, alimentos para animales y aplicaciones microbianas.

II.4. Enfermedades de la caña de azúcar en Cuba.

La caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) es una planta de gran interés agrícola que se cultiva ampliamente en los países tropicales. El cultivo de la caña de azúcar en Cuba ha constituido desde la época colonial un renglón importante, sin embargo no es hasta el primer cuarto del siglo XX que se convierte en el principal cultivo (Pérez *et al.*, 2006).

Las enfermedades constituyen uno de los principales factores negativos para la producción azucarera mundial. En las últimas décadas, se ha incrementado considerablemente el número de organismos patógenos detectados sobre este cultivo. Hasta la fecha se describen, gracias al

empleo de técnicas inmunoenzimáticas y la aplicación de la Biología Molecular, 114 enfermedades que atacan este cultivo (Rott *et al.*, 2000).

En Cuba las primeras investigaciones al respecto, comenzaron en 1904 con la fundación de lo que es hoy el Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical (INIFAT); de manera que el primer reporte listó un total de 23 enfermedades, de las cuales el 65 % eran producidas por hongos. Esta cifra en 1977 había aumentado a 46 y para el 2002 ya se habían detectado 57, de ellas 35 de origen fúngico (Chinea, 2005). En estos momentos de estas 35 patologías se destacan ocho por su importancia desde el punto de vista fitopatológico, estas son: Carbón, causada por *Ustilago scitaminea* Sydow; Roya, *Puccinia melanocephala* Sydow; Mancha de ojo, *Drechslera sacchari* Butl.; Mancha amarilla, *Cercospora koepkei* Krüger; Pokkah boeng, *Fusarium moniliforme* Sheldon; Raya parda, *Drechslera stenospila* Drechs.; Pudrición roja, *Colletotrichum falcatum* Went. y la Marchitez, *Cephalosporium sacchari* E. Butler (Chinea A, 2005).

Algunas de estas patologías constituyen verdaderos problemas en bancos de semillas y en la producción de plantas *in vitro* de caña de azúcar, reportándose por este concepto pérdidas estimadas entre 13 y 31% en diferentes fases del cultivo. Por este motivo, el Programa Nacional de Enfrentamiento a las enfermedades de la caña de azúcar continúa desarrollando investigaciones y estrategias agroecológicas destinadas al biocontrol de las enfermedades del cultivo en el país (Alfonso y González, 1994; Alvarado *et al.*, 2003; Iglesias *et al.*, 2003).

CAPITULO III. MATERIALES Y METODOS.

III.1. Cultivos microbianos.

Se utilizaron cinco cepas bacterianas aerobias formadoras de endosporas (BAFE), aisladas de la rizosfera del jardín de plantas ornamentales “Las Américas” de Santiago de Cuba. Dichas cepas se encuentran conservadas en la Colección de Cultivos del Centro de Estudios de Biotecnología Industrial (CEBI) de la Universidad de Oriente.

Las cepas de hongos fitopatógenos utilizadas (*Fusarium solani*, *Curvularia gudauskasii* y *Fusarium oxysporum*), fueron colectadas en plantaciones cañeras afectadas de la zona occidental del país y conservadas por el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones de la Caña de Azúcar (INICA).

III.2. Evaluación del efecto de las BAFE sobre el crecimiento radial de los fitopatógenos de caña de azúcar.

Se desarrollaron bioensayos *in vitro*, para determinar el efecto antagónico de las cepas bacterianas frente a los hongos fitopatógenos. En todos los casos se siguió la metodología descrita por Muhammad y Amusa (2003).

III.2.1. Ensayo del crecimiento de los fitopatógenos en Agar Nutriente y obtención de los inóculos para la antibiosis.

Los hongos se sembraron previamente en el medio de cultivo seleccionado, Agar Nutriente (AN) y se incubaron a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 6 días. El medio se escogió luego de comprobar que el crecimiento del fitopatógeno era aceptable en el mismo. Se realizaron perforaciones en las placas previamente sembradas al cabo de los 6 días. Para ello se perforó la parte central de la colonia utilizando la parte superior de puntas desechables estériles de 9 mm diámetro.

III.2.2. Prueba de antibiosis en placas

Para esta prueba se siguió la técnica descrita por Muhammad y Amusa (2003), para ello se prepararon placas Petri de 120 mm de diámetro, conteniendo 20 ml de Agar Nutriente (BIOCEN). En el centro de las placas se inoculó un disco de 9 mm de diámetro del hongo patógeno, obtenido de un inóculo de 6 días. Las cepas bacterianas presuntas productoras de sustancias antagonistas fueron inoculadas en puntos periféricos equidistantes del centro de la placa a 20 mm. Se incubó posteriormente a $32^{\circ}\text{C} \pm 2$ en posición invertida y en la oscuridad

hasta 10 días. Se determinaron los halos de inhibición del crecimiento fúngico y con este dato se calculó el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR) (*Ec. 1*). Se preparó además un control consistente en la siembra del hongo en ausencia de bacterias. La observación y medición del crecimiento radial de las colonias se realizó cada 24 horas, durante 10 días.

$$\%PICR = \frac{R1 - R2}{R1} 100 \dots\dots\dots Ec. 1$$

Donde R 1,2 son los radios de las colonias del hongo fitopatógeno ensayado en ausencia y presencia de las bacterias aerobias formadoras de endosporas (BAFE), respectivamente.

III.3. Análisis parcial de las secuencias del ADNr 16S de las bacterias aerobias formadoras de endosporas.

III.3.1. Extracción de ADN total.

El ADN total fue extraído directamente a partir de las colonias puras de cada uno de los antagonistas ensayados (CCEBI-1063, CCEBI-1064, CCEBI-1065 CCEBI-1066 y CCEBI-1067). Para ello, los aislados bacterianos fueron inoculados en Agar Nutriente al cual se le añadió 5 mg.mL⁻¹ de MgSO₄ para inducir la esporulación (Sprot *et al.*, 1994) e incubados a 30°C durante 72h.

Para evaluar el método de fraccionamiento celular más adecuado, las células de una colonia previamente suspendidas en 1mL de agua destilada estéril, fueron centrifugadas a 12 000 rpm. El sedimento fue tratado mediante dos procedimientos. El primero es una modificación de la lisis alcalina reportada por Sprot *et al.*, (1994), consistente en la adición de 250 µL de una solución que contiene 40 mM de tampón Tris – Acetato pH 7.8, 20mM de Acetato de Sodio, 1mM de EDTA y 1% de dodecil sulfato de sodio (SDS). Posteriormente se añadieron 66 µL de NaCl 5M para precipitar el ADN (Yeates *et al.*, 1998). La segunda técnica consistió en una combinación de una ruptura enzimática, realizada mediante la adición de 5 µL de proteinasa K (10 mg.mL⁻¹) contenida en 200 µL de tampón de PCR (1X) y la congelación de las células digeridas a - 80° C durante 1 hora (Sambrook *et al.*, 1987). La proteinasa K fue activada por calentamiento de las muestras a 60° C durante 15 minutos e inactivada a 60° C durante 1 hora después de la congelación.

La extracción del ADN en ambos casos, se realizó con cloroformo y una centrifugación a 12 000 rpm durante 3 minutos. Posteriormente se precipitó con 2 volúmenes de etanol 100% helado y se centrifugó a 12 000 rpm por 10 minutos. Se realizaron dos lavados con 500 μ L de etanol 70 % y centrifugación a 12 000 rpm durante 5 minutos. Por último, el sedimento se dejó secar durante 20 h a 37°C, pasadas las cuales se resuspendió en 50 μ L de Bufer Tris – EDTA, al cual se le adicionaron 20 μ g/ml de RNAsa (Lane, 1991)

III.3.2. Visualización y determinación de la concentración de ADN

El ADN fue visualizado a través de una electroforesis en gel de agarosa (0,7 % p:v) en tampón Tris Borato EDTA (TBE) pH 8,3. La tinción del gel se realizó con bromuro de etidio (Lane, 1991). Se utilizó el marcador de pares de bases 1Kb DNA Ladder (PROMEGA). La cantidad de ADN total fue determinada para la selección del método de extracción más apropiada y para estandarizar la reacción de PCR. De igual manera se determinó la cantidad de ADN correspondiente al gen ADNr 16S amplificado para estandarizar la reacción de secuenciación. En ambos casos se realizó por espectrofotometría en un Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer a una λ = 260 nm.

La reacción en cadena de la polimerasa fue llevada a cabo con los deoxinucleótidos trifosfatos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), a una concentración de 40 μ M la enzima Taq DNA polimerasa BIOTOOLS, SA y 4 mM de $MgCl_2$. Para la amplificación se utilizaron los cebadores universales de eubacterias (SIGMA-Aldrich Life Science):

27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG) como cebador directo

1525r (5'-AAGGAGGTGWTCCAGCC) y

1492r (5'-CACGGATCCTACGGGTACCTTGTTACGACTT) como reversos.

Las concentraciones finales de los componentes de la reacción se ajustaron siguiendo las instrucciones del fabricante. Las condiciones establecidas en el termociclador fueron: una desnaturalización del ADN molde a 95°C por 2 minutos; 39 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineación a 57°C por 1 minuto y extensión a 72°C por 2 minutos; por último se realizó una extensión de 10 minutos.

III.3.3. Purificación del producto de PCR.

El producto amplificado fue purificado en columnas de sílica gel a partir del volumen total de la PCR, utilizando el juego Wizard SV Gel and Purification Clean – Up System, PROMEGA.

III.3.4. Secuenciación parcial del producto amplificado del gen ADNr 16S.

La obtención de las secuencias parciales fue realizada según el método de Sanger, en su variante automatizada, en un Secuenciador AbiPrism 3730xl con 96 capilares. La reacción de secuencia abarcó una región parcial del gen (aproximadamente 800 y 940 nucleótidos), utilizando el cebador directo 27f (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG).

III.3.5. Alineamiento de las secuencias parciales del gen ADNr 16S de las BAFE

Con el propósito de realizar la identificación de los aislados a partir del análisis de las secuencias parciales obtenidas del gen ADNr 16S, se compararon con otras previamente publicadas en dos de las bases de datos del Banco de Genes, Ribosomal Database Project (RDPII) y Basic Local Alignment Search Tool (Blast), ambas implementadas en el servidor del NCBI (Nacional Centre of Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). La secuencia de cada aislado se utilizó como secuencia de entrada. A partir del análisis realizado los aislados fueron identificados hasta nivel de género y las secuencias correspondientes depositadas en el Banco de Genes.

El programa CLUSTALX permitió el alineamiento de cada secuencia obtenida (Thompson *et al.*, 1997). Los parámetros considerados para el alineamiento fueron los recomendados por Hall (2001), los cuales incrementan el rigor del alineamiento y evitan la interpretación de falsas homologías debidas a artefactos del alineamiento: Alineamiento par a par (*apertura de gap: 35.00 y extensión de gap: 0.75*); Alineamiento múltiple (*apertura de gap: 15.00 y extensión de gap: 0.30*).

Los árboles fueron generados a través del programa MEGA4, versión 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), siguiendo el algoritmo de agrupamiento de vecinos (NJ). Se utilizó el test Bootstrap como medida de soporte de los clados obtenidos, con un total de 1000 réplicas. Para el análisis, fueron eliminadas regiones hipervariables o con presencia de gaps.

III.4. Evaluación del crecimiento de la cepa bacteriana con mayor actividad antagonista.**III.4.1. Preparación del pre-inóculo.**

Para el estudio se partió de muestras frescas (18 h de incubación) tomadas de la cepa seleccionada conservada, para lo que se tomó una asada bien cargada y se inoculó con ella 25 mL de caldo nutriente estéril contenido en frascos enlarmeyers de 250 ml de capacidad. El medio ya inoculado se mantuvo por 12 h en una zaranda (P-Selecta) a 150 rpm y una temperatura de $32^{\circ}\text{C} \pm 2$. El pH fue mantenido en el valor de $7,2 \pm 0,2$.

III.4.2. Estudio cinético.

Para el estudio cinético se tomó 1 mL del pre-inóculo y se sembró en un enlarmeyers de 500 mL de capacidad, conteniendo 100 mL de caldo nutritivo estéril. El cultivo se dejó crecer 74 h a $32^{\circ}\text{C} \pm 2$.

La medición del crecimiento celular se realizó por turbidez, determinando la densidad óptica D.O en el tiempo. Esta técnica se basa en la capacidad de las células microbianas de dispersar la luz que incide sobre éstas. Para el estudio se tomaron muestras cada 3 h durante las primeras 24 h. La absorbancia se midió a 620 nanómetros (nm) en un espectrofotómetro (Génesys 10).

El cálculo de la velocidad de crecimiento se efectuó mediante la ecuación:

$$\mu = \ln [D.O_2 / D.O_1] / (t_2 - t_1) \dots\dots\dots (Ec.2)$$

III.5. Obtención del extracto libre de células (E.L.C).

Se subcultivó la bacteria antagonista desde un cultivo sólido a Caldo Nutriente, y se incubó durante 6 y 21 hrs. con agitación constante (150 rpm) a $34^{\circ}\text{C} \pm 2$, para comprobar en qué fase del crecimiento microbiano se producía el compuesto responsable de la actividad. Posteriormente se tomaron los cultivos, se dejaron enfriar hasta $10^{\circ}\text{C} \pm 2$ y se centrifugaron durante 10 minutos a 5.000 rpm. Se extrajo el sobrenadante con puntas de micropipeta desachables y se filtró con membranas Milipore de $0,4 \mu\text{m}$.

III.5.1. Caracterización del extracto libre de células (E.L.C).

Se determinó el contenido de proteínas de los extractos obtenidos siguiendo la técnica de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Se preparó una solución patrón de seroalbúmina bovina (BSA), (BDH, Inglaterra) para la confección de la curva patrón, a la cual se recalculó la concentración

mediante lectura espectrofotométrica (D.O) a 280 nm. Las lecturas de absorbancia de las muestras se efectuaron a 650 nm. El cálculo de la concentración de las mismas se realizó mediante la ecuación de la curva patrón:

$$y = 0,0143x + 0,0771 \quad R^2 = 0,9865 \quad \dots\dots (Ec. 3)$$

La determinación de los carbohidratos totales solubles se realizó por el método de Fenol-Sulfúrico (Dubois *et al.*, 1956). Las lecturas espectrofotométricas de las muestras se efectuaron a 490 nm. Se utilizó como patrón una solución de glucosa (UNI-CHEM) de concentración conocida (1g/L). El cálculo de la concentración de las muestras se realizó mediante la ecuación de la curva patrón:

$$y = 0,0041x + 0,1222 \quad R^2 = 0,9908 \quad \dots\dots (Ec. 4)$$

Para determinar la presencia de lípidos en el extracto, se procedió a un ensayo cualitativo con la técnica de tinción con Sudán III. Dicha técnica se basa en la coloración selectiva (rojo-anaranjado) que toman los lípidos al reaccionar con el colorante. Se tomó como control negativo un tubo de ensayo con agua destilada.

III.5.2. Concentración parcial del extracto libre de células.

El extracto obtenido fue sometido a una separación en dos fases utilizando una mezcla de cloroformo-metanol en la proporción 2:1 según el Método de Folch. La porción clorofórmica se evaporó en un rotoevaporador marca IKA-werke de procedencia Alemana a 40°C hasta la total eliminación del solvente. El residuo aceitoso obtenido, correspondiente a la fracción orgánica se resuspendió en 5 mL de buffer fosfato pH 6.5 y se refrigeró hasta su utilización. La otra porción de la muestra (fracción acuosa) también se colectó y refrigeró hasta el momento de su uso.

III.5.3. Evaluación del E.L.C y sus fracciones. Pruebas de antagonismo *in vitro*.

Para determinar el efecto de los extractos libres de células de las cepas seleccionadas sobre los fitopatógenos, se empleó la técnica de difusión en pocillos modificada (Vignolo *et al.*, 1993). En la misma se evaluó el E.L.C obtenido a diferentes tiempos, 6 y 21 horas de incubación. Se prepararon placas con agar nutriente y se dejaron solidificar, luego se perforaron utilizando para ello puntas de micropipetas desechables estériles de 9mm de diámetro. En el centro de las

placas y equidistantes de los pocillos, se colocó un disco 9mm del fitopatógeno. Este disco se obtuvo a partir de colonias de 6 a 7 días de incubación. Se ensayaron dos fitopatógenos, *Curvularia gudauskasii*. En cada pocillos se depositaron 100 µL de filtrado. Las placas se incubaron a $34^{\circ}\text{C} \pm 2$ y transcurrido el periodo de incubación se evaluó el radio del halo de inhibición.

Se determinó igualmente la actividad residual de ambas fracciones obtenidas del ELC utilizando la técnica de los pocillos descrita anteriormente.

III.7. Análisis Estadístico de los datos.

Para graficar y tabular los datos se procedió a la determinación de parámetros descriptivos de las muestras: media y desviación estándar. Los resultados correspondientes a la inhibición del crecimiento de los hongos fitopatógenos se procesaron mediante un ANOVA-I. Para ello, previamente se comprobó la normalidad de los datos obtenidos mediante una prueba de Kolmogorov-Smirnov. Para determinar la significación estadística entre las medias se utilizó el Tests de Rangos Múltiples, utilizando el paquete estadístico Statgraphics Plus para Windows (MICROSOFT CORP) (5.1). Todas las pruebas fueron realizadas con $p \leq 0,05$.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

IV.1. Determinación del efecto antagónico de las bacterias aerobias formadoras de endosporas frente a los hongos fitopatógenos

El medio de cultivo seleccionado permitió un buen desarrollo de los hongos fitopatógenos bajo las condiciones de experimentación establecidas, por lo que se infiere que dichas condiciones fueron favorables para estos microorganismos. Al respecto es válido destacar, que el agar nutriente a pesar de ser un medio relativamente sencillo en cuanto a su composición, contiene los elementos nutricionales necesarios para el buen desarrollo de la mayoría de los microorganismos poco exigentes; la presencia de elementos nutritivos como la peptona y el extracto de carne, permite el crecimiento abundante de la mayoría de las bacterias y de los hongos; en estos componentes se concentran los carbohidratos y vitaminas requeridos para estos microorganismos (Carrillo, 2003; Guarro y Castañeda, 2007).

En la **Tabla 1** se muestran resumido los resultados obtenidos en el test de inhibición del crecimiento, al enfrentar las bacterias aerobias formadoras de endosporas (BAFE) con los fitopatógenos probados, donde la zona de inhibición del crecimiento se hizo evidente al segundo día de incubación. Este efecto logró mantenerse en todos los enfrentamientos hasta los 8 días de incubación, luego el crecimiento micelial fúngico volvió a reanudarse frente a cuatro de las cepas ensayadas: CCEBI-1063, CCEBI-1064, CCEBI-1066 y CCEBI-1067. No obstante, en ninguno de los casos el micelio llegó a cubrir el crecimiento bacteriano. La cepa CCEBI-1065 fue la única que logró controlar por más tiempo el crecimiento de los hongos fitopatógenos (14 días) (**fig. 1**).

Estos resultados reafirman las diferencias respecto a la efectividad en el tiempo, que pueden tener las bacterias aerobias formadoras de endosporas de la clase Bacilli cuando son enfrentadas en cultivos duales *in vitro* y la capacidad que tienen algunos hongos para continuar su supervivencia aún bajo condiciones de estrés ambiental. Ambas cuestiones dan respuesta al por qué el proceso de selección de bacterias antagonistas *in vitro*, se considera el paso más difícil en el desarrollo de un candidato promisorio para el control biológico de enfermedades (Bautista-Baños, 2006; Hernández *et al.*, 2007).

La **fig. 2** muestra los resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos fitopatógenos obtenido por las cinco bacterias antagonistas, donde el valor más bajo

superó el 25 %. Según los resultados obtenidos se aceptó como el mejor antagonista la cepa CCEBI-1065. Esta cepa fue capaz de inhibir el crecimiento micelial de los tres fitopatógenos probados, *Fusarium solani*, *Curvularia gudauskasii* y *Fusarium oxysporum* con valores superiores al 65 % en todos los casos. Por otro lado, la cepa CCEBI-1063 fue considerada la menos eficaz debido a la inestabilidad en cuanto a su actividad antagonista frente a los fitopatógenos, produciendo el valor más bajo de inhibición de crecimiento en todo el estudio (28.9 % frente a *Fusarium oxysporum*). Estas diferencias observadas en varios estudios han dado lugar a que algunos investigadores asignen categorías de toxicidad a las cepas capaces de producir altos porcentajes de inhibición del crecimiento. En este sentido García (2005) propone una escala en la que solamente considera como tóxica las bacterias que inhiben el 100 % del crecimiento del patógeno. Este criterio aceptado también por Ros *et al.* (2008) permite clasificar a las cinco cepas BAFE estudiadas como moderadamente tóxicas, aún con diferencias significativas en los porcentajes de inhibición obtenidos entre ellas. Precisamente esta es una prueba más de la diversidad en cuanto a las potencialidades antagónicas que exhiben las bacterias, sean o no del mismo género y especie.

Realizando un análisis específico del comportamiento de los fitopatógenos, se procede a resaltar algunas características. En el caso de *Fusarium solani*, fue el hongo ensayado más sensible al efecto de estas bacterias, con inhibiciones de su crecimiento por encima del 60 % en presencia de las BAFE aquí estudiadas. El test de Rango Múltiples reveló la existencia de dos grupos estadísticos, uno formado por las cepas CCEBI-1063 y CCEBI-1065 con 73 y 68 % respectivamente; y otro, en el que se agruparon el resto de las cepas (CCEBI-1064, CCEBI-1066 y CCEBI-1067) con 60 % cada una (**ver Anexo 1**).

En el enfrentamiento de las BAFE con *Fusarium oxysporum* se evidenciaron mayores variaciones en los resultados, mostrando tres grupos diferentes estadísticamente. El valor más bajo se obtuvo con la cepa CCEBI-1063 con 28,9 % seguida de la cepa CCEBI-1067 con 39 %, ambas formaron un mismo grupo. CCEBI-1065 y CCEBI-1064 también se agruparon debido a la no existencia de diferencias significativas entre ellas ($p=0.0049$, $F=15.69$), resultando las de mejor comportamiento pues mostraron una inhibición del 71 % y 60,5 %, respectivamente. La cepa CCEBI-1066 con 55 %, compartió en cuanto a efectividad un grupo homogéneo con la CCEBI-1064 (**ver Anexo 2**).

En el comportamiento contra *Curvularia gudauskasii* también se evidenciaron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición. En este caso se volvieron a destacar las cepas CCEBI-1064 y CCEBI-1065 con 67 y 70 % respectivamente. Las otras cepas (CCEBI-1063, CCEBI-1066 y CCEBI-1067) inhibieron el crecimiento radial en menos del 50 % (**ver Anexo 3**).

En las **figuras 3, 4 y 5** se muestra el efecto en placa de tres de las BAFE ensayadas sobre el crecimiento radial del hongo al que se enfrenta (A) comparado con el crecimiento de la colonia testigo (B). En los ensayos contra las dos especies del género *Fusarium* resalta la inhibición producida por la CCEBI 1065. Sin embargo, similitud del comportamiento en placa se aprecia de la CCEBI 1065 y CCEBI 1064 contra *Curvularia gudauskasii*. En todos los enfrentamientos los bordes de las colonias inhibidas mostraron un aplanamiento muy evidente respecto a la colonia testigo, con una zona muy bien delimitada entre dichos bordes y el crecimiento bacteriano.

Al respecto es válido destacar que las especies del género *Fusarium* son muy variables debido a sus características genéticas, aspecto que le permite interactuar con una gran variedad de cultivos, bajo una extensa gama de condiciones ambientales, desarrollándose a veces como fitopatógenos y otras como saprófitos (Pérez, 2002; Alvarado, 2005). Por otro lado, la mayoría de las especies pertenecientes al género *Curvularia* son patógenos facultativos, y su manifestación más característica está relacionada con la aparición de manchas en las hojas (mancha foliar) siempre que las condiciones de humedad le sean favorables (Mena, 2004).

En el cultivo de la caña de azúcar se han reportado al menos dos patologías de importancia relacionadas con especies de *Fusarium*: “Pokkah boeng” causada por *Fusarium moniliforme* Sheldon y “Marchitez” causada por *Fusarium sacchari*. Se han descrito igualmente otras dos enfermedades relacionadas con especies del género *Curvularia* entre las que se encuentran “Mancha de ojo” y la “Raya parda” (Chinea, 2005). El tratamiento a estas enfermedades se realiza fundamentalmente desde los bancos de semillas como medidas preventivas, utilizando para ello productos químicos y tratamientos hidrotérmicos (comunicación personal*). No obstante, se tiene referencias del uso de controles biológicos también como medida preventiva para disminuir las aplicaciones de fungicidas químicos.

Al respecto se ha reportado el uso de varias especies de *Trichoderma*, con las que se han obtenido resultados positivos en cuanto a la competencia por el sustrato y la marcada

antibiosis que muestran frente a los hongos fitopatógenos que atacan a la semilla. También se ha reportado el uso de bioproductos como el Gluticid, que tiene dentro de sus principios activos metabolitos antimicrobianos de cepas del género *Pseudomonas* (Alfonso *et al.*, 1999; Alfonso *et al.*, 2006).

Respecto al uso de bacterias aerobias formadoras de endosporas de la clase Bacilli, para el control de enfermedades en la caña azúcar no se tiene referencias, salvo el empleo de *B. thuringiensis* para el control de plagas. Sin embargo, como antecedentes otras investigaciones a nivel de laboratorio también han aportado evidencias del efecto que tienen los miembros de esta clase sobre diversas especies de *Fusarium*. Torres *et al.*, (2001) demostraron la eficacia de cepas de *Bacillus subtilis* en el control de tres especies de este género: *Fusarium oxysporium*, f. s. *lycopersici*; *F. moniliforme* y *F. solani*. También Orberá *et al.* (2009) reportaron valores de inhibición del crecimiento, similares a los obtenidos por la bacteria CCEBI-1065, de aislados autóctonos de *Bacillus* frente a una cepa de *F. oxysporum* patógena de plantas ornamentales.

En el caso de *Curvularia gudauskasii*, se tienen pocas referencias del efecto que tienen las BAFE sobre ella en particular, aunque se han reportado datos sobre la inhibición de otros representantes del género. Un estudio realizado en Cuba en el 2002, con el objetivo de evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* de *B. subtilis* sobre cepas fitopatógenas de *Curvularia sp.* y *C. lunata* evidenciaron porcentajes de inhibición entre el 66 y el 100 % respectivamente. Frente a este último fitopatógeno, Orberá *et al.* (2009) utilizando también aislados de *Bacillus* reportaron valores inferiores (53 al 61 % de inhibición) a los obtenidos en este estudio por dos de las mejores cepas ensayadas (CCEBI-1064 y CCEBI-1065).

Debido a los resultados obtenidos por la cepa CCEBI-1065 en la prueba de antibiosis, el estudio microscópico de las estructuras fúngicas de los fitopatógenos, se apoyó en los efectos ocasionados por el antagonista. En la **Tabla 2** se relacionan las malformaciones en las hifas de *C. gudauskasii*, *F. solani* y *F. oxysporum*.

A pesar de que *C. gudauskasii* no fue considerado el fitopatógeno más susceptible, las afectaciones producidas en las hifas del hongo, producto a la interacción con la bacteria aerobia formadora de endosporas (BAFE), fueron más evidentes desde el punto de vista morfológico y mostró mayor variedad. Por otro lado, los cambios morfológicos sobre las hifas de *F. solani*, que en este estudio fue el patógeno más inhibido, no superaron en número a los

observados en *C. gudauskasii*. Este aspecto, pudo estar relacionado con las características estructurales propias de cada hongo, y en este sentido se plantea, que la composición y organización de los fosfolípidos y/o esteroides de las membranas fúngicas, determinan en gran medida, el espectro de acción de antifúngicos como la iturina (Stein, 2005; Giacaman, 2006). Tampoco se descarta que al interior de la célula, hayan ocurrido cambios fisiológicos no estudiados, que condujeran a estas diferencias en cuanto a la inhibición del crecimiento de ambos fitopatógenos.

En la observación microscópica de las hifas de la colonia de *C. gudauskasii* (**fig. 6**) las imágenes reflejan una evidente hinchazón de las células que deforma completamente la estructura tubular de las hifas. Este efecto ha sido reportado como una de las malformaciones más comunes que ocurren en las hifas de los hongos al entrar en contacto con compuestos que desestabilizan los componentes del citoesqueleto (Bachewich y Heath, 1998, Deora *et al.*, 2009). Otra diferencia marcada es la presencia de agrupaciones de conidios en la muestra testigo y la ausencia de estos en la porción del micelio afectada. Este aspecto sugiere que el efecto de las bacterias antagonistas se manifiesta no sólo en las hifas vegetativas, sino también sobre las células conidiógenas afectando la esporulación. En las especies del género *Curvularia* la formación de conidios es un mecanismo muy distintivo que los diferencia de otros grupos, siendo muy representativa en la forma y número de estos (Guarro y Castañeda, 2007). Varias investigaciones han reportado este tipo de afectación en el crecimiento micelial de los hongos, bajo el efecto de antagonistas y drogas convencionales. Deora *et al.* (2005) encontraron que el número de zoosporas del fitopatógeno *Aphanomyces cochlioides* disminuyó frente a la bacteria antagonista *Pseudomonas* sp. Pereira y Said (2009), por otro lado reportaron un efecto similar sobre la germinación conidial de *Neurospora crassa* con el uso de agentes antimicóticos convencionales. La **figura 7** muestra las imágenes tomadas a las hifas normales y afectadas de *Fusarium solani*, en este caso se apreció como efecto más marcado la formación de bulbos, también manifestado en el caso de *Fusarium oxysporum*. Este efecto también fue encontrado en las hifas del fitopatógeno *Colletotrichum gloeosporioides* por acción de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* (Prapagdee *et al.*, 2008).

IV.2. Análisis de las secuencias parciales del ADNr 16S de los aislados bacterianos estudiados.

Previo a este trabajo, se realizó un estudio donde se caracterizó cada aislado desde el punto de vista morfológico y bioquímico (**ver Anexo 4**). Estas pruebas permitieron confirmar que las cepas ensayadas presentaban las principales características de la clase bacilli, dentro de las cuales se destacan la formación de endosporas, la motilidad y la producción de enzimas catalasa, ureasa y nitrato reductasa (Orberá *et al.*, 2009).

El análisis de las secuencias parciales obtenidas del gen ADNr 16 S de las cepas antagonistas, corroboró una vez más la ubicación de las mismas dentro del género. Los valores de máxima identidad entre las secuencias de los antagonistas estudiados y las de especies ya depositadas en el Banco de Genes son como sigue: el valor más bajo se presentó con la cepa CCEBI-1067 (95 %), luego le siguieron la CCEBI-1066 y CCEBI-1063 (96 %), la CCEBI-1065 (98 %) y por último la CCEBI-1064 (99 %). Estos porcentajes de similitud se consideran adecuados teniendo en cuenta que las cepas estudiadas no son conservadas; por lo que se infiere que son pocas las mutaciones ocurridas en la secuencia del gen ADNr 16 S de estas cepas. Se lograron obtener con el protocolo empleado segmentos de secuencias de 890 a 940 nucleótidos. La **tabla 3** recoge las secuencias de mayor similitud obtenidas en dos bases de datos de la NCBI; todas corresponden a especies del género *Bacillus* productoras de sustancias antimicrobianas que han sido aisladas de diferentes medios (Goto *et al.*, 2000).

La **fig. 8** muestra el árbol filogenético construido por el método de Neighbour Joining. En este caso se puso en evidencia que los cinco antagonistas estudiados guardan una estrecha relación entre ellos, ya que se ubicaron formando un cluster (grupo) que a su vez también guardó relación con la especie del género *Bacillus* usada como referencia (*B. subtilis*-AJ276351); en este grupo dos de los aislados secuenciados quedaron ubicados en una rama o clado, sugiriendo una relación filogenética más cercana entre ellas respecto a los otros aislados. Es válido destacar que esta ubicación, respaldada por valores de bootstrats superiores al 50%, reafirma las diferencias entre cada cepa aún cuando morfológicamente tiene mucha similitud. Por otro lado las especies *Alicyclobacillus* sp. (AM749794) y *Paenibacillus alvei* (AJ320491) formaron un grupo monofilético separado entre sí y del resto de las cepas. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Shida *et al.* (1997) quienes por medio de la secuenciación del ADNr 16S, lograron reubicar varias especies anteriormente situadas dentro del género *Bacillus*

en un nuevo género, *Paenibacillus*. Fritze (2004) también refiere la importancia de este método para separar filogenéticamente un género de otro dentro del grupo de las bacterias aerobias formadoras de endosporas. En sus trabajos dicho autor expone claramente, como difieren en cuanto a posición sistemática las especies del género *Paenibacillus* y *Alicyclobacillus* y esta a su vez con el género *Bacillus*.

Aunque no consideramos conclusivo de *per se* ubicar las cepas antagonistas dentro de la especie *B. subtilis* tomando como único criterio el análisis de este gen, la manera en que estas se agruparon permitió incluirlas dentro de la familia *Bacillaceae*, que incluye al género *Bacillus*.

IV.3. Evaluación del crecimiento del antagonista seleccionado en Caldo Nutriente y caracterización del extracto libre de células (E.L.C).

La selección del medio de cultivo para crecer el antagonista en medio líquido, se hizo considerando similitud con el medio utilizado en la antibiosis en placa. La **fig. 9** muestra el crecimiento de la cepa CCEBI-1065 en Caldo Nutriente. Este estudio permitió establecer, el tiempo aproximado de duración de cada fase de crecimiento en el medio seleccionado durante 24 horas. En la cinética de crecimiento no se evidenció fase de latencia debido a las condiciones de experimentación, ya que se partió de un preinóculo mantenido durante 13 horas en el mismo medio (caldo nutriente), aspecto que posibilita una rápida adaptación del microorganismos. La fase exponencial del crecimiento, se desarrolló en menos de 6 horas y la velocidad de crecimiento específica fue de 0.39 h^{-1} . Al respecto, se debe tener en cuenta que la velocidad de crecimiento de las bacterias del género *Bacillus*, varía según la composición del medio y los parámetros cinéticos que se le impongan al cultivo. Mendoza y Robles-Castillo, (2000), reportaron una cepa de *Bacillus thuringiensis*, cuya velocidad de crecimiento fue de $0,184 \text{ h}^{-1}$ en un residual pesquero "sanguaza" y bajo condiciones aeróbicas. Piñeiro *et al.* (2009), también reportaron una velocidad de crecimiento menor que la obtenida en esta investigación ($\mu = 0,205 \text{ h}^{-1}$), al hacer crecer una cepa de *Bacillus* (LPB-2) en un medio de enriquecimiento con plumas como principal fuente de carbono y energía. Por otro lado Espinosa (2005), realizó un estudio en el que hizo crecer una cepa de *Bacillus subtilis* (BSR6), frente a un medio completo (medio Schaeffer) suplementado con glucosa, reportando una velocidad superior ($\mu = 0.52 \text{ h}^{-1}$) a la obtenida en esta investigación.

Teniendo en cuenta estos criterios y la composición del medio de cultivo empleado (Caldo Nutriente, BIOGEN), el crecimiento de la cepa estudiada (CCEBI-1065), se considera aceptable. El máximo valor de población se obtuvo a las 12 horas, con una densidad óptica (D.O) de 1.342 nm lo que equivale aproximadamente a 9 g/L en peso seco (**ver Anexo 5**).

El análisis del contenido de proteínas y carbohidratos del extracto libre de células se llevó a cabo en dos momentos del crecimiento microbiano: a las 6 horas correspondientes a la culminación de la fase exponencial y a las 21 horas (fase estacionaria). Nótese como en el caso de las proteínas hay un ligero aumento cuando se analiza el primer intervalo (**fig. 9**), aspecto que indica la excreción de compuestos de naturaleza proteica, como pueden ser las enzimas, péptidos de señales, entre otros. Al respecto se ha planteado que varias especies de *Bacillus* son productoras de enzimas que se excretan durante la fase de crecimiento exponencial y que les son necesarias para aprovechar los nutrientes que les aporta el medio (Rojas-Avelizapa, 1999; Saez-Vera, 2006). Otra referencia de la excreción de compuestos de naturaleza proteica durante esta fase es la producción de bacteriocinas en bacterias Gram positivas como *Bacillus*. Se plantea que la producción de estos péptidos generalmente se inicia durante la fase media logarítmica y aumenta a un máximo cuando las células entran a la fase estacionaria (Buchman *et al.*, 1998).

Para el otro tiempo analizado (21 h) se mostró una disminución del contenido de proteínas respecto al control y al primer punto, lo cual además de denotar un consumo de estas reservas, sugirió la presencia de proteasas que hidrolizan compuestos proteicos excretados en el extracto o resultados de la lisis bacteriana. En este sentido Razo *et al.* (2008), demostraron la producción de proteasas, en una cepa mexicana de *Bacillus subtilis* aislada de fresa; constatando que la mayor excreción de estas se presentó entre las 18 y 21 horas de cultivo. Por otro lado, los niveles de carbohidratos disminuyeron desde el inicio del cultivo, aspecto que estuvo asociado al activo crecimiento del microorganismo. Se pudo determinar además la presencia de lípidos o fracciones de estos en el extracto; donde la evidencia positiva fue la coloración anaranjada que tomó la muestra al ser tratada con el Sudan III, un colorante específico para esta biomolécula (**fig. 10**).

IV.4. Evaluación del E.L.C. Pruebas de antagonismo *in vitro*.

El ensayo de antibiosis realizado a los dos E.L.C., permitió demostrar la presencia de metabolitos antifúngicos sólo en la muestra tomada a las 21 horas, por lo que pueden ser clasificados como metabolitos secundarios o no asociados al crecimiento (Alexander, 1977). En este sentido Leifert *et al.* (1995) encontraron que la totalidad de los extractos de caldos libres de células de dos cepas de *Bacillus*, *B. subtilis* CL27 y *B. pumilis* CL 45, eran activos contra *Botrytis* y *Alternaria* en pruebas *in vitro*. Stein (2005) también señala la capacidad de estas bacterias en la excreción antibióticos peptídicos al medio extracelular.

El extracto libre de células de la CCEBI 1065 tuvo un menor efecto sobre el crecimiento del hongo en comparación con la cepa crecida, aspecto que desde el punto de vista macroscópico se hizo evidente por la disminución de la zona de inhibición, bajo las mismas condiciones ensayadas (fig. 5a vs **fig. 11a**). Al respecto se ha planteado que los mecanismos empleados por estos competidores naturales *in vitro* incluyen no sólo la antibiosis, sino también otros mecanismos como el parasitismo y la competencia por los nutrientes y espacio; estrategias posibles cuando se cuenta con el microorganismo íntegro, como un todo. De forma general en el efecto de biocontrol pueden estar implicados más de un mecanismo, lo cual hace que en muchos casos sea recomendado el uso de las células más que el del extracto filtrado (Hernández *et al.*, 2007).

Al analizar las hifas al microscópico óptico, se pudieron observar las mismas afectaciones que se manifestaron frente a la colonia bacteriana; sin embargo, la magnitud en cuanto al número de hifas afectadas fue menor (fig. 6a vs **fig. 11c**). También es válido destacar que no se evidenció ruptura de la pared celular, cuestión que pudiera estar relacionado con la formación de compuestos que afectan el crecimiento a nivel de las membranas celulares fúngicas. Stein (2005), plantea que los metabolitos antifúngicos de naturaleza lipoproteica excretados al medio extracelular, tienen la capacidad de interactuar de forma directa sobre los lípidos de la membrana celular, mostrando una fuerte capacidad de autoasociación.

También es válido destacar que las bacterias del género *Bacillus* son productoras de metabolitos antifúngicos volátiles, cuestión que es necesario tomar en cuenta a la hora de proponer cual de las dos variantes resulta más satisfactoria. Este aspecto ha sido reportado por Ferreira *et al.* (1991) quienes clasificaron a *B. subtilis* como un microorganismo altamente antagónico de los fitopatógenos, debido a la continua producción de antibióticos y metabolitos

volátiles antifúngicos. Por otro lado Friddaman y Rossal (1993) también demostraron que existen cepas de *B. subtilis* que forman compuestos volátiles con propiedades fungicidas. Ambos investigadores observaron en su estudio vacuolización y deformación de las hifas de *Rhizotonia solani* y *Pythium ultimum*, como efecto del antagonista, coincidiendo con los observados en esta investigación (ver tabla 2).

IV.5. Pruebas de antagonismo *in vitro* de las fracciones obtenidas a partir del extracto libre de células.

Para continuar arrojando luces sobre el posible o los posibles metabolitos excretados con actividad antifúngica y para proceder a concentrar, en cierta forma, el ELC; se realizó un fraccionamiento del mismo. Como resultado del tratamiento del extracto con la mezcla de cloroformo-metanol (2:1) se obtuvieron dos fracciones, las que fueron sometidas a la prueba de antibiosis en placa utilizando como fitopatógeno al mismo hongo (*C. gudauskasii*). Se considera igualmente la formación del halo de inhibición del crecimiento como prueba positiva de la presencia de metabolitos antifúngicos. Se demostró que sólo la fracción extraída con el cloroformo-metanol (fracción orgánica) poseía actividad en este sentido, ya que se pudo observar una pequeña zona de inhibición al cabo de los tres días de incubación.

Este hecho permitió establecer algunas inferencias acerca de la posible naturaleza del compuesto ya que la literatura reporta que muchos de los metabolitos responsables de la actividad antifúngica, son lipopéptidos con variabilidad en el tamaño y la ramificación de la cadena lateral alifática. Dentro de los metabolitos producidos por *B. subtilis*, que pueden ser citados por presentar esta estructura, se encuentran los lipopéptidos cíclicos de la clase iturina. Otro compuesto lipopeptídico cíclico producido por estas bacterias es la surfactina. (Heins *et al.*, 2007).

La **fig. 12** muestra las condiciones de las hifas de *C. gudauskasii* en cada ensayo. La imagen tomada al microscopio óptico de las hifas del fitopatógeno en contacto con la fracción orgánica del extracto se muestra en la **fig. 12d**. La afectación más evidente fue la distorsión en el crecimiento apical de las hifas, aspecto que se evidenció por la formación de ondulaciones en esta. Al respecto se ha descrito que el modo de acción de estos lipopéptidos cíclicos es debido a la interacción con las membranas fúngicas, creando canales transmembranas que permiten la liberación de iones vitales y por ende, una alteración en el patrón de crecimiento

normal de las hifas (Stein, 2005; Heins *et al.*, 2007). En este caso la magnitud de las afectaciones fue mucho menor que en los ensayos anteriores, aspecto que sugiere que el rendimiento del extracto libre de células para estas condiciones fue disminuyendo a medida que se avanzó en la concentración del producto. La reducción del efecto de inhibición puede deberse a que estos metabolitos presentes o algunos de ellos, pueden ser volátiles como se había hecho alusión o muy lábiles a las temperaturas, por lo que se ve afectado durante la rotoevaporación.

Estas consideraciones han permitido corroborar la hipótesis planteada al inicio de la investigación, pues el efecto inhibidor de las bacterias ensayadas sobre los hongos fitopatógenos se mantuvo en los filtrados libres de células, confirmando que al menos uno de los mecanismos mediante el cual logran esta inhibición es la producción de metabolitos secundarios antifúngicos.

CONCLUSIONES

Por las evidencias expuestas en los resultados de la investigación, llegamos a las siguientes conclusiones:

1. Todas las bacterias aerobias formadoras de endosporas ensayadas lograron inhibir el crecimiento de los fitopatógenos.
2. El análisis de las secuencias del gen ribosomal 16S confirmó que los aislados bacterianos pertenecían al género *Bacillus* (Familia *Bacillaceae*).
3. La cepa CCEBI-1065 obtuvo los mejores resultados en cuanto a la inhibición del crecimiento de los fitopatógenos, alcanzando valores superiores al 65 % en todos los casos.
4. El extracto libre de células de la cepa de *Bacillus* CCEBI-1065, tuvo un menor efecto inhibidor sobre *C. gudauskasii*, que el observado con el cultivo bacteriano bajo las mismas condiciones de experimentación.
5. La actividad antagonista del extracto libre de células se mantuvo sólo en la fracción orgánica, demostrando la existencia de metabolitos secundarios bioactivos con algún componente lipídico en su estructura.

RECOMENDACIONES

- Profundizar en el estudio de cuáles son los metabolitos responsables del efecto inhibidor del crecimiento en los hongos probados.
- Estudiar la naturaleza química de/los metabolitos del extracto y sus mecanismos de acción a nivel molecular sobre el micelio de los hongos fitopatógenos.
- Estudiar las condiciones de fermentación más favorables que permitan una mayor excreción del/los metabolitos al medio extracelular.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Alexander M. Introduction to soil Microbiology. Ed. John Wiley and Sons, New York. 1977, p.467.
- Alfonso F., Guardia E., Rodríguez J. y Alfonso I. Biocontrol de patologías fúngicas en semilla botánica de la caña de azúcar. Centro Agrícola. 1999, v.2, p.5-10.
- Alfonso I., Alfonso F., Rivera M.J. y Villa, P. Perspectivas del biocontrol de hongos en la semilla botánica de la caña de azúcar en Cuba. Fitosanidad. 2006, v. 2, p.125
- Altschul S.F., Madden T.L., Schaffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. y Lipman D.J., Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997, v.25, p.3389-3402.
- Alvarado P. Identificación de cepas patógenas de *Fusarium* Link. causantes de nueva patología en el cultivo de calas de colores bajo condiciones productivas de invernadero en Chile. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Agrónoma. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Chile. 2005, p. 109.
- Alvarado Y. , Cruz M., Portal N., García L., Freire M., Quiala E. y Kosky RG. Estrategia de trabajo para la prevención y el control de la contaminación bacteriana en la micropropagación de la caña de azúcar. Memorias Taller Internacional sobre biotecnología vegetal. BIOVEG 2003. Biotecnología vegetal y agricultura sostenible.CD-ROM. ISBN: 959-16-0169-7
- Bautista-Baños S. El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos. Rev. Iber. Tecnología Postcosecha. 2006, v.8, no.1, p.1-6.
- Beatty, P.H. y Jensen. *Paenibacillus polymyxa* produces fusacidin-type antifungal antibiotics active against *Leptosphaeria maculans*, the causative agent of blackleg disease of canola. Can. J. Microbiol. 2002, v.48, p.159-169.
- Buchman G., Banerjee S. y Hansen J. Structure, expression and evolution of gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. J. Biol. Chem. 1998, v.263, p.16260-16266.
- Carrillo L. Microbiología agrícola. Universidad Nacional de Salta. 2003. ISBN 987-9381-16-5, p.151.

- Castellanos JL, Oliva P, Fresneda JA, Fraga S, Ortiz L. Posibilidades del uso de *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, control biológico de hongos. En: Congreso Científico del INCA (13:2002, nov 12-15, La Habana) Memorias CD-Rom. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2002. ISBN 959-7023-22-9.
- Chinea A. Las enfermedades de la caña de azúcar en cuba durante las últimas 5 décadas: <http://www.inica.minaz.cu/trabajos/40ANIVERSARIO/bio/b06.htm>. (noviembre, 2008).
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C. y Barka E. A. Use of Plant Growth Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects», Applied and Environmental Microbiol. 2005, v.71, no. 9, p.4951-4959.
- De-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. and Bashan, Y. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales. En: Microbiología agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo. (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., and Alarcon, A. Capítulo 8. Editorial Trillas, Mexico City, Mexico. 2007, p. 170-224.
- Deora A., Hashidoko Y., Tofazzal Md. y Tahara S. Antagonistic rhizoplane bacteria induce diverse morphological alterations in Peronosporomycete Hyphae during in vitro interaction. European Journal of Plant Pathology, 2005, v.112, p.311-322.
- Deora A., Hatano E., Tahara S. y Hashidoko Y. Inhibitory effects of furanone metabolites of a rhizobacterium, *Pseudomonas jessenii*, on phytopathogenic *Aphanomyces cochlioides* and *Pythium aphanidermatum*. Plant Pathology, 2009, v.10, p.16.
- Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A. y Smith F. Anal. Chem. 1956, v.28, p.350.
- Espinosa J.J. Caracterización del proceso de crecimiento de *Bacillus subtilis* bajo condiciones anaerobias. Tesis en opción al título de Doctor en Biotecnología. Tomado en <http://pbr322.ibt.unam.mx/~alfredo/JoelEspinosa.pdf>. (Febrero, 2009).
- Estrada G. y López M.O. Nuevo registro de dos especies de *Curvularia* en semillas de arroz (*Oryza sativa* L.). Fitosanidad. 2002, vol. 6, no. 4, p.55-56.

- Fernández-Larrea O. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas, 2001, v.62, p.96-100.
- Ferreira J. H.; F. Mather y A. C. Tomas. Biological control of *Eutipa lata* grapevine by and antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. Phytopathology. 1991, v.81, p. 283-287.
- Fiddaman P, y Rossall S. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. J Appl Bacteriol. 1993, v.74, p.119-26.
- García F. Selectividad de productos fitosanitarios en el control integrado: Herramienta indispensable para la implementación de programas de ICM. 2005.
- Giacaman A.G. Formulación de un biopesticida para combatir pudrición húmeda en cala (*Zantedeschia spp.*) producida por *Erwinia carotovora*. Tesis en opción al título de Licenciado en Bioquímica. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de Valdivia, Chile. 2006, p. 180.
- Goto K., Omura T., Hara Y. y Sadaie Y. Application of the partial 16S rDNA sequence as an index for rapid identification of species in the genus *Bacillus*. J. Gen. Appl. Microbiol, 2000, v.46, p.1-8.
- Guarro J y Castañeda R.F. Curso de Micología: Actualización. Material de apoyo. Universidad de Oriente. 2007, p. 21.
- Hall B., Phylogenetic Trees Made Easy. A How-To Manual for Molecular Biologists. Sinauer Associates, Inc Massachusetts. 2001.
- Harwood, C. Biotechnology Handbooks 2: *Bacillus*. Edo. Plinun Press, New York. 1989, AIA pp.
- Heins D., Carol M., Jiménez R., McCoy J., Orjala E. y Marrone G. Nueva cepa de *Bacillus* destinada a luchar contra las enfermedades de las plantas y del gusano de las raíces del maíz. Patente Europea ES 2 268 774 T3. Oficina Española de Patentes y Marcas. 2007.
- Hernández A.N., Bautista-Baños S., Velázquez M.G. y Hernández A. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. Rev. Mexicana de Fitopatología. 2007, v. 25, no.001, p. 66-74.
- Jiménez R, Gil V, Tbares S y Olalde V. Bacterias promotoras del crecimiento en plantas: agro – biotecnología. Avances y Perspectivas; 2003, v.20, p.395-400.

- Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M, editors. Nucleic acid techniques in bacterial systematic. Chichester: John Wiley & Sons; 1991, p.115-175.
- Lavermicocca P., Valerio F. y Visconti A. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Appl. Environ. Microbiol. 2007, v.69, p. 634-640.
- Lavermicocca, P., F. Valerio, A. Evidente, S. Lazzaroni, A. Corsetti, y M. Gobbetti. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. Appl. Environ. Microbiol. 2000, v.66, p.4084-4090.
- Lavermicocca, P., F. Valerio, y A. Visconti. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Appl. Environ. Microbiol. 2003, v.69, p. 634-640.
- Lehninger A. Bioquímica. Editorial Pueblo y Educación, Ciudad de La Habana. 1982, p. 239-301.
- Liu X, Zhao H, Chen S. Colonization of mice and rice plants by *Bacillus megaterium* C4. Current Microbiology; 2006, v. 52, p.186 -190.
- Liu, M., Q.X. Cai, H.Z. Liu, B.H. Zhang, J.P. Yan y Z.M. Yuan. Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergist effects on larvicida activity. Journal of Applied Microbiology. 2002, v. 93, p.374-379.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J, Farr A. y Randall R.J. Protein measurement with foling-phenol reagent. Journal of Biology and Chemistry. 1951, v.193, p. 265-275.
- Matiru, V.N. y Dakora, F. Potential use of rhizobial bacteria as promoters of plant growth for increased yield in landraces of African cereal crops. African J. Biotech. 2004, v. 3, p.1-7.
- Mc Spadden B. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. Phytopathology. 2004, v.94, no.11, p.1252-1258.
- Mena, J.J. Taxonomía del complejo *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* y *Exserohilum* en Cuba. Resumen de tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. 2004.

- Mena, J.J. y Fernández L. Nuevos registros del género *Curvularia* para la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrida) en Cuba. Revista Iberoamericana de Micología 1993. no.10, p. 2-4.
- Mendoza N.B. y Robles-Castillo H.M. Utilización de la "sanguaza" para la producción de bioinsecticida de *Bacillus thuringiensis*. Revista de la Sociedad Peruana de Gestión Ambiental, 2000, no.2.
- Mirleau, P., S. Delorme, L. Philippot, J.-M. Meyer, S. Mazurier, y P. Lemanceau. Fitness in soil land rhizosphere of *Pseudomonas fluorescens* C7R12 compared with a C7R12 mutant affected in pyoverdine synthesis and uptake. FEMS Microbiol. Ecol. 2000, v.34, p.35-44.
- Muhammad S. y Amusa N.A. In-vitro inhibition of growth of some seedling blight inducing pathogens by compost-inhabiting microbes. African Journal of Biotechnology. 2003, v. 2, no.6, p.161–164.
- Orberá T., Serrat M. y Gonzalez Z. Potencialidades de bacterias aerobias formadoras de endosporas para el biocontrol en plantas ornamentales. Fitosanidad. junio 2009, v. 13, no. 2.
- Oscáriz J. C. y Pisabarro, A. G. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. Int. Microbiol. 2001, v.4, p.13–19.
- Pereira RC. y Said S. Alterations in growth and branching of *Neurospora crassa* caused by sub-inhibitory concentrations of antifungal agents. Revista Argentina de Microbiología, 2009, v.41, no.1.
- Pérez M. Aislamiento y caracterización de nuevos genes de patogenicidad en *Fusarium oxysporum* con función desconocida mediante mutagénesis por inserción. Resumen de tesis. 2002.
- Pérez M.C., Cardoza H. y Socorro M. Las investigaciones agropecuarias en Cuba cien años después. Capítulo 3. Editorial Científico-Técnica. 2006, p.58-104.
- Piñero J., Vidal L. y Coello N. Aislamiento y caracterización de una cepa de *Bacillus* spp. degradadora de plumas de aves de corral. Revista Científica. 2009, v. X, no.002.
- Prapagdee B., Akrapikulchart U. y Mongkolsuk. Potential of a Soil-Borne *Streptomyces hygroscopicus* for Biocontrol of Anthracnose Disease Caused by *Colletotrichum*

- gloeosporioides* en Orchid. Journal of Biological Sciences, 2008, v. 8, no.7, p.1187-1192.
- Razo M.R., Barboza J.E., Salcedo R., Vázquez M. y Basurto M.G.L. Producción de proteasas y bacteriocinas por la cepa mexicana *Bacillus subtilis* No. 21 contra hongos y bacterias patógenas en alimentos. <http://www.respyn.uanl.mx/especiales/2008/ee-08-2008/documentos/A025.pdf>. (noviembre, 2008).
 - Reinoso Y., Vaillant D., Casadesús L., García E.A. y Pazos V. Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. Fitosanidad. 2007, v.11, no.1, p. 35-40.
 - Rodas B.A., Quero M., Magaña H.F. y Reyes A. Selección de cepas nativas con actividad Quitino-Proteolítica de *Bacillus* sp. aisladas de suelos tropicales. Rev. Colomb. Biotecnol. 2009, v. XI, no. 1, p. 97-103.
 - Rojas C. y Vargas P. Bacteriocinas: sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. Tecnología en Marcha, 2008, v. 21-2, Abril-Junio, p. 9-16.
 - Rooney A.P, Precio N.P, Erhardt C., Swezey JL, Bannan J.D. Phylogeny and Molecular Taxonomy of the *Bacillus subtilis* species Complex and the Description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2009, v. 59, no.10, p. 2429-2436.
 - Ros C., González N., Arévalo R. y Puertas A. Utilización de cepas bacterianas para el control *Phytophthora nicotianae* Breda de Haan en el cultivo del tabaco (*Nicotiana tabacum* L.). Revista Electrónica Granma Ciencia. 2008, v.12, no.3.
 - Saadoun I., Malkawi F.H.I. y Mohammad M. J. Isolation, identification and análisis of antibacterial activity of soil *Streptomyces* isolates from north Jordan. Microbios 1999, v.100, p. 41-46.
 - Sambrook J, Fritsch E.F y Maniatis T. 1987. Molecular cloning a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 - Shida O., Takagi H., Kadowaki K., Nakamura L.K. y Komagata K. Transfer of *Bacillus alginolyticus*, *Bacillus chondroitinus*, *Bacillus curdlanolyticus*, *Bacillus glucanolyticus*, *Bacillus kobensis*, and *Bacillus thiaminolyticus* to the Genus *Paenibacillus* and Emended Description of the Genus *Paenibacillus*. International Journal of Systematic Bacteriology, 1997, v. 47, no. 2, p. 289-298.

- Siqueira JF. Jr. y Rocas IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent*, 2003, v.31, p.333-339.
- Sosa A. (et al.,). Nuevos aislados de *Bacillus* spp. Antagonistas a *Sclerotium rolfsi*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium aphanidermatum*. *Fitosanidad*, 2006, v.10, no.1, p.12-17.
- Spratt D.A. Significance of bacterial identification by molecular biology methods. *Endodontic Topics*. 2004, v. 9, p. 5–14
- Sprot GD, Koval SF, Shnaitman CA. Cell Fractionation. In: Gerhardt Ph, Murray RGE, Wood WA, Krieg NR, editors. *Methods for General and Molecular Bacteriology*. 1994.
- Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 2005, v. 56, no.4, p.845-857.
- Suárez R. y Morín R. Caña de azúcar y sostenibilidad: Enfoques y experiencias cubanas. [http://www.desal.org.mx/IMG/pdf/MORIN---Cana de azucar.pdf](http://www.desal.org.mx/IMG/pdf/MORIN---Cana_de_azucar.pdf) (noviembre, 2008)
- Tagg J.R., Dajani A.S.S. y Wannamaker L.W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bact. Rev.* 2005, v.40, p.722-756.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. y Kumar S., MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 2007. v. 24, p. 1596-1599.
- Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. y Higgins D.G. The CLUSTALX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 1997, p. 4876-4882.
- Trujillo A., Hernández A. y Heydrich M. Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y el maíz. *Rev. Protección Veg.* 2007, v. 22, no. 1, p.41-46.
- Viera F.J. Efectos del análogo de brasinoesteroide (BIOBRAS-16), bajo las condiciones de Banco de Semilla de caña de azúcar. Editorial Universitaria. 2006, p. 48.
- Vignolo GM, Suriani F, Aída P. De Ruíz Holgado & Oliver G. Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *J. Appl. Bacteriol.* 1993, v.75, p.344-349.
- Yeates C., Gillings MR., Davinson AD., Altavilla N. y Veal DA. Methods for microbial DNA extraction for from soil for PCR amplification. *Biol Proc Online*. 1998, v.1, p.40-7.

OTROS SITIOS VISITADOS

- <http://mesa-5-3lm.blogspot.com/2009/11/medios-de-cultivo-para-el-crecimiento.html>.
(Enero 25, 2010)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez>. (Enero 25, 2010)
- http://espanol.bio-cat.com/products.php?sortby=application&application_id=11.
(Enero 29, 2010)
- <http://www.bacterio.cict.fr/p/paenibacillus.html> (Febrero 4, 2010)
- <http://www.santiago.cu/hosting/etica/UASCTE/sefit.htm>. (Febrero 4, 2010)

Tabla 1. Antagonismo *in vitro* de las bacterias aerobias formadoras de endosporas sobre los hongos fitopatógenos de caña de azúcar.

Hongos fitopatógenos	<i>Curvularia gudauskasii</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>		<i>Fusarium solani</i>	
	Z.I.C	E.I.P	Z.I.C	E.I.P	Z.I.C	E.I.P
Bacterias antagonistas						
CCEBI-1063	+	-	+	-	±	-
CCEBI-1064	+	-	++	-	+	-
CCEBI-1065	+	*	++	*	++	*
CCEBI-1066	+	-	+	-	+	-
CCEBI-1067	++	-	+	-	+	-

Los valores de la zona de inhibición del crecimiento (Z.I.C) y del efecto durante la incubación prolongada (E.I.P) se simbolizan a continuación:

- ++ : Inhibición alta (≥ 10 mm)
- + : Inhibición media (6-9 mm)
- ± : Inhibición baja (≤ 5 mm)
- : desaparición de la zona de inhibición pasado 8 días de incubación
- * : permanencia de la zona de inhibición pasado 8 días de incubación

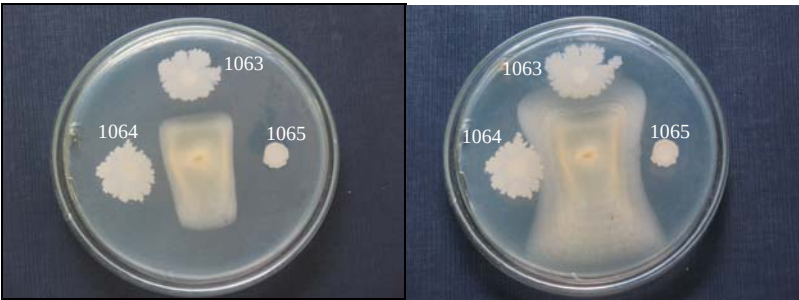


Figura 1. Evolución del crecimiento radial de *Fusarium solani* frente a las BAFE. Inhibición del Crecimiento Radial de *Fusarium solani* a los 8 días de incubación (A) y a los 14 días (B).

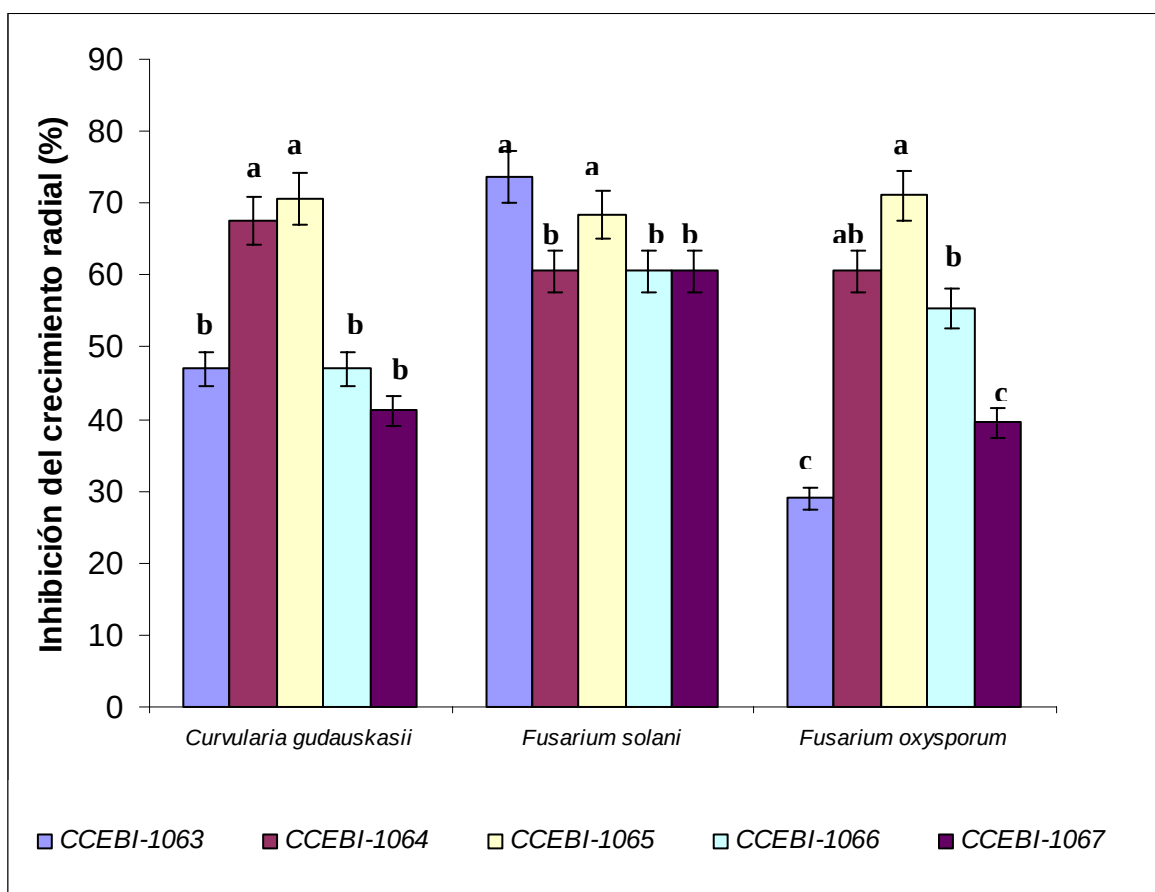


Figura 2. Inhibición del Crecimiento Radial de los hongos fitopatógenos frente a las bacterias aerobias formadoras de endosporas (BAFE). Se evaluó el % de inhibición a los 8 días de incubación. Letras diferentes en el mismo grupo indican existencia de diferencias significativas para ($p \leq 0,05$).

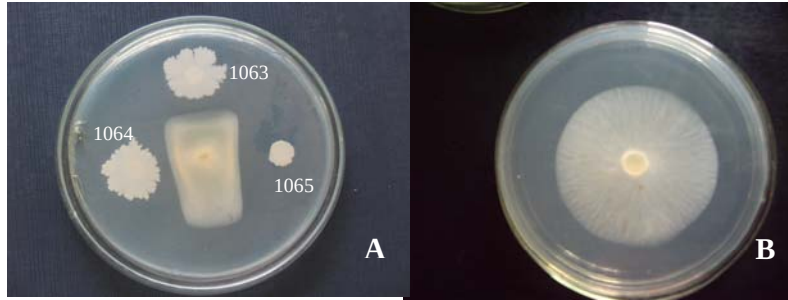


Figura 3. Actividad antagonista *in vitro* las cepas CCEBI-1063, CCEBI-1064 y CCEBI-1065 frente a *Fusarium solani* (A) y la colonia control (B) a los 8 días de incubación.

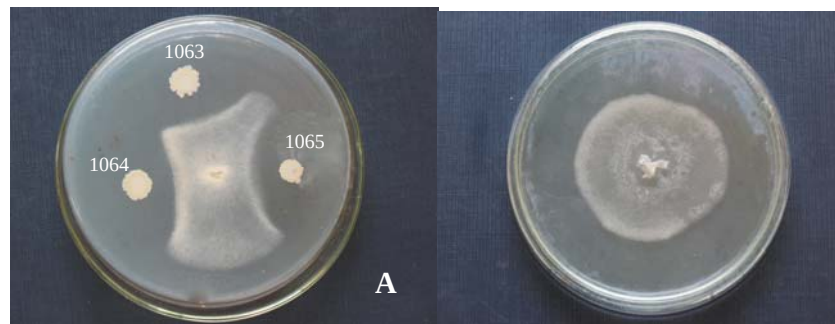


Figura 4. Actividad antagonista *in vitro* de las cepas CCEBI-1063, CCEBI-1064 y CCEBI-1065 frente a *Fusarium oxysporum* (A) y la colonia testigo (B) a los 8 días de incubación.

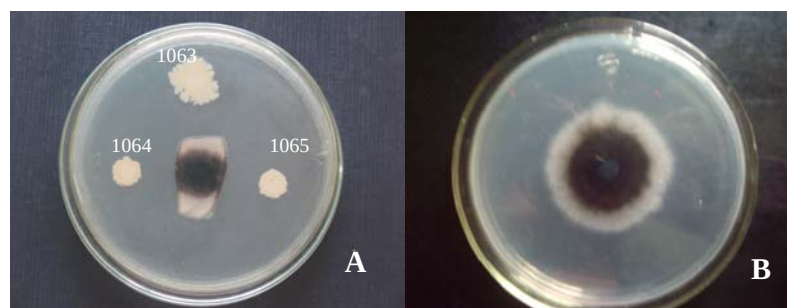


Figura 5. Actividad antagonista *in vitro* de las cepas CCEBI-1063, CCEBI-1064 y CCEBI-1065 frente a *Curvularia gudauskasii* (A) y la colonia testigo (B) a los 8 días de incubación.

Tabla 2. Variaciones morfológicas en las hifas de los hongos fitopatógenos de caña de azúcar ubicadas en la zona de contacto con las BAFE (120 hrs).

Características*	Curvularia gudauskasii	Fusarium oxysporum	Fusarium solani
Vacuolización intensa	+	-	-
Hinchazón de la hifa	+	-	+
Modificación del patrón de crecimiento apical [ondulaciones]	+	-	-
Extremo en forma de balón	-	-	-
Formación de bulbos	-	+	+
Disminución del diámetro de la hifa	-	-	-
Disminución de los espacios intercelulares [empaquetamiento]	+	-	-
Afectación en la formación de conidios	+	-	-
Pérdida de la pigmentación en las hifas vegetativas	-	-	-

* Los tipos de malformaciones relacionadas fueron tomadas de: Deora et al., 2005; Deora et al., 2009; Pereira y Said, 2009; Prapagdee et al., 2008)

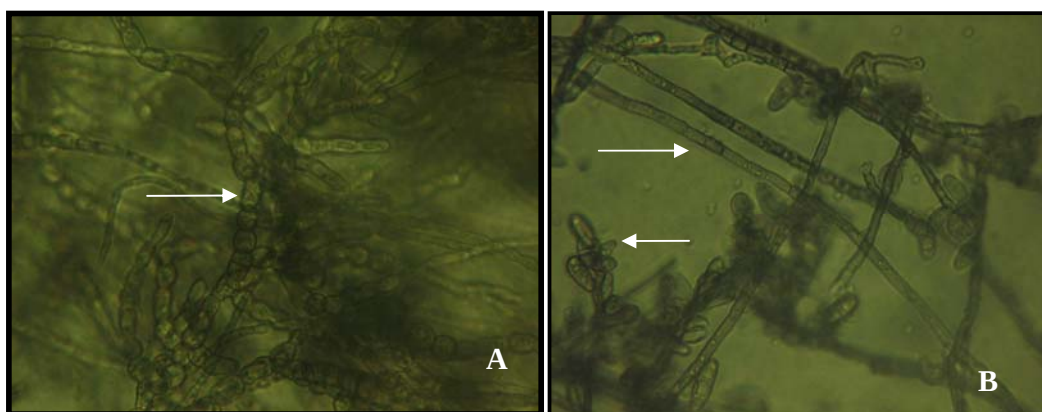


Figura 6. Imágenes de las malformaciones producidas el en micelio del hongo *Curvularia gudauskasii* producto a la interacción con la bacteria antagonista CCEBI-1065 (A). Hifas de la colonia testigo (B). Vista de 2560x

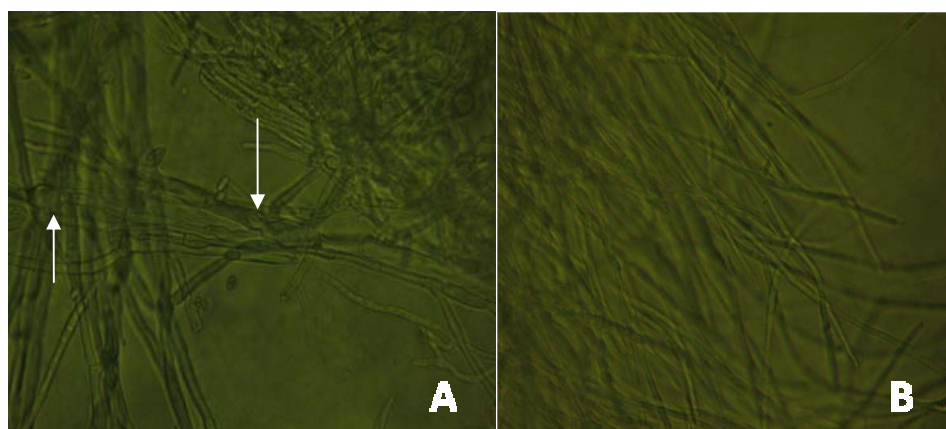


Figura 7. Imágenes de las malformaciones producidas el en micelio del hongo *Fusarium solani* producto a la interacción con la bacteria antagonista CCEBI-1065 (A). Hifas de la colonia testigo (B). Vista de 2560x

Tabla 3. Relación de especies de las bases de datos de la NCBI con secuencias del ADNr 16S similares a las obtenidas en las cepas antagonistas estudiadas.

AISLADO	Cepas del BLAST	No. de acceso	% de máx. identidad	RDP II	No. de acceso	Score
CCEBI-1063	Bacillus subtilis	DQ219358	96	Bacillus subtilis subsp. subtilis	AJ276351	0.897
CCEBI-1064	Bacillus subtilis	EU016526	99	Bacillus subtilis subsp. spizizenii	AF074970	0.922
CCEBI-1065	Bacillus subtilis	EU982514	98	Bacillus subtilis subsp. subtilis	AJ276351	0.896
CCEBI-1066	Bacillus subtilis	EU221336	96	Bacillus subtilis subsp. subtilis	AJ276351	0.916
CCEBI-1067	Bacillus subtilis	EU221336	95	Bacillus subtilis subsp. subtilis	AJ276351	0.880

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)/ **RDP II** (Ribosomal Database Project)

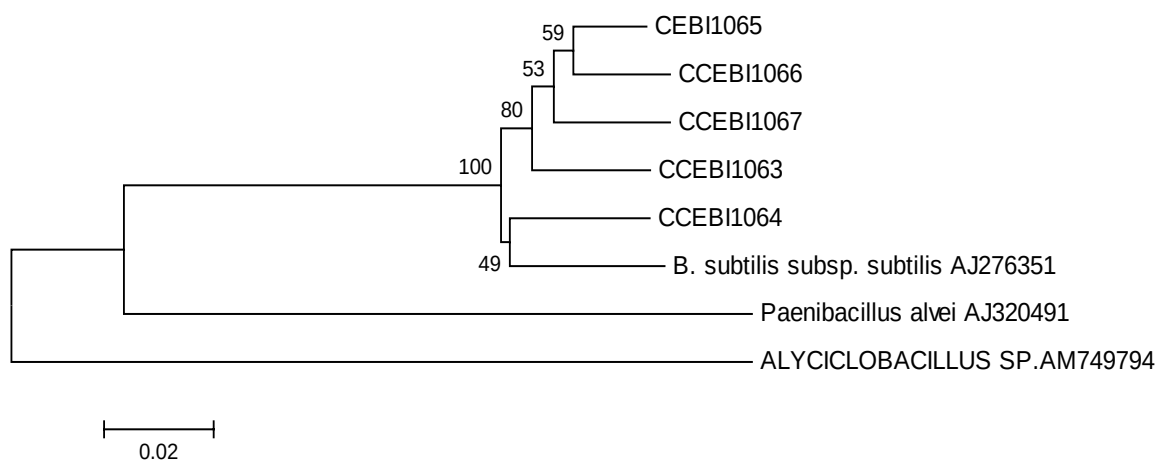


Figura 8. Árbol filogenético de distancia entre las secuencias parciales del gen ribosomal 16S de las cepas antagonistas.

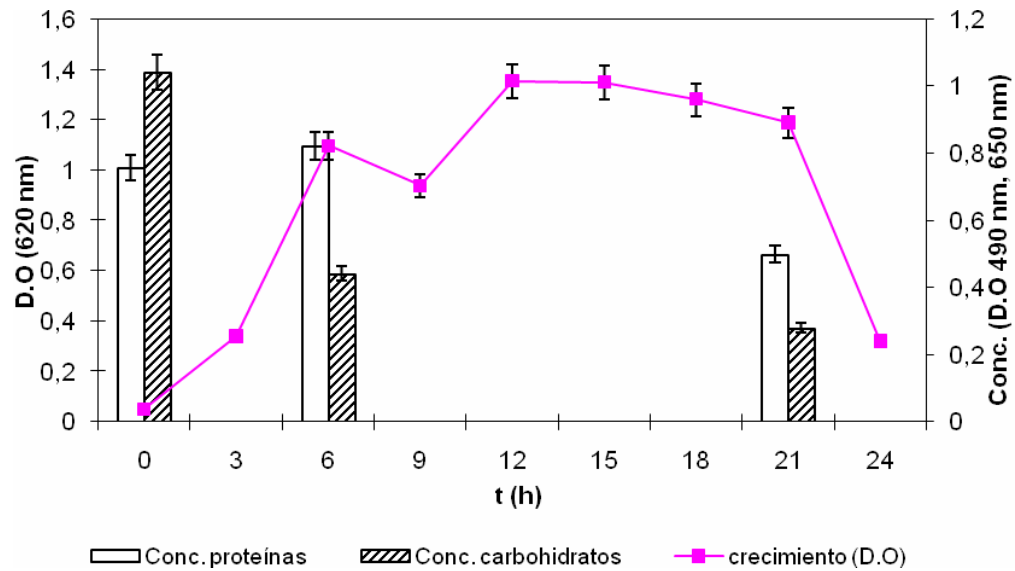


Figura 9. Crecimiento de la cepa CCEBI-1065 en Caldo Nutriente. Evolución de los principales nutrientes (proteínas y carbohidratos) del medio de cultivo durante el crecimiento.



Figura 10. Ensayo cualitativo del extracto libre de células de la cepa CCEBI-1065 con Sudan III.

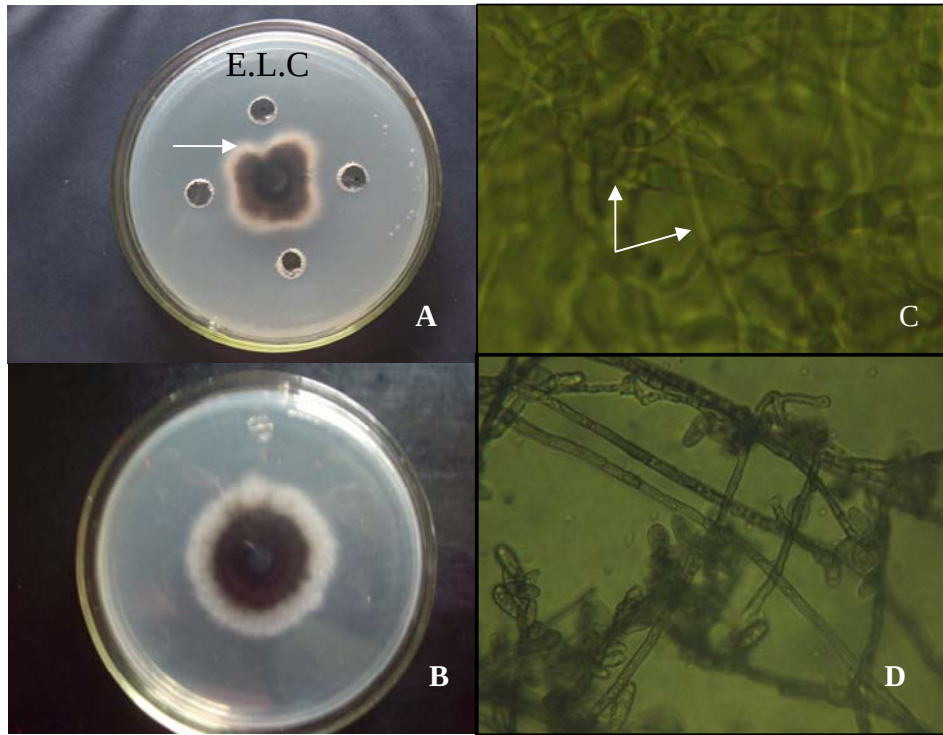


Figura 11. Imágenes de la colonia del hongo *Curvularia gudauskasii* frente al extracto libre de células de la cepa CCEBI-1065 (A) y la colonia testigo (B). Vista microscópica de las hifas de la zona afectada (C) y las hifas normales (D). *Aumento 2560x.*

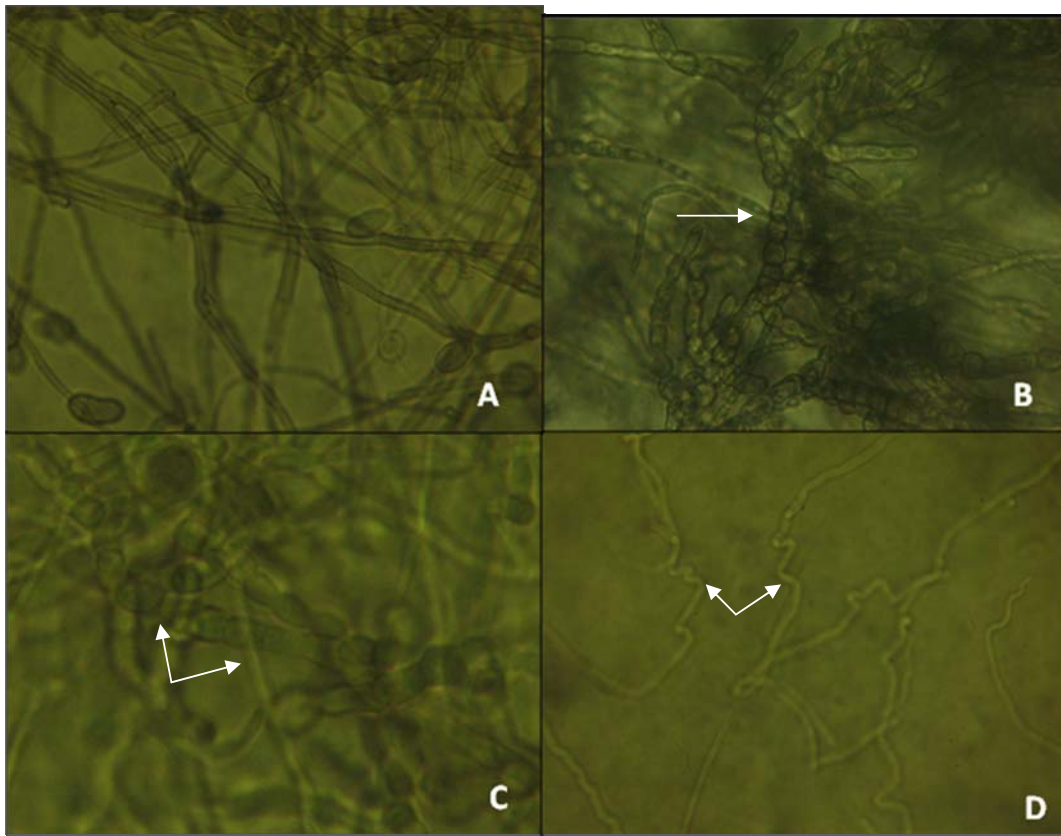


Figura 12. Imágenes de las hifas de *Curvularia gudauskasii* *in vitro* bajo diferentes condiciones de ensayo. (A), colonia testigo del hongo; (B), hifas del mismo frente a la cepa CCEBI-1065; (C), bajo el efecto del extracto libre de células; (D) acción de la fracción orgánica del extracto.

ANEXO # 1

Resultados estadísticos de la prueba de antagonismos *in vitro* de las BAFE vs *Fusarium solani*.

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	293,74	4	73,435	8,81	0,0173
Intra grupos	41,6597	5	8,33195		
Total (Corr.)	335,4	9			

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_2 (CCEBI-1064)	2	60,525	X
Col_5 (CCEBI-1067)	2	60,525	X
Col_4 (CCEBI-1066)	2	60,525	X
Col_3 (CCEBI-1065)	2	68,41	X
Col_1 (CCEBI-1063)	2	73,69	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*13,165	7,42004
Col_1 - Col_3	5,28	7,42004
Col_1 - Col_4	*13,165	7,42004
Col_1 - Col_5	*13,165	7,42004
Col_2 - Col_3	*-7,885	7,42004
Col_2 - Col_4	0,0	7,42004
Col_2 - Col_5	0,0	7,42004
Col_3 - Col_4	*7,885	7,42004
Col_3 - Col_5	*7,885	7,42004
Col_4 - Col_5	0,0	7,42004

* indica una diferencia significativa.

ANEXO # 2

Resultados estadísticos de la prueba de antagonismos *in vitro* de las BAFE vs *Fusarium oxysporum*.

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	2259,78	4	564,945	15,69	0,0049
Intra grupos	180,05	5	36,01		
Total (Corr.)	2439,83	9			

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_1 (CCEBI-1063)	2	28,95	X
Col_5 (CCEBI-1067)	2	39,475	X
Col_4 (CCEBI-1066)	2	55,26	X
Col_2 (CCEBI-1064)	2	60,525	XX
Col_3 (CCEBI-1065)	2	71,05	X
Contraste	Diferencias	+/- Límites	
Col_1 - Col_2	*-31,575	15,4257	
Col_1 - Col_3	*-42,1	15,4257	
Col_1 - Col_4	*-26,31	15,4257	
Col_1 - Col_5	-10,525	15,4257	
Col_2 - Col_3	-10,525	15,4257	
Col_2 - Col_4	5,265	15,4257	
Col_2 - Col_5	*21,05	15,4257	
Col_3 - Col_4	*15,79	15,4257	
Col_3 - Col_5	*31,575	15,4257	
Col_4 - Col_5	*15,785	15,4257	

* indica una diferencia significativa.

ANEXO # 3

Resultados estadísticos de la prueba de antagonismos in vitro de las BAFE vs *Curvularia gudauskasii*.

Análisis de la Varianza

Fuente	Sumas de cuad.	Gl	Cuadrado Medio	Cociente-F	P-Valor
Entre grupos	1439,22	4	359,806	11,56	0,0097
Intra grupos	155,585	5	31,117		
Total (Corr.)	1594,81	9			

Contraste Múltiple de Rango

Método: 95,0 porcentaje LSD

	Frec.	Media	Grupos homogéneos
Col_5 (CCEBI-1067)	2	41,19	X
Col_1 (CCEBI-1063)	2	47,06	X
Col_4 (CCEBI-1066)	2	47,06	X
Col_2 (CCEBI-1064)	2	67,65	X
Col_3 (CCEBI-1065)	2	70,595	X

Contraste	Diferencias	+/- Límites
Col_1 - Col_2	*-20,59	14,3394
Col_1 - Col_3	*-23,535	14,3394
Col_1 - Col_4	0,0	14,3394
Col_1 - Col_5	5,87	14,3394
Col_2 - Col_3	-2,945	14,3394
Col_2 - Col_4	*20,59	14,3394
Col_2 - Col_5	*26,46	14,3394
Col_3 - Col_4	*23,535	14,3394
Col_3 - Col_5	*29,405	14,3394
Col_4 - Col_5	5,87	14,3394

* indica una diferencia significativa.

ANEXO # 4

Principales características morfológicas y fisiológicas de los aislados de BAFE con actividad inhibitoria *in vitro* de hongos fitopatógenos.

Características		SR/A-1	SR/B-8	SR/B-16	SR/B-17	SR/A-17
Morfología de las células	Morfología	B	B	B	B	B
	Gram	+	+	v	+	+
Endosporas	Forma	O	O	O	O	O
	Posición	C	C	C	T	T
	Tipo de esporangio	D	ND	ND	D	D
Bioquímica	Motilidad	+	+	+	+	+
	Crecimiento en anaerobiosis	AE	AE	MA	AE	MA
	Indol	-	-	-	-	-
	Crecimiento en 10% NaCl	-	-	-	-	-
	Crecimiento a T > 55°C	-	-	-	-	-
Fermentación de azúcares		G	+	+	+	+
		S	-	-	-	-
		L	-	-	-	-
		Gas	-	-	-	-
		H ₂ S	-	-	-	-
Producción de enzimas	Oxidasa	-	-	-	-	-
	Catalasa	+	+	+	+	+
	Nitrato reductasa	+	+	+	+	+
	Nitrogenasa	-	-	-	-	-
	Ureasa	+	+	+	+	+

B: Bacilos, O: Ovoides, C: Central, D: Deformado, ND: No deformado, AE: Aerobio estricto, MA: Microaerófilo, v: Variable, T: Terminal, G: Glucosa, S: Sacarosa, L: Lactosa

Nota: Los aislados de BAFE están simbolizados con el código propuesto por Orberá et al. 2009. El código actual, con el que están depositados en la colección de cultivo del CEBI, se expone a continuación:

- SR/A-1 (CCEBI-1063)
- SR/B-8 (CCEBI-1064)
- SR/B-16 (CCEBI-1065)
- SR/B-17 (CCEBI-1066)
- SR/A-17 (CCEBI-1067)

ANEXO # 5

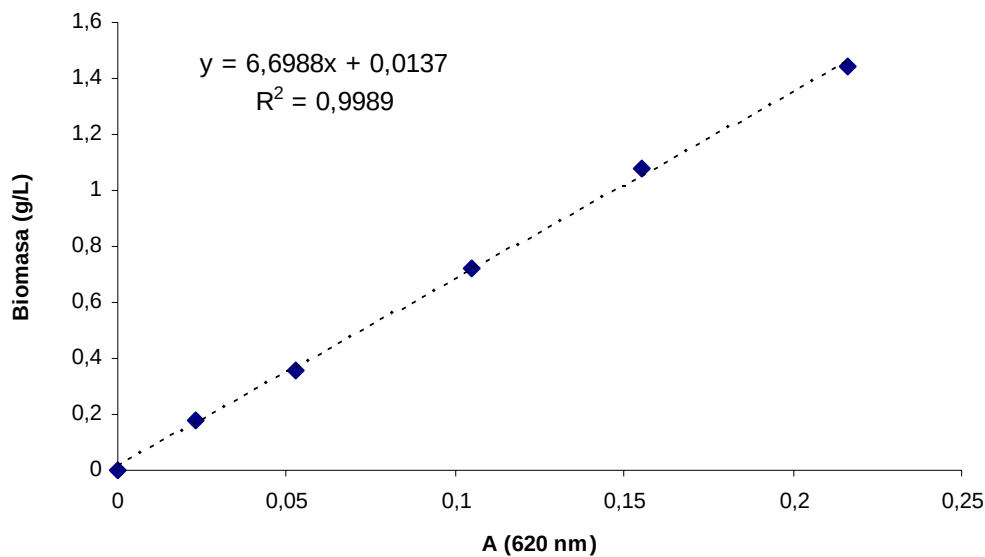
Determinación de la biomasa por el método de peso seco.

- Tomar una alícuota del cultivo (10 mL)
- Centrifugar a 6000 rpm durante 15 min.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de agua destilada estéril.
- Centrifugar a 6000 rpm durante 15 min.
- Resuspender pellet en 1 mL de agua destilada estéril y depositar en un recipiente previamente tarado (crisol).
- Secar en estufa a 105°C hasta peso constante

Calcular el peso de la muestra mediante la fórmula:

$$\text{Peso de muestra (g/L)} = \frac{(\text{Peso total} - \text{Peso de crisol})}{\text{Volumen de muestra}}$$

Relación entre D.O y peso seco, en la determinación de la biomasa.



Para analizar la relación existente entre la D.O y el peso seco, en la determinación de la biomasa, se realizó un análisis de correlación producto-momento y de regresión, empleando el coeficiente de correlación de Pearson.

$r = 0.97$, $p = 0,006$