



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO  
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

**ITM**

**TESIS:**

**Análisis e identificación de bacterias ácido lácticas con capacidad antagonica sobre microorganismos fitopatógenos.**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:**

Maestro En Ciencias De Los Alimentos Y Biotecnología

**PRESENTA:**

I.I.A Denisse Iliana Domínguez García.

**ASESOR:**

Dra. Sara Elena Solís Pereira

**CO-ASESOR:**

Dr. Gabriel Lizama Uc

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

28 de Junio 2019.





**SEP**  
SECRETARÍA DE  
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Mérida

"2019, Año del Caudillo del Sur, Emiliano Zapata"

**DEPENDENCIA:** DIV. DE EST. DE POSG. E INV.  
**No. DE OFICIO:** X-332/19

**ASUNTO:** AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Mérida, Yucatán, 27/junio/2019

**C. DOMÍNGUEZ GARCÍA DENISSE ILIANA**  
Pasante de la Maestría en Ciencias de los  
Alimentos y Biotecnología  
**PRESENTE**

De acuerdo al fallo emitido por su directora la **Dra. Sara Elena Solís Pereira**, y el co-director **Dr. Gabriel Lizama Uc**, y la comisión revisora integrada por el Dr. Enrique Sauri Duch, y la Dra. Susana Rincón Arriaga, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

**"ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CON CAPACIDAD ANTAGÓNICA SOBRE MICROORGANISMOS FITOPATÓGENOS."**

**ATENTAMENTE**  
*Excelencia en Educación Tecnológica*

**M.C. DANIEL ARCÁNGEL LÓPEZ SAURI**  
**JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE**  
**POSGRADO E INVESTIGACIÓN**



**S.E.P.**  
**INSTITUTO TECNOLÓGICO**  
**DE MERIDA**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE**  
**POSGRADO E INVESTIGACION**

C.p. Archivo  
DALS/fja



## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por el don de la vida, la salud y darme fortaleza para lograr subir este escalon en mi vida profesional.

A mis padres por ser el faro que ilumina mi vida, para que en esos días tormentosos pudiera seguir el camino correcto; gracias por recordarme esas metas que me propuse cuando era niña, gracias por hacer que nunca se me olvidaran; gracias por su apoyo y amor incondicional. Los amo les debo todo lo que soy.

A mis hermanos gracia por todo su apoyo y cariño.

A mis hijos Valeria, Camila y Alejandro, a ustedes les dedico este logro, gracias por su paciencia y comprensión durante este proceso. Ustedes mi motor, los amores de mi vida, ver sus caritas me dio fortaleza para no rendirme.

A mis asesores el Dr. Lizama y la Dra. Sara Solis gracias por su paciencia y dedicación, en ustedes encontré mas que un guía académica; gracias Dra. Sara por brindarme su amistad y preocuparse por mi como persona mas que como estudiante. La quiero, admiro y respeto.

A mis compañeros de los diferentes laboratorios de posgrado Henry, Lupita, Alejandrina, Melissa, Gabo, con quienes pase tarde maravillosas y hasta cultivamos una amistad increíble. A la M.C. Silvia más que una compañera, en ella encontré una confidente, alguien que se preocupo por mi, tanto académicamente como personalmente, gracias por sus consejos.

A mi siempre amiga Socorro por alegrar mis días, porque no planeamos estar aquí juntas y la vida se encargo de unirnos de nuevo, porque a pesar de la distancia seguimos apoyándonos. A Victoria por inyectarme esa vitalidad que solo tú tienes, y en el poco tiempo que te conozco, pareciera que es de toda la vida. Me divertí muchísimo con ustedes dos. A mi gran amigo Geovanny gracias por ser parte de mis ocurrencias, regalarme parte de tu paz y tranquilidad. Los quiero.

Al Laboratorio de Instrumentación Analítica dirigido por el Dr. Enrique Sauri por prestarme sus instalaciones y al M.C. Abraham Can Cauich por el apoyo para la realización de mis análisis.

Al Dr. Daniel Arcagel por su gran apoyo en mis tramites de titulación.

A la Dra. Elizabeth por apoyarme en entrar al postgrado y que me otorgaran la beca Conacyt.

Al CONACYT por la beca brindada 380351.

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Antagonismo .....	3
<b>2.1.1 Tipos de antagonismo .....</b>	<b>4</b>
2.2 Compuestos con actividad antagónica y mecanismos de acción.....	7
<b>2.2.1 Ácidos orgánicos.....</b>	<b>7</b>
<b>2.2.2 Metabolitos del oxígeno .....</b>	<b>8</b>
<b>2.2.3 Bacteriocinas .....</b>	<b>9</b>
<b>2.2.4 Compuestos volátiles .....</b>	<b>12</b>
<b>2.2.5 Enzimas .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2.6 Antibióticos .....</b>	<b>14</b>
2.3 Microorganismos fitopatógenos. ....	15
<b>2.3.1 <i>Fusarium equiseti</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3.2 <i>Fusarium solani</i> .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.3 <i>Curvularia sp.</i>.....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.4 <i>Phytophthora capsici</i>.....</b>	<b>19</b>
2.4 Consorcio de Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) .....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo General .....	23
4.2 Objetivos Específicos.....	23

5. METODOLOGÍA.....	24
<b>5.1 Microorganismo.....</b>	24
<b>5.2 Propagación de la cepa. ....</b>	24
<b>5.3 Evaluación antagónica.....</b>	24
<b>5.4 Identificación molecular de bacterias con actividad antagónica. ....</b>	26
<b>5.5 Evaluación de compuestos volátiles sobre la inhibición de fitopatógenos. ....</b>	29
<b>5.6 Curvas de crecimiento de las cepas antagónicas ....</b>	31
<b>5.7. Ensayo de actividad proteolítica.....</b>	32
<b>5.8 Ensayo de actividad proteolítica en gel SDS-PAGE gelatina desnaturalizante.....</b>	32
<b>5.9 Determinar la capacidad antifúngica de los sobrenadantes parcialmente purificados.....</b>	35
<b>5.10 Evaluación <i>in planta</i> el antagonismo de las bacterias.....</b>	36
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
<b>6.1 Evaluación antagónica.....</b>	37
<b>6.2 Medición del pH. ....</b>	40
<b>6.3 Secuenciación e identificación de microorganismos aislados del consorcio microbiano.....</b>	41
<b>6.5 Establecimiento de la cinética de crecimiento de las cepas de estudio. ....</b>	48
<b>6.6 Ensayo de actividad proteolítica.....</b>	50
<b>6.7 Evaluación del extracto crudo y fraccionado.....</b>	52
<b>6.8 Evaluación Antagónica <i>in planta</i>. ....</b>	54
7. CONCLUSIÓN.....	57

8. REFERENCIAS .....	58
----------------------	----

## RESUMEN.

Bacterias aisladas de consorcios para la producción de alimento tipo Kéfir, pertenecientes al género *Bacillus* y *Lactobacillus*, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos fitopatógenos: *Fusarium solani*, *Curvularia sp.*, *Fusarium equiseti*, *Phytophthora capsici*. *Lactobacillus jensenii*, *Bacillus amiloquefacies* y *Bacillus endofiticus* frente a *Fusarium equiseti*, obtuvieron los mayores porcentajes de inhibición radial a los 6 días de incubación entre el 62% y 83%. Algunas tuvieron un efecto fungistático, mientras que otras, mostraron un efecto fungicida. Su acción posiblemente fue debido a los diferentes metabolitos que se secretaron las bacterias y fueron identificados como los ácidos orgánicos volátiles, enzimas proteolíticas o su capacidad para competir por el espacio donde habita y los nutrientes disponibles. *Bacillus endofiticus* inhibió el 60% del crecimiento de *Fusarium equiseti* por acción de compuestos volátiles. Las fracciones mayores a 10 kD de *Bacillus methylotopicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* y *Lactobacillus jensenii* ejercieron un efecto negativo en el crecimiento de los fitopatógenos inhibiendo su crecimiento entre 25% y 75%. En un ensayo in planta se determina que no causa un efecto nocivo sobre plantas de *Capsicum chinense*; las plantas tratadas con cultivos bacterianos y el extracto concentrado mayor a 10 kD ejercen un efecto protector contra la infección por *P. capsici*.

## ABSTRACT

Bacteria isolated from consortiums for the production of Kefir-type food, belonging to the genus *Bacillus* and *Lactobacillus*, have the ability to inhibit the growth of phytopathogenic microorganisms: *Fusarium solani*, *Curvularia* sp., *Fusarium equiseti*, *Phytophthora capsici*. *Lactobacillus jensenii*, *Bacillus amiloquefacies* and *Bacillus endofiticos* against *Fusarium equiseti*, obtained the highest percentages of radial inhibition at 6 days of incubation between 62% and 83%. Some had a fungistatic effect, while others showed a fungicidal effect. Its action was possibly due to different metabolites that secreted bacteria and were identified as volatile organic acids, proteolytic enzymes or their ability to compete for the space where they live and the available nutrients. *Bacillus endofiticos* inhibited 60% growth of *Fusarium equiseti* by volatile compounds. The fractions greater than 10 kD of *Bacillus methylotopicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* and *Lactobacillus jensenii* exerted a negative effect on the growth of phytopathogens, inhibiting their growth between 25% and 75%. In an in-plant trial it is determined that it does not cause a harmful effect on *Capsicum chinense* plants; plants treated with bacterial cultures and concentrated extract greater than 10 kD exert a protective effect against *P. capsici* infection.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los fitopatógenos son el grupo más importante desde el punto de vista económico en cuanto a su frecuencia de aparición y el daño que puede causar, por ello se considera uno de los principales problemas en el sector agrícola. Debido al gran número de especies, su capacidad de reproducción y capacidad de infectar cualquier parte de la planta, disminuyen la producción de la planta hasta la pérdida total del fruto, trayendo como consecuencias grandes pérdidas económicas, así como aumento en los costos de producción al tener que establecer medidas para su control. Uno de los métodos utilizados desde hace mucho tiempo es el uso de agroquímicos, que son aplicados en semillas, follaje o directamente sobre el suelo, obteniendo resultados favorables. Sin embargo, su uso constante da lugar a efectos negativos sobre el medio ambiente ya que se acumulan en los cuerpos de agua, el suelo, las plantas, además de causar problemas de salud a las personas que manipulan estas sustancias. Pero estas alternativas solo son temporales ya que, los microorganismos fitopatógenos desarrollan resistencia contra estos agroquímicos. La tendencia parece estar cambiando hacia un uso reducido de fungicidas y la necesidad de la búsqueda de nuevas alternativas más seguras y ecológicas para la solución a este problema. El control biológico ha sido sugerido como la solución más sustentable a largo plazo y una alternativa viable al uso indiscriminado de plaguicidas agrícolas ([Agrios 2005](#), [Cardosa et al. 2010](#), [FAO 2004](#), [Fraile 1993](#), [Mari 2007](#), [Michel et al. 2008](#), [Rivera 2012](#)).

El control biológico es el uso de organismos (metabolitos o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos perjudiciales en cultivos. La razón principal por la cual muchos productos agrícolas no son destruidos completamente por las plagas y las enfermedades es la presencia natural de agentes de control biológico: organismos capaces de antagonizar con las plagas o patógenos, reduciendo sus efectos dañinos ([FAO 2004](#), [Agrios 2005](#)).

La aplicación de bacterias ácido lácticas (BAL) en la medicina tradicional, la fermentación y conservación de alimentos se ha documentado desde la antigüedad. Como los vegetales son hábitat natural de BAL; su potencial aplicación para la prevención del deterioro de plantas y vegetales es una opción para el área biocontrol y bio-preservación ([Sathe et al., 2007](#)).

El objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad antagonica de bacterias ácido lácticas aisladas del Kefir, frente a microorganismos fitopatógenos; y los posibles metabolitos involucrados en el proceso de inhibición. En este trabajo se estudió el potencial biocontrolador de bacterias ácido lácticas frente a organismos fitopatógenos y los metabolitos que posiblemente estén involucrados en esta inhibición de los mismos. Se determinó que estas bacterias pueden tener un efecto bacterioestático o bactericida, que el efecto podría estar dado por la producción de compuestos volátiles orgánicos, producción enzimática o por competencia de nutrientes y espacio.

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 Antagonismo

El antagonismo microbiano es una relación deletérea o negativa; es la inhibición, deterioro o muerte de un microorganismo por acción de otro ([Pérez y Terron et al. 2014](#)). La primera publicación sobre antagonismo microbiano es la de Willians Roberts en *Philosophia Transactions of the Royal Society* en 1874. Este autor señalaba “que el crecimiento de los hongos a menudo suprimía el crecimiento de bacterias y afirmaba “he observado repetidamente que los líquidos en los *Penicillium glaucum* crece abundantemente es muy difícil que puedan ser infectados artificialmente con bacterias”. Un ejemplo de antagonismo microbiano se observa en el intestino grueso. Las células de *Escherichia coli* producen bacteriocinas, proteínas que inhiben el crecimiento de otras bacterias de la misma especie o de otras especies muy relacionadas, como por ejemplo los patógenos de Shigella y Salmonella. Una bacteria que produce una bacteriocina particular no es afectada por ella, pero si puede ser destruida por otra. ([Tortora et al.,2009](#))

Los microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras y hongos) tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para controlar diversas enfermedades en plantas y frutos ([De Costa y Erabadupitiya, 2005](#)). Para seleccionar a los microorganismos antagonistas se deben considerar las siguientes características generales: a) capacidad para colonizar rápidamente la superficie de los frutos y de persistir en ellas de manera efectiva, b) mayor habilidad que el patógeno para adquirir los nutrientes, y c) capacidad de sobrevivencia bajo diferentes condiciones ambientales ([Wilson y Wisniewski, 1989](#)).

Existe una demanda de nuevos agentes de biocontrol con eficacia estable en distintas condiciones y cultivos. Ello implica que sean capaces de utilizar múltiples mecanismos, pero específicos, de manera que su impacto sobre la microbiota y el medio ambiente pueda ser mínimo. Deberán ser inocuos para plantas, animales y seres humanos;

además de ser compatibles con los tratamientos químicos habituales. La integración de varios agentes en un sistema múltiple de biocontrol, apropiado para proteger de varios patógenos es un ideal. De esta forma se crearían comunidades bacterianas vivas, capaces de combatir al patógeno en múltiples frentes y estimular las defensas de la planta. ([Jacas et al 2011](#)).

### **2.1.1 Tipos de antagonismo**

Los métodos de control biológico de las enfermedades fúngicas, utilizando microorganismos antagónicos, se están surgiendo como alternativas ecológicas al uso de fungicidas. Se ha investigado el potencial de los antagonistas microbianos, aislados de una diversidad de hábitats naturales, para la supresión de las enfermedades fitopatogenas. Los sistemas de biocontrol postcosecha implican una interacción tripartita entre el antagonista microbiano, el patógeno y el huésped, afectados por las condiciones ambientales. Se reportan diferentes modos para actividades fungistáticas de antagonistas microbianos. Se ha sugerido, la competencia por diversos nutrientes y el espacio, micoparasitismo, la secreción de antibióticos antifúngicos y metabolitos volátiles, y la inducción de resistencia del huésped. Algunos autores señalan que la aplicación postcosecha de antagonistas microbianos es más exitosa para un control eficaz de la enfermedad en comparación con la aplicación previa a la cosecha. También se han realizado intentos para mejorar la eficacia global de los antagonistas combinándolos con diferentes sustancias y métodos físicos y químicos ([Dukare et al., 20018](#)).

#### **a) Competencia**

La competencia más común es por nutrimentos, tales como carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y minerales; así como el oxígeno ó el espacio que comparten

que es vital para suprimir los fitopatógenos ([Spadaro et al., 2016](#)). Los antagonistas disminuyen los nutrientes disponibles en el sitio de la herida y hacen que los nutrientes sean inaccesibles para que los patógenos, así se evita que germinen, crezcan e infecten ([Dukare et al., 2018](#)). Se considera como el principal modo de acción por el cual se suprime al patógeno ([Sharma et al., 2009](#)).

Un ejemplo de esto son las levaduras, las cuales son eficaces colonizadoras de la superficie de plantas, debido a su alta tasa de crecimiento y se destacan por la producción de polisacárido extracelular matriz en el sitio de la herida restringiendo el espacio para la colonización por otros microorganismos ([Andrews et al., 1994](#); [Orietta-Fernández, 2001](#)). Además, las levaduras pueden usar la mayoría de las fuentes de carbohidratos y nitrógeno para el crecimiento celular ([Spadaro y Gullino, 2004](#); [Spadaro et al., 2010](#)). Para competir con éxito con el patógeno en el sitio de la herida, el antagonista microbiano debería adaptarse mejor a diversas condiciones ambientales y nutricionales que el patógeno ([Barkai-Golan, 2001](#); [El-Ghaouth et al., 2004](#)); la colonización rápida de la fruta herida por el antagonista es crítica para el control biológico ([Mercier y Wilson, 1994](#)).

La microbiota natural de frutas no patógena que reside en la superficie también puede intervenir en la competencia de nutrientes y espacio mediante la colonización efectiva y la producción de metabolitos tóxicos. Además, la rápida colonización del sitio de la herida también depende de la concentración del antagonista y de la especie de fruta del huésped, ya que ciertos antagonistas prefieren ciertos tipos de nutrientes ([Galvez et al., 2010](#); [Di Francesco et al., 2016](#)).

## **b) Micoparasitismo**

El parasitismo directo, micoparasitismo o hiperparasitismo es la capacidad del microorganismo antagonista para unirse a las hifas de los patógenos fúngicos para producir enzimas extracelulares líticas de la pared celular. El ataque directo del

antagonista depende es un proceso muy complejo que involucra eventos secuenciales, incluye reconocimiento mutuo por antagonista y patógeno, secreción de enzimas líticas, y crecimiento activo del antagonista en el anfitrión y muerte del huésped. ([Spadaro y Gullino, 2004](#); [Talibi et al., 2014](#)). El parasitismo causa la muerte completa de propágulos fúngicos o la destrucción y lisis de su estructura. [Wisniewski et al. 1991](#) informó el micoparasitismo inicialmente en los estudios sobre el control biológico de *Botrytis cinera* por el antagonista (una levadura) *P. guilliermondii*. Los autores demostraron que la interacción tipo lectina resultó en firme unión de la célula antagonista a *B. cinerea*. La lisis de la pared a células fúngicas también se produjo debido a la acción de la  $\beta$ -(1-3) glucanasa, enzima extracelular secretada por la levadura antagonista.

### **c) Antibiosis a través de la producción de antibióticos.**

La antibiosis es el fenómeno en el que los antagonistas secretan metabolitos de origen secundario (antibióticos) que inhiben el crecimiento de potenciales patógenos sensibles a estos. Algunos autores opinan que la antibiosis no debe ser el principal modo de antagonismo, ya que existe el riesgo de aparición de cepas del patógeno resistentes al antibiótico ([Infante et al., 2009](#)).

Aunque los antagonistas microbianos que producen antibióticos se usan en el control de la enfermedad, el papel de la antibiosis mediada por antibióticos en algunos sistemas de control biológico no ha sido completamente descifrado ([Nunes et al., 2012](#)). Por lo tanto, se hace más hincapié en el uso de antagonistas microbianos que no producen antibióticos para controlar los patógenos fúngicos ([Sharma et al., 2009](#); [Di Francesco et al., 2016](#)).

#### **d) Competencia de hierro.**

Entre los micronutrientes, el hierro ( $Fe^{3+}$ ) es necesario para el crecimiento y la virulencia de los patógenos; en este contexto, la competencia por el hierro juega un papel importante en el control biológico de los hongos patógenos ([Saravanakumar et al., 2008](#); [Talibi et al., 2014](#)).

El hierro es un micronutriente biológicamente importante y un componente del citocromo, otras proteínas hemo o no hemo y clústeres de azufre de hierro (Fe/S); también actúa como un cofactor en diversas enzimas celulares. Bajo condiciones limitantes de hierro, el antagonista sintetiza compuestos de bajo peso molecular (500-1,000 Da) denominados sideróforos para obtener competitivamente ión férrico. Los sideróforos son compuestos quelantes que forman un complejo firme y estable al unirse con el ion férrico y transportarlo a la célula. En base a restos estructurales químicos, los sideróforos se clasifican como catecolatos producidos solo por bacterias o como hidroximatos producidos por levaduras y bacterias ([Saraf et al., 2014](#)). El ácido rodolínico producido por *Rhodotorula glutini* es un sideróforo que contiene hidroxamato y ayuda a mejorar su eficacia de control biológico contra la enfermedad del moho azul postcosecha de las manzanas causada por *P. expansum* ([Calvente et al., 1999](#)).

## **2.2 Compuestos con actividad antagónica y mecanismos de acción.**

### **2.2.1 Ácidos orgánicos**

Los ácidos orgánicos contribuyen al desarrollo de sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos alterantes ([Requena 1995](#)). La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y del pH es complementaria, siendo la fracción no disociada de los ácidos orgánicos la que posee una mayor actividad inhibidora debido a su naturaleza lipofílica, ya que pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. Estas moléculas pueden ejercer dos efectos: por un lado, interfieren con funciones celulares, como puede ser la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa, por otro lado, la disociación de

los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior celular. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de las proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, interfiriendo así con la viabilidad ([Requena 1995](#); [Urrego et al., 2005](#)).

Las bacterias lácticas pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de pH relativamente bajo a diferencia de otros grupos microbianos con metabolismo respiratorio, pues poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular, que además de contribuir a la homeostasis del pH interno, origina energía ([Urrego 2005](#)).

### **2.2.2 Metabolitos del oxígeno**

El crecimiento de las bacterias ácido lácticas en medios aerobios conduce a la formación de varios metabolitos del oxígeno como: peróxido de hidrógeno, aniones super óxido y radicales libres, que poseen un efecto bacteriostático y bactericida frente a la flora láctica y no láctica ([Requena 1995](#)). El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) funciona como un oxidante produciendo radicales libres que atacan los componentes celulares esenciales, lípidos, proteínas y DNA ([Janqho 2008](#)). La acumulación del  $H_2O_2$  en los medios de cultivo, se debe a que las bacterias ácido lácticas, en general no poseen catalasa ([Moreira et al., 1993](#)). El peróxido de hidrógeno ha sido estudiado más ampliamente en leche cruda, donde se genera el sistema antimicrobiano "lactoperoxidasa", sin embargo, a pesar de su potencial en la preservación, es reconocida la poca viabilidad de este compuesto en los alimentos, ya que puede tener efectos perjudiciales en su calidad organoléptica causando rancidez de las grasas y reacciones de decoloración y enverdecimiento ([Garcia, 1995](#)).

### 2.2.3 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos evolutivos conservados, producidos por la mayoría de los géneros bacterianos, como un mecanismo de defensa y de competencia frente a otros microorganismos. En general las bacteriocinas se definen como un grupo heterogéneo de péptidos antimicrobiano de síntesis ribosomal, secretados extracelularmente y que poseen en común el tamaño molecular, la naturaleza catiónica y anfipática. Su actividad antimicrobiana frente a otros microorganismos es en general relacionada taxonómicamente con la cepa productora ([Hancock et al., 1995](#); [Nissen-Meyer, 1997](#); [Cotter et al., 2005](#)). La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida ([Feria Cáceres, 2005](#); [Moreira et al., 1993](#)).

Las bacteriocinas de bacterias lácticas son generalmente estables a pH ácido o neutro, indicando una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen. Además, algunos extractos de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* presentan estabilidad al calentamiento a 50 y 80 °C, propiedad que es importante para asegurar el control de microorganismos en algunos procesos de la industria alimentaria ([Gutiérrez et al., 2005](#)).

Los péptidos antimicrobianos presentan una serie de pasos que conducen a la muerte celular que ocurren con independencia del tiempo y/o la especificidad del mecanismo de acción. La mayoría de las bacteriocinas de las BAL inhiben el crecimiento de las bacterias mediante la formación de poros en la membrana celular ([Brogden, 2005](#); [Hale y Hancock, 2007](#)).

El primer paso consiste en la interacción electrostática entre los péptidos catiónicos y la membrana citoplasmática las cuales poseen en sus superficies lipopolisacáridos (LPS) con los fosfolípidos de la membrana de las bacterias que se encuentran cargadas negativamente. La unión de bacteriocinas se da entre la región N-terminal de la bacteriocina (región hidrofílica) con la superficie polar de la membrana celular. Una vez unida la bacteriocina a la pared celular, la región C-terminal (región

hidrofóbica) penetra hacia el interior no polar de la membrana celular, lo que resulta en la formación de poros en la membrana y como consecuencia se produce un vaciamiento intracelular, generando la pérdida de iones K, de energía en forma de ATP y en algunos casos, de aminoácidos y moléculas de bajo peso molecular ([Bemena et al., 2014](#)). Las consecuencias de lo anterior se traducen en la disminución del potencial de membrana y en la escasa disponibilidad de las reservas energéticas de la célula, lo que conlleva a la disminución de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, que finalmente desencadena la muerte de la célula ([Vásquez et al., 2009](#); [Yusuf, 2013](#); [Bemena et al., 2014](#)).

En el caso de las bacterias Gram-negativas y ácidos teicoicos y lipoteicoicos en las bacterias Gram positivas, el segundo paso consiste en la adhesión de estos péptidos de forma paralela sobre la superficie de la membrana y cuando la razón péptido/lípido aumenta los péptidos se orientan de forma perpendicular, este reordenamiento provoca la inserción y por consiguiente la permeabilización de estos péptidos en la membrana para culminar con la formación de poros transmembrana ([Yang et al., 2001](#)). El mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos, presentan en general algunos elementos comunes como las características a nivel molecular, los cuales permiten agruparlos según sus diferentes propiedades ([Chmiel, 2001](#); [Brogden, 2005](#); [Kamysz et al., 2003](#), [Hale y Hancock, 2007](#)).

Los diferentes mecanismos de acción se representan en diversos modelos propuestos en la actualidad, los cuales se describen a continuación:

#### **a) Modelo en barril.**

También conocido como modelo de haces de hélices transmembrana (Transmembrane helical-hundle model), los péptidos helicoidales orientados en paralelo se insertan perpendicularmente en la membrana de modo que las regiones hidrofóbicas de los péptidos se alinean con la región del core lipídico de la membrana,

dejando las regiones hidrofílicas hacia el lumen central, figura 2.1A. Se forma así un poro transmembrana muy similar a un barril sin fondo cuyas paredes son los péptidos helicoidales ([Bechinger, 1997](#); [Shai, 1999](#)).

#### **b) Modelo de carpeta.**

Los péptidos se acumulan en la superficie de la bicapa cubriendo la superficie de la membrana celular como una carpeta. En altas concentraciones estos péptidos interrumpen la continuidad de la membrana insertándose en la membrana en paralelo a la bicapa lipídica, mediante sus regiones hidrofóbicas. Las regiones polares de los péptidos quedan expuestas al exterior, de modo que actúan de manera similar a los detergentes, como se observa en la figura 2.1B ([Shai, 1999](#); [Ladokhin y White, 2001](#)).

#### **c) Modelo de poro toroidal.**

Los péptidos se acumulan en la superficie de la membrana celular y se insertan en la membrana induciendo la distorsión de la monocapa de lípidos a curvarse a través del poro, de modo que las regiones polares de ambas capas llegan a unirse. Así, las paredes del poro quedan formadas por las cabezas polares de los lípidos de membrana y por los péptidos insertados en ella, como se observa en la figura 2.1C ([Bechinger, 1997](#)).

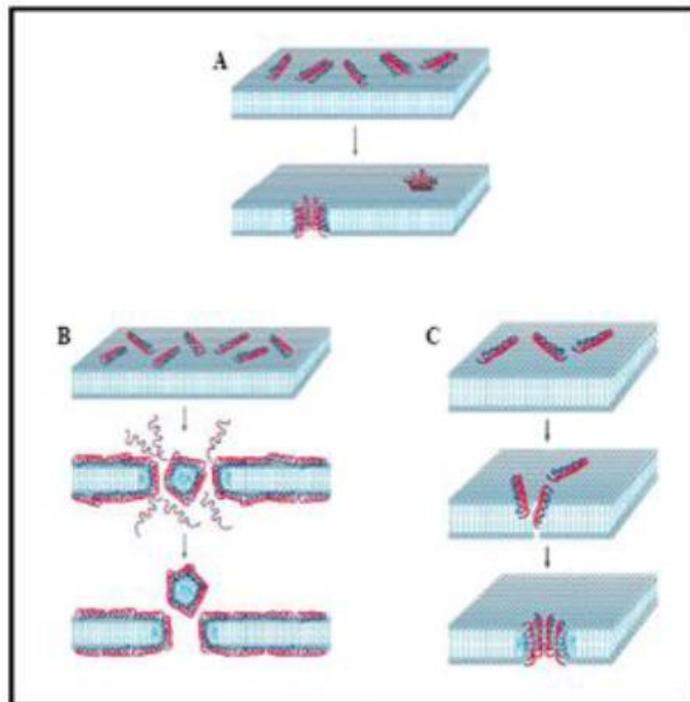


Figura 2.1. Esquema de los diferentes mecanismos de acción propuestos para los péptidos antimicrobianos. (A) Modelo de barril (B) Modelo de carpeta (C) Modelo toroidal. Las regiones hidrofílicas del péptido se observan de color rojo y las hidrofóbicas en azul. ([Broden, 2005](#)).

#### 2.2.4 Compuestos volátiles

Los compuestos orgánicos volátiles (VOC) son compuestos lipofílicos de bajo peso molecular que pueden vaporizarse e ingresar a la fase gaseosa a temperaturas y presiones atmosféricas normales. VOCs en general tienen una solubilidad en agua baja a media y a menudo tienen un olor distintivo ([Herrmann 2010](#)). Químicamente, esta mezcla de fase gaseosa puede contener ácidos, alcoholes, aldehídos, aromáticos, ésteres, heterociclos, cetonas, terpenos, tioles, etc. Además, el cóctel complejo varía temporalmente y cambia con la temperatura, sustrato y otras variables ambientales para cada especie ([Chiron y Michelot, 2005](#); [Korpi et al., 2009](#); [Lemfack et al., 2014](#)). Desde hace muchos años se sabe que las bacterias benéficas de la

rizosfera producen VOC que mejoran el crecimiento de las plantas ([Lugtenberg y Kamilova 2009](#); [Blom et al., 2011](#)) muestra actividad nematicida e induce resistencia sistémica en los cultivos ([Ryu et al., 2003](#)).

VOCs producidos por *Bacillus spp.* son bien conocidos por su actividad fungistática contra los patógenos fúngicos. Los VOC producidos por *B. thuringiensis* y *B. pumilus* redujeron aproximadamente el 88.5% de las infecciones por antracnosis en el mango ([Zheng et al., 2013](#)). El análisis por microscopía electrónica de las hifas patógenas expuestas a los compuestos volátiles reveló muchas anomalías morfológicas, como la alteración de la vacuolación celular, la permeabilidad de la membrana y la hinchazón en las hifas, lo que provocó una débil formación de apresorios y conidios ([Li et al., 2012](#)). La hidrofobicidad de algunos volátiles les permite dividirse en la capa lipídica de la membrana celular, haciendo que la membrana sea más permeable. De hecho, un estudio sobre los mecanismos de acción inhibitoria de tres monoterpenos contra *S. aureus* y *Escherichia coli* reveló una perturbación de la fracción lipídica de la membrana plasmática de los microorganismos, dando como resultado una alteración de la permeabilidad de la membrana y una fuga de compuestos intracelulares ([Trombetta et al., 2005](#)).

[Weisskopf \(2013\)](#) observó que estos compuestos producen inhibición del crecimiento del tubo germinal (nonanal), crecimiento micelial (2-etil-1-hexanol, benzaldehído, benzotiazol y nonanal), producción de pigmento (benzotiazol) y germinación de esporas (2-etil-1-hexanol, benzotiazol y nonanal). Los derivados de benzaldehído causan citoplasma coagulación o lisis a través de la disrupción de la membrana celular ([Alamri et al., 2012](#)). Finalmente, los compuestos volátiles pueden tener un efecto sinérgico cuando se combinan con antibióticos ([Gallucci et al., 2009](#)).

### 2.2.5 Enzimas

La lisis es el mecanismo en la cual intervienen enzimas hidrolíticas producidas por los microorganismos antagonistas como factores biocontroladores. La pared de células fúngicas está compuesta de compuestos como la quitina y el glucano en asociación con la proteína de la pared celular para proporcionar resistencia mecánica e integridad estructural. La quitina es un compuesto polimérico lineal de subunidades N-acetilglucosamina unidas por enlaces de  $\beta$  1-4, mientras que el glucano actúa como material de relleno y constituye aproximadamente 50-60% de la pared celular total ([Spadaro y Droby, 2016](#)). El contenido de quitina en la pared celular de hongos filamentosos es más del 20% ([Seidl, 2008](#)). La proteína de la pared celular está presente en forma de glicoproteína y representa el 20-30% de la pared celular total. La desintegración de la pared celular de los hongos patógenos por la acción de las enzimas hidrolíticas extracelulares de antagonistas, expulsado quitinasas, quitosanasas, glucanasas, celulasa y/o proteasa, de forma individual o en combinación, contribuye a biocontrol una actividad ([Spadaro y Droby, 2016](#)). Las enzimas líticas también impiden la germinación de las esporas de los patógenos, la longitud del tubo germinal y destruyen las oosporas ([El-Tarabily, 2006](#)).

Algunos trabajos indican que *Bacillus thuringiensis* tiene potencial para el control biológico de hongos fitopatógenos, esto debido a la producción de quitinasas, que inhibe el crecimiento de los hongos *Sclerotium rolftii* en un 100% y *Aspergillus terreus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. candidus*, *Nigrospora sp.*, *Fusarium sp.*, *Rhizopus sp.*, *Absidia sp.*, en porcentajes que oscilan entre 55% a 82% ([Reyes et al., 2004](#); [Morales de la Vega et al., 2006](#)).

### 2.2.6 Antibióticos

Muchos géneros bacterianos, como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Burkholderia*, *Pantoea*, *Lysobacter* y *Enterobacter*, están predominantemente involucrados en la producción de antibióticos. Los antibióticos producidos por *Bacillus*

y *Pseudomonas* son bien conocido por su actividad antifúngica contra hongos patógenos. El antibiótico antifúngico efectivo más común compuestos producidos por bacterias es pirrolnitrina por *S. plymuthica* y *Pseudomonas spp.* ([Meziane et al., 2006](#); [Weller, 2007](#)) lipopéptidos de iturina por *Bacillus spp.* ([Dimkic et al., 2013](#); [Pretorius et al., 2015](#); [Waewthongrak et al., 2015](#)) y siringomicina por *P. syringae* ([Grgurina et al., 2002](#)). Además, *Bacillus spp.* también sintetiza metabolitos antibacterianos y antimicóticos tales como gramicidina S ([Cho et al., 2003](#)), surfactina, bacillomycin y fengycin ([Arrebola et al., 2010](#)). Estos inhiben el crecimiento y desarrollo de hongos patógenos a través de diversos mecanismos, incluida la inhibición de la síntesis de la pared celular, la destrucción y alteración de las estructuras de la membrana celular y prevención de la formación de complejos de iniciación en las pequeñas subunidades de los ribosomas en la síntesis de proteínas ([De Souza et al., 2003](#)).

### 2.3 Microorganismos fitopatógenos.

Se considera que existen más de 8000 especies de hongos que causan enfermedades en las plantas. La mayoría de las plantas puede ser atacada por algún tipo de hongo (o varios), y también se sabe que un mismo hongo fitopatógeno puede infectar uno o más tipos de plantas, aunque sean de diferentes familias. La mayoría de los hongos fitopatógenos pasan gran parte de su ciclo de vida en la planta que les sirve de huésped, y otra parte en el suelo, en los residuos vegetales que se encuentran ahí. Generalmente los cuerpos reproductores del hongo se forman en la superficie de los tejidos de la planta huésped, lo cual causa que las esporas se dispersen rápida y fácilmente ([Garcia, 2004](#))

Los efectos que producen los hongos en plantas pueden ser de tipo local, cuando afectan a una pequeña porción del tejido, o general, si causan daño completo a toda la planta, sin embargo, en una misma planta pueden producir primero el efecto local y luego uno generalizado. El daño producido por los hongos es, principalmente una muerte del tejido (necrosis) que infectan, por ejemplo, pudrición de raíz, manchas

foliares o tizón. También pueden producir atrofia de la planta completa o de alguna de sus partes y, en otros casos, pueden causar un crecimiento excesivo (hipertrofia), como las agallas de las raíces, verrugas o tumores. Además, los hongos afectan la raíz, o bien el sistema vascular de la planta, tienden a producir color amarillo y marchitez en la planta ([Garcia, 2004](#))

Los fitopatógenos que infectan cultivos y vegetales causan una pérdida significativa de cultivos de campo, amenazando la seguridad alimentaria mundial y la fortaleza económica de los países afectados ([Knight et al., 1997](#); [Darji et al., 2012](#)). La pérdida estimada de especies de cultivos principales como arroz, trigo, maíz, papa y soja a hongos fitopatógenos en los años 2009 y 2010 habría sido suficiente para suministrar nutrición a 600 millones de personas ([Fisher et al., 2012](#)). Los fitopatógenos microbianos generalmente se controlan mediante la aplicación de agroquímicos agresivos o plaguicidas sintéticos. Sin embargo, el uso extensivo de estos pesticidas ha provocado el desarrollo de resistencia a los agroquímicos comunes por parte de los fitopatógenos ([Sparks y Lorsbach, 2017](#)). Los plaguicidas sintéticos están asociados con la toxicidad en humanos y el medio ambiente ([Aktar et al., 2009](#); [Singh et al., 2016](#); [Valcke et al., 2017](#)), destacando la creciente demanda de agentes de control biológico alternativos y amigables con el medio ambiente.

### **2.3.1 *Fusarium equiseti***

El genero *Fusarium*, en general, representan uno de los principales géneros fúngicos, que se distribuyen de forma ubicua y se encuentran con frecuencia en productos agrícolas almacenados, como los cereales ([Kachuei et al., 2009](#)) ocasionalmente se encuentra asociado con granos infectados por el tizón fusarium ([Xue et al., 2006](#)). Esta especie ocurre comúnmente en áreas tropicales y subtropicales ([Booth 1978](#); [Bosch and Mirocha 1992](#)).

*Fusarium equiseti* es un habitante del suelo y puede infectar semillas, raíces, tubérculos y frutos de varias plantas de cultivo. Las especies de *Fusarium* son consideradas los patógenos de plantas más importantes del mundo, y presentan la capacidad de sintetizar una amplia variedad de micotoxinas ([Lesli et al., 2006](#)). Ha sido previamente implicado como un agente causal de la enfermedad en diversas especies de plantas, como el algodón ([Chimbekujwo, 2000](#)), el caupí, las lentejas, el azúcar, la papa y la oina. Este hongo también puede producir micotoxinas en cultivo y plantas. Informes previos indican esta capacidad a producir varias formas de nivalenol, diacetoxyscirpenol, y la micotoxina estrogénica zearalenona ([Xue et al., 2006](#))

### **2.3.2 *Fusarium solani***

Es capaz de causar enfermedades en muchos cultivos agrícolas importantes. Los genomas de algunos de estos hongos incluyen cromosomas supernumerarios que son dispensables y codifican factores de virulencia específicos del huésped. Pertenece a la división (filo) más grande del reino Fungi: Ascomycetos (Son hongos con micelio tabicado que producen ascosporas endógenas. Pueden ser unicelulares y talófitos. La reproducción puede ser de dos tipos: asexual, por esporas exógenas (conidios o conidioesporas), y sexual, esporas endógenas (ascospora). Han sido aislados de lugares extremos, desde dentro de rocas en la planicie helada de Antártica hasta las profundidades del mar. Colectivamente tienen un amplio rango de anfitriones, y han sido subdivididos previamente en formas especiales.

Típicamente, causa la putrefacción del pie y/o de la raíz de la planta huésped infectada, y el grado de necrosis se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. Los síntomas en las porciones sobre el suelo de la planta pueden variar mucho y de la planta huésped, y la enfermedad puede manifestarse como marchitamiento, retraso del crecimiento y clorosis o lesiones en el tallo y/o las hojas. La implementación de prácticas de manejo agrícola, tales como la rotación de cultivos y el tiempo de siembra, puede reducir el riesgo de pérdida de cosechas causada por el FSSC. Si está

disponible, el uso de variedades resistentes es otro medio para controlar la enfermedad en el campo. ([Coleman, 2015](#))

[Cubillos Hinojosa et al \(2011\)](#) evaluó bajo condiciones de invernadero el efecto biocontrolador de la cepa nativa TCN-014 y la cepa comercial TCC-005 de *Trichoderma harzianum* contra *Fusarium solani*, causante de la marchitez del maracuyá, disminuyendo significativamente los síntomas, el número de plántulas enfermas, plantas con pudrición en corona y plántulas muertas. El mejor resultados se consiguió cuando se inocula primero *T. harzianum*, en comparación con su inoculación después de haber preinfectado las plántulas con el patógeno, esto permite pensar en el uso de *T. harzianum* para el control de la enfermedad como medida preventiva más que curativa, aun cuando su aplicación posterior a la presencia del fitopatógeno también logra disminuir el efecto del mismo. Tanto de la cepa nativa como comercial. Los resultados sugieren una acción efectiva de *T. harzianum* como biocontrolador de *F. solani*.

### **2.3.3 *Curvularia* sp.**

*Curvularia* es un hifomiceto (hongo), el género *Curvularia* agrupa un gran número de especies (alrededor de 80) capaces de ser patógenos facultativos de las plantas y del suelo. Pueden causar diferentes tipos de daños en hojas, tallos, flores y semillas, que abarcan desde pequeñas manchas hasta lesiones de mayor tamaño ([Jin, 1991](#)), la mayoría de sus apariciones se han reportado en regiones tropicales, aunque algunas se encuentran en las zonas templadas. Las colonias son de crecimiento rápido, parecidas a las de la gamuza, de color marrón claro a marrón negruzco con un reverso negro. Conidióforos erectos, de forma recta a flexuosa, septados, a menudo geniculados (que producen conidios en sucesión simpodial) a veces nodulosos. Los conidios son elipsoidales, a menudo curvados o semilunar, marrón rojizo medio a marrón oscuro ([Cunha da et al., 2013](#)).

Estas afectaciones abarcan un gran número de cultivos, muchos de ellos de gran importancia económica. Estudios recientes han demostrado que la identificación morfológica no se correlaciona con la identificación molecular ([Manamgoda et al., 2012](#); [Yanaqihara et al., 2010](#), [Cunha da et al., 2013](#)). Un análisis filogenético de los géneros *Bipolaris* y *Curvularia* ha resultado en una realineación de varias especies. En particular, los aislados clínicos previamente identificados como especies de *Bipolaris*, notablemente *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* y *B. spicifera* ahora se han transferido a *Curvularia* ([Manamgoda et al., 2012](#)).

#### **2.3.4 *Phytophthora capsici***

Cuarenta y nueve especies de plantas han sido reportadas infectado por *P. capsici*. Entre Los anfitriones principales de *P. capsici* son pimientos rojos y verdes (*Capsicum annuum*), Sandía (*Citrullus lanatus*), melón (*Cucumis melo*), melón meloso (*C. melo*), pepino (*Cucumis sativus*), calabaza azul Hubbard (*Cucurbita maxima*), calabaza (*Cucurbita moschata*), calabaza (*C. moschata*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), pimienta negra (*Piper nigrum*), y berenjena (*Solanum melongena*) ([Erwin y Ribeiro, 1996](#))

*Phytophthora capsici* es el patógeno más devastador para la producción de chile en todo el mundo y las estrategias de manejo actuales no son efectivas ([Barchenger et al., 2018](#)). Este patogeno transmitido por el suelo puede infectar y causar pérdidas severas en varios cultivos, incluidos los miembros de las familias Solanaceae y Cucurbitaceae ([Tian & Babadoost, 2004](#)). También se han registrado infecciones severas en pepinos donde causa la pudrición del fruto. En el campo, el modo primario de infección es mediante la liberación de zoosporas móviles por contacto con el agua de la lluvia o el riego ([Granke et al., 2012](#)).

## 2.4 Consorcio de Bacterias Ácido-Lácticas (BAL)

El Kéfir es una bebida fermentada a base de leche. Es una bebida ácida, viscosa, espumosa debido a la producción de CO<sub>2</sub>, que contiene un bajo porcentaje de alcohol y se cree que se originó en las montañas del Cáucaso en Rusia hace unos 2000 años. La leche es fermentada por una matriz sólida de polisacáridos, similar a la coliflor, conocida como grano de kéfir, que se reutiliza para iniciar las fermentaciones posteriores. El grano se compone principalmente de kefiran producido por bacterias ([La Riviere et al., 1967](#)), que contiene un consorcio complejo de bacterias y levaduras que funcionan en simbiosis en la cual comparten sus bioproductos como fuente de energía, o como estimulantes de crecimiento para sobrevivir o multiplicarse en el mismo entorno ([Farnworth, 2005](#); [Lopitz et al., 2006](#)).

Se cree que la composición microbiana de los granos de kéfir varía dependiendo de las condiciones geográficas, climáticas y culturales, así como la diversidad de especies locales de levaduras y bacterias silvestres, el método de cultivo y el tipo de leche utilizada ([Ninane et al., 2005](#)). Los análisis sugieren que las bacterias constituyen la mayoría, hasta 90%, de la población en el grano ([Simova et al., 2002](#)). Tales estudios han revelado que las bacterias predominantes son las bacterias ácido-lácticas (BAL) *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Streptococcus*; así como las bacterias de ácido acético del género *Acetobacter* ([Witthuhn et al., 2005](#); [Chen et al., 2008](#); [Kesmen y Kacmaz, 2011](#)).

Las bacterias contribuyen a la producción de ácido láctico, que conserva la leche, y produce diversos antimicrobianos y sabor compuestos (por ejemplo, acetaldehído) además de otros metabolitos (por ejemplo, polisacáridos extracelulares), aminoácidos libres y vitaminas ([Guzel-Seydim et al., 2011](#)).

Las bacterias ácido-lácticas son organismos quimiotrofos, es decir, obtienen su energía de la oxidación de compuestos químicos, concretamente azúcares o hexosas. La oxidación de azúcares constituye la principal ruta metabólica para la producción de energía en bacterias lácticas ([Ribereau-Gayon et al., 2000](#)). Se trata de

microorganismos con requerimientos nutricionales exigentes, al necesitar una gran variedad de sales minerales, vitaminas y aminoácidos. Su cultivo en medio sintético es a menudo complejo y muestra un crecimiento escaso, debido en parte a que estas exigencias nutricionales responden a necesidades específicas de cepa ([Endo y Dicks, 2014](#)).

En estudios previos en nuestro grupo de laboratorio aislaron 14 cepas del Kéfir de Escárcega utilizando diferentes medios de cultivo como Luria Bertani (LB), medio extracto de levadura, dextrosa y cloranfenicol (YGC) y medio selectivo para acetobacter; estos aislados se fueron conservados en glicerol y para un posterior uso a -20 °C.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Los fitopatogenos ocasionan grandes pérdidas económicas en la industria agrícola, esto ocasiona alza en los precios de consumo. Los tratamientos físicos y químico ocasionan contaminación a los mantos acuíferos, suelo y a las mismas plantas; además representan un peligro para los animales y/o personas que entren en contacto con ellos. Por lo anterior se propone la búsqueda de una alternativa que sea segura para seres humanos y animales; además que sea amigable con el medio ambiente. Se ha demostrado que las bacterias producen compuestos capaces de inhibir el crecimiento de hongos. El antagonismo microbiano representa una herramienta ecoamigable, las bacterias aisladas de un consorcio utilizado para la producción de leche fermentada (kéfir) podrían ser eficientes como agentes biocontrol, estas bacterias están dentro del grupo ácido lácticas consideradas Generalmente Reconocidas como seguras (GRAS por sus siglas en inglés).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Identificar bacterias con capacidad antagónica sobre microorganismos fitopatógenos *in vitro* e *in planta* y sus posibles metabolitos involucrados.

### 4.2 Objetivos Específicos.

- Evaluar la capacidad antagónica *in vitro* de 14 bacterias contra *Fusarium solani*, *Curvularia*, *Fusarium equiseti*, *Phytophthora capsici*.
- Identificar por métodos moleculares las bacterias con mayor actividad antagónica.
- Evaluar e identificar los compuestos volátiles producidos por las bacterias antagónicas, sobre la inhibición de fitopatógenos.
- Evaluar actividad proteolítica de bacterias que presente actividad antifúngica.
- Determinar la capacidad antagónica de los sobrenadantes obtenidos durante el crecimiento bacteriano.

## 5. METODOLOGÍA.

### 5.1 Microorganismo

Se utilizaron bacterias aisladas de un consorcio microbiano, proveniente del municipio de Escárcega Campeche, utilizado para la producción de una leche fermentada denominada Kéfir. Los fitopatógenos *Fusarium solani*, *Curvularia sp.*, *Fusarium equiseti* y *Phytophthora capsici* microorganismos que forman parte de la colección de cultivos del Laboratorio de Biotecnología Molecular de la División de Estudios de Posgrado e Investigación del Instituto Tecnológico de Mérida

### 5.2 Propagación de la cepa.

Para la propagación de las cepas utilizadas en este estudio, se realizó en cajas Petri con medio PDA (Agar Papa y Dextrosa, de Difco) esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Las bacterias se incubaron a 35 °C durante 24 horas en una incubadora marca Binder. La propagación de los hongos se realizó inoculando un fragmento micelar de aproximadamente 1cm de diámetro en placas con PDA e incubadas a 28 °C durante 6 días en una incubadora marca Binder red LINE.

### 5.3 Evaluación antagónica.

La evaluación antagónica de las 14 cepas aisladas del consorcio microbiano Kéfir contra los fitopatógenos *Fusarium solani*, *Curvularia*, *Fusarium equiseti* y *Phytophthora capsici* se realizó ensayos de cocultivo inoculando tanto las bacterias como a los fitopatógenos en cajas Petri con medio PDA.

Para la realización de este ensayo se inocularon las bacterias en tubos de 25 mL con rosca que contenían 10 mL de medio líquido LB previamente esterilizados a 121 °C durante 15 minutos en una autoclave marca GeoLab. El inóculo se incubó a 35 °C,

durante 24 horas a 250 rpm en una incubadora con rotación marca IKA KS 4000i control. De estos cultivos de 24 horas se extrajeron 100 µL y se transfirieron en tubos con medio liquido LB incubados a 35 °C y 250 rpm tomando 1 mL de muestra cada hora y midiendo la absorbancia de cada una de las cepas en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer Lambda XLS+ a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 540nm hasta obtener una absorbancia de 0.5, esto con el fin de ajustar las muestras a la escala McFarland.

Una vez ajustadas las muestras bacterianas a la escala McFarland se inoculó 1µL de cada una de las cepas en cajas Petri en medio PDA (cuatro por caja), tomando como referencia los cuatro puntos cardinales, se recomienda esperar a que el caldo de cultivo bacteriano sea absorbido en el medio PDA, y así, posteriormente inocular un disco de 1 cm de diámetro aproximadamente de la colonia micelir del fitopatógeno en el centro de la caja Petri. En una caja Petri se incubaron 4 bacterias y un fitopatógeno, hasta haber incubado los cuatro fitopatógenos con las 14 bacterias. Estos ensayos se realizaron por duplicado.

La comprobación de la acción antagónica de la(s) bacteria(s), se obtuvo después seis días de incubación de las placas a 28 °C en una incubadora Binder red LINE. Se evaluó la inhibición del crecimiento del micelio fúngico, obtenido por acción de la bacteria midiendo el crecimiento radial del hongo con un Vernier marca Truper y comparándolo con el su respectivo hongo control, con la finalidad de descartar aquellas bacterias que no presenten actividad antagónica contra estos fitopatógenos

El efecto antagónico de la bacteria contra el hongo fue calculado basándose en el porcentaje radial de inhibición los hongos, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ radial de inhibición} = \left( \frac{R_c - R_i}{R_c} \right) 100$$

donde  $R_c$  es el radio del hongo control que se encontrara en ausencia de la bacteria y  $R_i$  representa el radio del hongo en presencia de la bacteria antagonista. ([Ezziyyani et al., 2004](#))

## 5.4 Identificación molecular de bacterias con actividad antagónica.

### Extracción de ADN

El DNA total de las cepas marcadas con el número 1, 4, 5, 7, 9 y 11 fue extraído de células crecidas en medio LB líquido, incubadas a 35 °C, durante 24 horas en agitación continua a 250 rpm, en una incubadora con rotación marca IKA KS 4000i control. Trascurrido el tiempo de incubación se tomó 1 mL de muestra y se agregó a un tubo eppendorf de 2 mL y se centrifugó durante 2 minutos a 14000 rpm en una centrifuga marca eppendorf 5418, se desechó el sobrenadante, el paso se repitió hasta completar 3 mL de muestra. El pellet obtenido fue resuspendido en 500 µL de agua ultra pura NORGEN®. La suspensión fue calentada durante 15 minutos a 100 °C e inmediatamente sumergido en hielo por 5 minutos siguiendo el protocolo de Fernández ([Fernandez y Chavez, 1999](#)).

### Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la Reacción en cadena de la polimerasa de ADN genómico de las cepas seleccionadas (1, 4, 5, 7, 9, 11), Se amplificó la región comprendida del 27 al 1512 del gen 16S ribosomal el gen 16S utilizando los primer universales 1512R 5' CGGCTACCTTGTTACGACT 3' y 27F 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Marca BIO-RAD modelo T100 con las siguientes condiciones: 1 ciclo de desnaturalización previa a 94 °C durante 3 min; seguido de 24 ciclos de desnaturalización a 95 °C (2 min), 42 °C (30 seg) y 72 °C (4 min) para el alineamiento, más un ciclo adicional con un alargamiento final de la cadena de 20 min (figura 5.1). Las concentraciones de los reactivos para la reacción en cadena de la polimerasa se muestran en la tabla 5.1.

Tabla 5.1 . Concentración de reactivos utilizados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

<b>Reactivos</b>	<b>Volúmen final 1X</b>	<b>Concentración mM</b>
<b>DNTPs</b>	0.8 $\mu$ L	0.3 mM c/u
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1 $\mu$ L	2 mM
<b>Primer F</b>	1 $\mu$ L	0.3 mM
<b>Primer R</b>	1 $\mu$ L	0.3 mM
<b>Buffer</b>	2 $\mu$ L	--
<b>Polimerasa</b>	0.25 $\mu$ L	1.2 U
<b>Agua ultra pura</b>	13.25 $\mu$ L	--
<b>ADN</b>	2 $\mu$ L	200 ng
<b>Volumen final</b>	20 $\mu$ L	

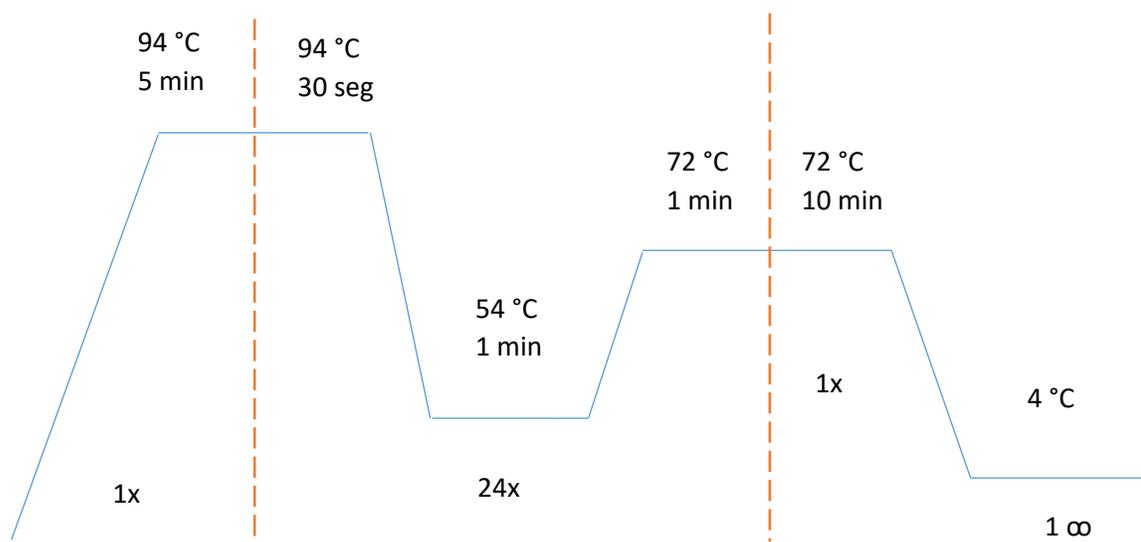


Figura 5.1 Condiciones empleadas en la reacción en cadena de la polimerasa para la implicación de ADN genómico de bacterias aisladas.

### **Purificación de los amplicones por medio del “QIAquick PCR Purification Kit”**

La purificación de los productos de PCR se realizó de acuerdo con el protocolo **QIAquick PCR Purification Kit**. Los productos de PCR se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 mL. A cada muestra se le adicionaron 5 volúmenes de buffer PB. Posteriormente se transfirió la muestra a las columnas QIAquick con sus respectivos tubos de 2 mL para la colecta. Se procedió a centrifugar durante 60 seg a 14 000 rpm en una microcentrifuga marca eppendorf modelo 5418. La solución colectada de los tubos se desechó y se reutilizó el mismo tubo. Se agregaron 0.75 mL de buffer PE a la columna, se centrifugó durante 60 seg y se desechó el sobrenadante. La columna se centrifugó por un periodo adicional de 1 min a 14 000 rpm para eliminar completamente el etanol del buffer PE. La columna se transfirió a un tubo de microcentrifuga eppendorf de 1.5 mL y los productos de PCR se eluyeron con 50  $\mu$ L de agua.

### **Electroforesis en gel de agarosa.**

Para visualizar que la amplificación fuera exitosa se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, en los pocillos se cargo 2 $\mu$ L de muestra y fraccionadas a 90 volts durante 30 min, posteriormente fue teñido con bromuro de etidio a una concentración de 10mg/mL. Las bandas fueron visualizadas en un transiluminador GELDOC marca Bio-Rad.

Los productos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) purificados fueron enviados a secuenciar al instituto de biotecnología de la Universidad Autónoma en Cuernavaca (IBT-UNAM). Una vez obtenidas las secuencias fueron buscadas por alineación local básica (BLAST) en la base de datos GenBank el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), para encontrar las coincidencias más cercanas y obtener la identidad de los microorganismos estudiados.

## **5.5 Evaluación de compuestos volátiles sobre la inhibición de fitopatógenos.**

### **Preparación del ensayo**

Este ensayo se realizó solo con las cepas bacterianas que mostraron actividad en el ensayo de antagonismo (1, 4, 5, 7, 9, 11) y los cuatro fitopatógenos (*F. solani*, *Curvularia sp.*, *F. equiseti*, *P. capcisi*).

Para la realización de este ensayo se inocularon las bacterias en tubos de 25 mL con rosca que contenían 10 mL de medio líquido LB previamente esterilizados a 121 °C durante 15 minutos en una autoclave marca GeoLab. El inóculo se incubó a 35 °C, durante 24 horas a 250 rpm en una incubadora con rotación marca IKA KS 4000i control. De estos cultivos de 24 horas se extrajeron 100  $\mu$ L y se transfirieron en tubos con medio líquido LB incubados a 35 °C y 250 rpm tomando 1 mL de muestra cada hora y midiendo la absorbancia de cada una de las cepas en un espectrofotómetro

marca Perkin Elmer Lambda XLS+ a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 540nm hasta obtener una absorbancia de 0.5, esto con el fin de ajustar las muestras a la escala McFarland.

En cajas Petri que contenía PDA se inoculo en el centro de la caja un fragmento de micelio de aproximadamente 1 cm de diámetro del hongo de seis días de crecimiento y las bacterias en placas Petri con medio PDA por separado. Posteriormente se colocaron placa sobre placa evitando el contacto directo entre el fitopatógeno y la bacteria, de manera que se evitó el contacto de ambos microorganismos y de sus metabolitos no volátiles, compartiendo solo el aire; posteriormente selladas con parafilm (Parafilm® de Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, E.U.A.). Se incubaron a 28°C durante 6 días colocando el hongo hacia abajo y la bacteria hacía arriba. El efecto antagónico de la bacteria contra el fitopatógeno fue calculado basándose en el porcentaje radial de inhibición, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ radial de inhibición} = \left( \frac{R_c - R_i}{R_c} \right) 100$$

donde  $R_c$  es el radio del hongo control que se encontrara en ausencia de la bacteria y  $R_i$  representa el radio del hongo en presencia de la bacteria antagonista ([Tenorio-Salgado et al., 2013](#)).

### **Extracción de compuestos volátiles.**

Para de extraer los compuestos volátiles producidos durante el ensayo, previo a la inoculación se realizó un orificio con ayuda de una aguja caliente y después se realizó el procedimiento antes descrito en el apartado 5.5. Pasados los días de incubación, se introdujo una jeringa de micro extracción con la que se extrajo el aire contenido entre las placas, los cuáles fueron analizados por GC-MS.

### **Detección de Compuestos volátiles**

Los análisis GC-MS se realizarán utilizando un sistema Agilent GC-MS (GC con 6890N y masa detectora selectivo 5973N). Se inyectó 2  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras en modo splitless. Un Agilent Technologies HP-5MS (30 min por 0.250 mm por 0.25 min) se utilizó una columna capilar de sílice fundida. El helio (99.999%) fue el gas acarreador en una columna sobre columna Flujo de 1 mL/min. La temperatura del horno fue programada a 60 °C durante 5 min, aumentado a una velocidad de 15 °C /min hasta 300 °C y después se mantuvo durante 10 minutos a 300 °C. Las condiciones del detector de masa fueron las siguientes: la línea de transferencia de GC a MS se mantuvo de 280 °C, el cuádruplo MS se ajustó a 150 °C y la fuente MS a 230 °C. El detector fue operado a 70 eV. El análisis fue realizado en el modo de exploración completa, que van desde  $m/z$  2 a 600 ([Tenorio-Salgado et al., 2013](#)). Los cromatogramas obtenidos fueron analizados con el software AMDIS.

### **5.6 Curvas de crecimiento de las cepas antagónicas**

En medio líquido LB se inocularon las cepas *Lactobacillus jensenii*, *Bacillus amiloquelafacies*, *Bacillus endofiticus*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus methylotopicus* y cepa 4 en agitación continua a 250 rpm y una temperatura de 35 °C tomándose muestras cada 2 horas y midiendo la absorbancia en una en un espectrofotómetro marca Perkin Elmer Lambda XLS+ a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 540nm, tomando como blanco el medio líquido LB sin inocular. Los valores se graficaron y se obtuvieron las curvas de crecimiento.

### **5.7. Ensayo de actividad proteolítica**

En este ensayo se utilizó un medio LB-leche, usado para la selección de microorganismos productores de proteasas. Su preparación se describe a continuación:

1. En un frasco con rosca, se disolvió 2 g de leche descremada en polvo en 10 mL de agua destilada.
2. En otro frasco, se preparó una suspensión de 1.3 g de agar en 90 mL de medio LB.
3. Se esterilizo en recipientes separados utilizando una autoclave a 121 °C durante 15 minutos.
4. Se dejaron enfriar y cuando tuvieron una temperatura aproximada de 60 °C, se mezclaron.
5. El medio LB-leche se distribuyó en las placas de Petri estériles.
6. Se inoculan las bacterias en estas placas y se incuban a 35 °C por 24 horas
7. Para una mayor apreciación de la degradación del contenido proteico en el agar, las cajas con las bacterias fueron teñidas con azul de comassie.

### **5.8 Ensayo de actividad proteolítica en gel SDS-PAGE gelatina desnaturalizante**

Se preparó un gel de poliacrilamida al 12%. Este gel se compone primero de un gel fraccionado el cual se prepara según las especificaciones de la tabla 5.2, el persulfato de amonio y el TEMED se agregan al final, ya que son los agentes que catalizan la polimerización. Se agregó el volumen necesario al molde y enseguida 1 mL de isopropanol, esto se deja reposar durante 15 minutos.

Tabla 5.2. Gel de fraccionado

Reactivo	Volumen
Acrilamida-Bis al 30%	2 mL
Agua	1.2 mL
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.25 mL
Gelatina 1% (en agua)	0.5 mL
SDS (10%)	50 $\mu$ L
Persulfato de Amonio (10%)	40 $\mu$ L
TEMED	30 $\mu$ L

Pasado los 15 minutos se retiró el isopropanol y con ayuda de un filtro se secó el molde sin tocar el gel, se puede agregar agua si hay un excedente de gel o pequeñas imperfecciones que el agua ayudara a quitar; posteriormente se agregó al molde el gel de apilamiento descrito en la tabla 5.3, se colocó el peine para hacer el molde de los pocillos donde se cargan las muestras; se dejó reposar 30 minutos para que polimerice y se retiro el peine.

Tabla 5.3 Gel de Apilamiento

Reactivo	Volumen
Acrilamida-Bis al 30%	0.65 mL
Agua	2.82 mL
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.25 mL
SDS (10%)	50 $\mu$ L
Persulfato de Amonio (10%)	40 $\mu$ L
TEMED	30 $\mu$ L

Para cargar las muestras primero en un microtubo se mezcló 20  $\mu$ L del extracto libre de células de las cepas bacterianas de estudio previamente filtrado con filtros Millipore® de 0.22 micras con el amortiguador de carga laemmli 4X para obtener una concentración de 1X del amortiguador. Las mezclas muestra-laemmli se dejaron incubando a temperatura ambiente por 30 minutos.

Las muestras se encargaron en la cámara electroforética y esta se llenó se llena con el amortiguador de corrida Tris-glicina-SDS 1X (tabla 5.4). Las condiciones del fraccionamiento de las proteínas es 95 volts durante 2 horas aproximadamente o hasta que el azul de bromofenol se vea en la parte inferior de la cámara.

Terminado el fraccionamiento se separó el gel de la cámara electroforética y se coloca en un recipiente, se adicionó amortiguador de acetato de sodio 100 mM pH 5 (98 mL) y Triton X100 (2 mL) se dejó incubando a 37 °C toda la noche con agitación. Al día siguiente se retiró el amortiguador y el gel fue teñido con azul de commasie R250 toda

la noche o se mete al microondas por intervalos de 2 minutos con 5 repeticiones. Se retiró el tinte y se lavó con agua destilada. La aparición de zonas blancas en el gel indicé hidrólisis de la gelatina por acción proteolítica.

Tabla 5.4 Buffer de corrida Tris-glicina-SDS (10X)

Reactivo	Concentración
Tris base	30.3 g
Glicina	144 g
SDS	10 g
Aforar con agua a	1 litro

### 5.9 Determinar la capacidad antifúngica de los sobrenadantes parcialmente purificados

Se realizaron cultivos líquidos bacterianos en matraces que contenían 50mL de medio MRS, se incubaron a 35 °C y agitación continua a 250 rpm utilizando una incubadora con agitación marca IKA KS 4000i control. Después de 72 horas las muestras fueron centrifugadas en una centrifuga marca eppendorf a 4 000 rpm durante 20 minutos a 4°C para obtener un extracto libre de células, el sobrenadante fue transferido a un tubo limpio. El extracto libre de células fue filtrado con filtros Millipore de 0.22 micras. Se tomó 10 mL (extracto crudo) y se guardó para su posterior uso a -20 °C.

El extracto restante se ultrafiltró utilizando centrifugal filter units de 10 kD y una centrifuga marca eppendorf a 4°C, 6500 rpm durante 20 minutos. Con esto se obtienen dos fracciones una con compuestos mayores a 10 kD, y otra fracción con compuestos menores a 10 kD; además del extracto libre de células.

El ensayo *in vitro* se realizó colocando 3 círculos de papel de aproximadamente 0.5 cm de diámetro en la orilla de una caja Petri con medio PDA dejando aproximadamente el mismo espacio entre los discos, posteriormente sobre los discos se unoculó 20 µL del extracto crudo (EC); extracto mayor a 10 kD (>10 kD); extracto menor a 10 kD (<10 kD) al centro se inoculó al fitopatógeno correspondiente. Se incubaron durante 6 días a 28°C.

#### **5.10 Evaluación *in planta* el antagonismo de las bacterias.**

Se utilizaron plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*), obtenidas del vivero certificado "Barbosa" ubicado en Muna, Yucatán, México, de aproximadamente 1 mes de edad. Se asperjó 2 mL de medio, caldo bacteriano ajustado a escala McFarland y extracto >10 kD (F-EF), de cada una de las cepas de estudio. Se inoculó 1 cm de diámetro de micelio de los fitopatógenos en el tallo de la planta.

Como controles se utilizaron la planta sin tratamiento (S/T); planta asperjada con *B. amyloliquefaciens* (B); Planta infectada con *P. capsici* (F); asperjada con el extracto >10 kD (EF). Las plantas infectadas con *P. capsici* recibieron diferentes tratamientos primero se asperjó con medio LB (F-M); otra con *B. amyloliquefaciens* (F-CB); además de planta infectada con *P. capsici* y asperjada el extracto >10 kD (F-EF).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Evaluación antagónica

#### Medición de la inhibición radial a 6 días de incubación.

El estudio de la evaluación antagónica *in vitro* se realizó utilizando 14 bacterias BAL aisladas del kéfir y 4 fitopatógenos mencionados anteriormente. Esta evaluación se llevó a cabo a 6 y 11 días después de la inoculación. Se cuantificó el porcentaje de inhibición de la bacteria frente al hongo en comparación con el hongo control específico. Los resultados se observan en la figura 6.1.

Las 14 cepas probadas inhibieron significativamente el crecimiento del micelio, mostrando un rango de inhibición radial del 17% al 83% en comparación con el control. A pesar que, en este estudio se evaluaron 2 fitopatógenos de la misma especie, el comportamiento de éstos frente a las cepas bacterianas fue distinto, esto se puede apreciar en la figura 6.1, ya que la cepa 11 presentó la mayor reducción del crecimiento de *Fusarium equiseti* 62%; mientras que la cepa 7 redujo un 65% de *Fusarium solani*. La cepa 9 redujo en mayor medida el crecimiento de 2 fitopatógenos *Curvularia sp.* en un 62% y *P. capsici* siendo este el más sensible a la exposición con la cepa ya que obtuvo el porcentaje más alto de inhibición 83%.

Existen reportes de evaluaciones de antagonismo con aislamientos de *Bacillus firmus* y *Trichoderma harzianum* que se utilizan como antagonistas contra *P. capsici* en jitomate y chile; en el cultivo de jitomate se evaluaron tres cepas de *B. firmus* y ninguna redujo la incidencia o severidad inducida por *P. capsici* ([Lagunas-Lagunas et al., 2001](#)); en el cultivo de chile, cepas de *T. harzianum* apenas redujeron un 22% la incidencia por *P. capsici* en el suelo, en comparación con los testigos ([Ezziymani et al., 2004](#)); y siempre que se utilizó el producto biológico comercial T-22® a base de *T. harzianum*, no proporcionó protección contra *P. capsici* en plantas de jitomate (Fernández-Herrera et al., 2007). Por lo anterior podemos concluir que la cepa 9 mostró ser más eficiente en el control de *P. capsici*. Este resultado es alentador debido a la incidencia y la

severidad de la enfermedad han aumentado de manera significativa en las últimas décadas, así como el impacto de la pérdida de cultivos, debido a la alta recombinación sexual en poblaciones de campo y a los mecanismos básicos de virulencia del patógeno ([Lamour et al., 2012](#)).

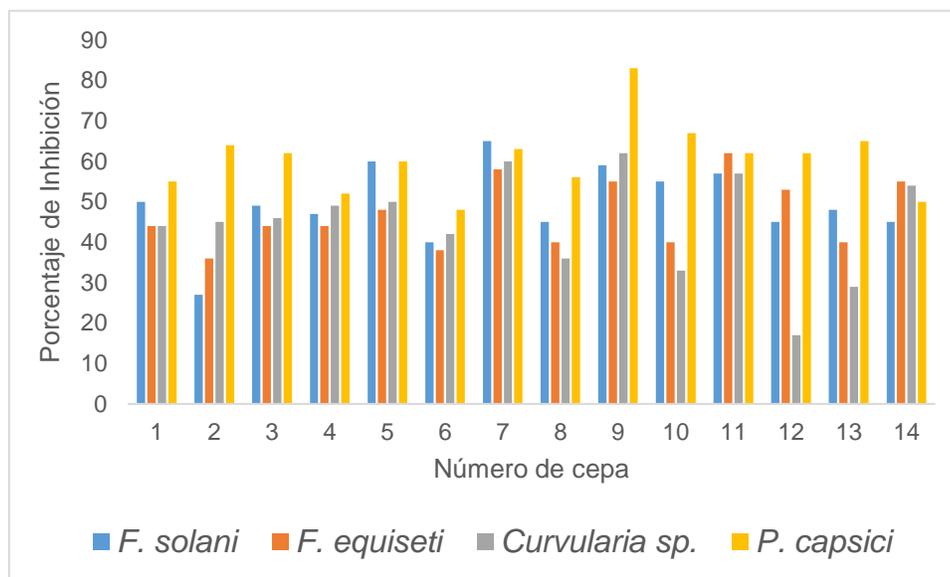


Figura 6.1 Porcentajes de inhibiciones radiales de los fitopatógenos frente a las diferentes cepas bacterianas.

Diversos estudios han comprobado la efectividad del uso de microorganismos para el control de estos fitopatógenos, Verma *et al* en 2018 evaluaron nueve aislados bacterianos frente a *Fusarium oxysporum* el cual causa podredumbre durante la germinación de diferentes especies de plantas de arroz. En experimentos de cocultivo, la cepa SY1 (*Pseudomonas sp.*) inhibió fuertemente a los patógenos fúngicos con 85.71% de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum*, 86.33% de inhibición del crecimiento de *Curvularia sp.* (Verna *et al.*, 2018).

El biocontrol es una alternativa que ha sido estudiada desde hace tiempo esta tendencia nos permite comparar los resultados obtenidos con los de otros autores en la búsqueda de nuevas alternativas que sean más eficientes.

### Medición de la inhibición radial a los 11 días de incubación

En la figura 6.2 se presenta el ensayo antagónico después de 11 días de incubación. Se observó que algunas cepas, aunque no tenían los mayores porcentajes de inhibición, mantenían dicha actividad por mayor tiempo. Estas bacterias son las identificadas con el número 1, 4 y 5. Estas cepas fueron efectivas para la inhibición de los fitopatógenos analizados en este estudio.

En la figura 6.2 (A) se observa a *Curvularia sp.* frente a las cepas 5; 6.2 (B) *P. capsici* frente a la cepa 1; (C) *F. equiseti* frente a la cepa 4. En los tres casos se observó un halo de inhibición, posiblemente porque las bacterias secretan metabolitos que se difunden en el medio y por algún mecanismo detienen el crecimiento del fitopatógeno. Muy diferente a lo que se observó en otros ensayos donde la bacteria y el fitopatógeno tienen mayor acercamiento.

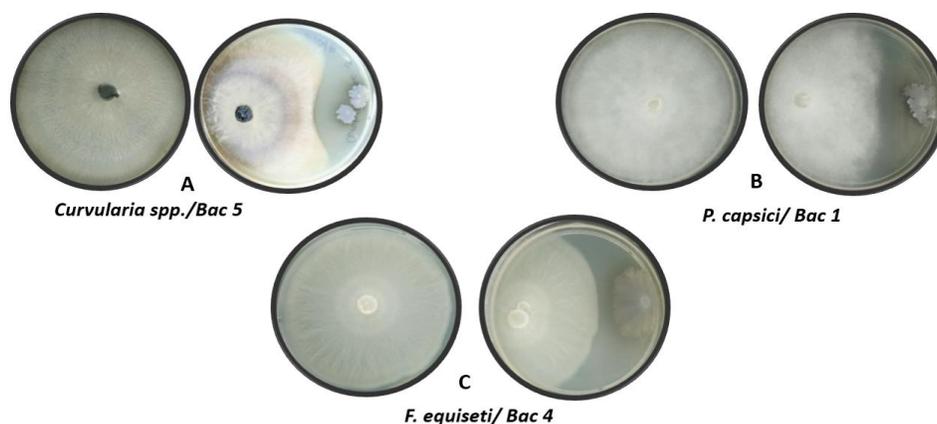


Figura 6.2 Evaluación del antagonismo a los 11 días de incubación. A) *Curvularia sp.* frente a la cepa 5; B) *P. capsici* frente a la cepa 1; C) *F. equiseti* frente a la cepa 4.

## 6.2 Medición del pH.

Se tiene registro que las bacterias ácido lácticas son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos por medio de la secreción de ácidos orgánicos como: el ácido láctico, acético. Los ácidos orgánicos producidos, con una reducción en el pH, se consideran como el principal agente inhibidor del crecimiento de microorganismos contaminantes en los alimentos fermentados ([Carrasco et al., 2002](#)).

En la imagen 6.3 se se presentan los valores de pH del espacio entre el micelio de los fitopatógenos y las bacterias antagónicas, las placas control que contenían a los fitopatógenos tienen un pH de 7, esto si se compara con los pH de aquellos que estaban frente a otras bacterias se observa que en algunos pocos casos se mantuvo el pH, mientras que en la mayoría hubo un descenso del pH de hasta 5, tal es el caso de *P. capsici* frente a las cepas bacterianas de la 5 hasta la 12; por el contrario, en otros casos principalmente *F. equiseti* frente a las cepas 1, 2, 3, 4 7, 8 el pH subió a 8. El descenso del pH podría deberse a la producción de ácidos y estos pudieran intervenir en la reducción del crecimiento micelar.

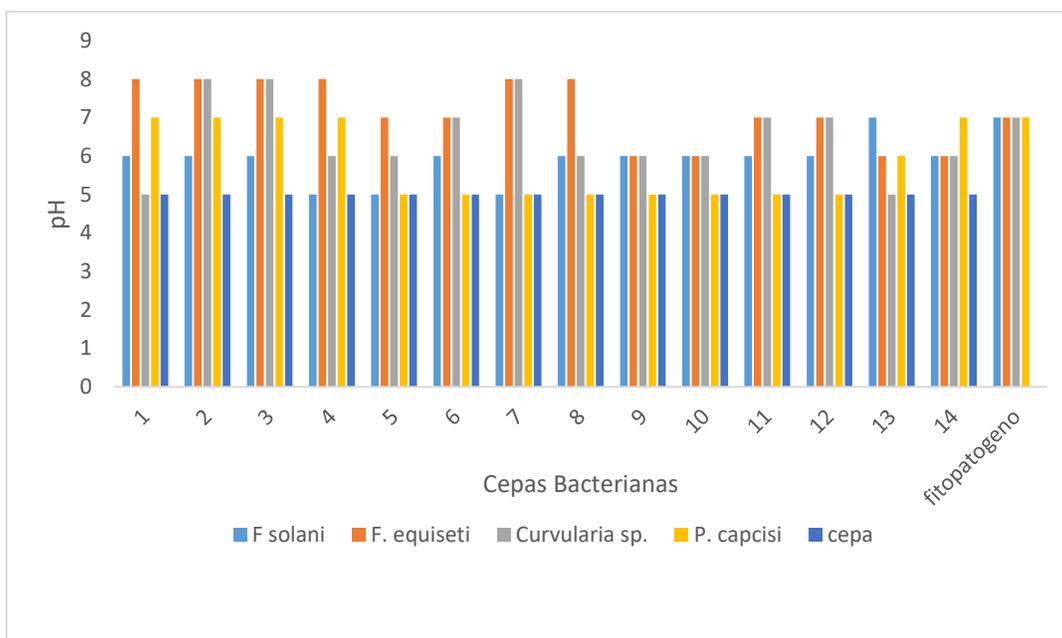


Figura 2.3 pH del medio de los hongos frente a las cepas bacterianas.

### 6.3 Secuenciación e identificación de microorganismos aislados del consorcio microbiano.

Se amplificó la región comprendida del 27 al 1512 del gen 16S ribosomal, los resultados se observan en la figura 6.4, en el gel de Agarosa al 2% teñido con Bromuro de etidio, se utilizó un marcado de peso molecular de 2000 pb (Carril M) para saber el tamaño del fragmento obtenido. Como control negativo los reactivos de PCR sin muestra (carril CN). Con esto se determinó que los fragmentos (carriles de A al F) tenían un tamaño aproximado de 1600 pb.

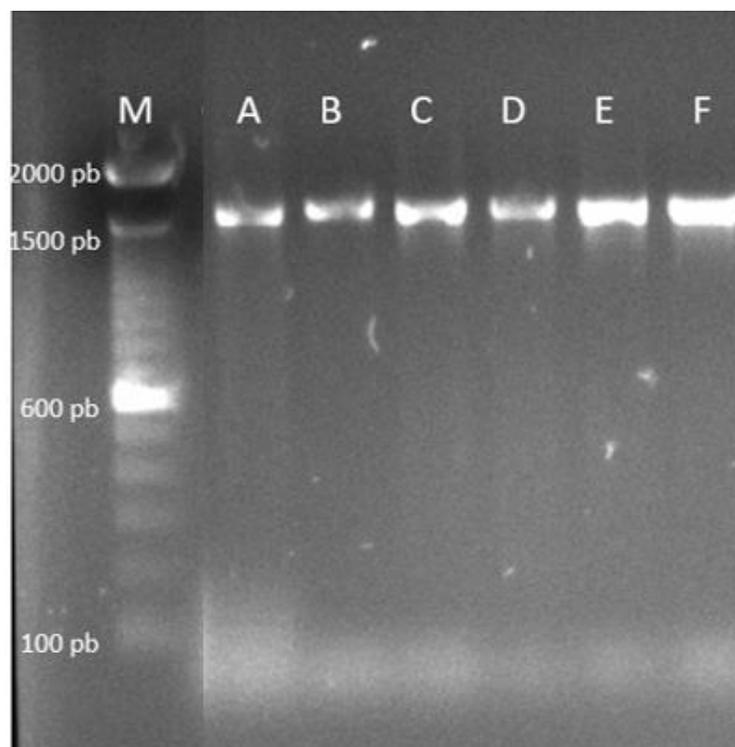


Figura 6.4 Electroforesis de los productos de PCR en gel de agarosa al 2% teñidas con bromuro de etidio 10mg/mL. Marcador de peso molecular 100 pb (carril M), cepas con su respectiva identificación numérica 1, 4 ,5, 7, 9, 11 (Carril del A al F).

Los productos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) purificados fueron enviados a secuenciar al instituto de biotecnología de la Universidad Autónoma de Cuernavaca (IBT-UNAM). Una vez obtenidas las secuencias se realizó un BLAST para su posterior comparación en el GenBank del NCB I, obteniendo la identidad de los microorganismos con los cuales se realizó el ensayo de antagonismo. La identidad de las bacterias se muestra en la tabla 6.1. A pesar que en el gel de agarosa se observa el producto de PCR de la bacteria 4, la secuenciación no fue exitosa, ésto posiblemente por una degradación en el traslado de los productos.

Tabla 6.1 Identificación de microorganismos mediante secuenciación y comparación en el GenBank.

Denominación	Microorganismo	E value	Identidad
Bac 1	<i>Bacillus toyonensis</i>	6e-28	84%
Bac 4	-----	-----	-----
Bac 5	<i>Bacillus methylotopicus</i>	9e-81	67%
Bac 7	<i>Lactobacillus jensenii</i>	1e-9	36%
Bac 9	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	2e-56	65%
Bac 11	<i>Bacillus endofíticos</i>	7e-70	65%

De las 6 cepas identificadas, 5 corresponden al género *Bacillus* y una al *Lactobacillus*, de esta última hasta el momento no se han encontrado reportes de su uso como agente biocontrol de fitopatógenos, sin embargo, Lee *et al.* en el 2017 reportaron su uso para combatir la vaginosis en mujeres coreanas. Sin embargo, se ha utilizado otra cepa del mismo género *Lactobacillus plantarum* en el 2018 por Quattrini *et al.*, quienes estudiaron 25 cepas de *Lactobacillus plantarum* aisladas de cereales y productos a base de leche. Las cepas probadas tuvieron la capacidad para inhibir los fitopatógenos relacionados con cereales como *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Fusarium verticillioides*. Además, se detectó una reducción moderada de la biodisponibilidad de aflatoxina AFB1. La cepa de *L. plantarum* seleccionada ITEM 17215, mostró una fuerte

capacidad inhibidora para el crecimiento fúngico y fue capaz de producir 1,2-dihidroxibenceno, ácido benzoico, ácido p-hidroxifeniláctico y ácido 3-feniláctico. El último compuesto, ya descrito como inhibidor antifúngico eficiente, fue el más abundante.

[Beibei et al. en 2016](#) reportaron que *Bacillus methylotrophicus* Strain NKG-1, fue capaz de suprimir el crecimiento micelial y la germinación conidial de numerosos hongos patógenos entre ellos *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum lagenarium*, *Gloeosporium capsici*, *Alternaria alternate*, *Botryosphaeria dothidea*, y *Phyllosticta ampelicide* de plantas en medios sólidos. Un experimento de invernadero mostró que la aplicación del caldo de fermentación NKG-1 antes de la inoculación de *Botrytis cinerea*, la causa del moho gris del tomate inhibió el crecimiento del moho en un 60%.

Por otra parte en el 2016 [Lin et al.](#) estudiaron a *Bacillus amyloliquefaciens*, la cual produce endosporas, lo que resulta en una larga vida útil (2 años), una característica deseable para un agente de control biológico. Puede secretar muchos metabolitos secundarios, incluidos lipopéptidos (surfactina, iturina y fengycina), policétidos (macrolactina, bacilaeno y difficidina) y volátiles (acetoína/2,3-butanodiol), que pueden suprimir directamente el crecimiento de patógenos de plantas o provocar resistencia sistémica inducida (ISR) del huésped de la planta.

#### **6.4 Evaluación de compuestos volátiles sobre la inhibición de fitopatógenos.**

Se sabe que los ácidos grasos poseen actividad antibacteriana, antipalúdica y antifúngica. El desarrollo de la resistencia de microbios, incluidos los hongos y las levaduras, hacia los agentes antimicrobianos que ya están en uso, exige la búsqueda de alternativas antimicrobianos, que incluyen ácidos grasos y sus derivados (por ejemplo, ácidos grasos metilados e hidroxilados). Aunque los ácidos grasos pueden no ser tan efectivos como los fungicidas químicos, presentan menos riesgos ambientales. No son solo biodegradables, sino exhiben un alto grado de especificidad. Además, los ácidos grasos son aditivos alimentarios aceptados y, lo más importante,

hongos patógenos son menos propensos a volverse resistentes a los ácidos grasos antifúngicos. El objetivo más importante de los ácidos grasos antifúngicos es la célula membrana. Causan un aumento en la fluidez de la membrana, que dará lugar a la fuga de los componentes intracelulares y muerte celular ([Pohl et al 2015](#))

Pasados los 6 días de incubación de las bacterias y hongos en el ensayo de doble placa se observaron los crecimientos miceliales de los hongos frente a las bacterias, y se compararon con los controles. La inhibición por producción de compuestos volátiles fue determinada en base en la disminución/inhibición del crecimiento radial del hongo. Se observa que los compuestos volátiles producidos por *Bacillus endophyticus* reducen el crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* en un 60% (figura 6.4). Los compuestos volátiles atrapados entre las cajas se extrajeron con la ayuda de una jeringa de micro-extracción, esto fue inyectado en un GC-MS, el cromatograma se muestra en la figura 6.5, en el cual se observan claramente 14 picos

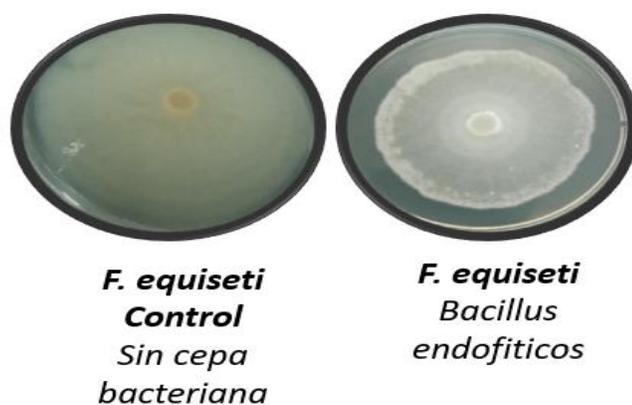


Figura 6.4. Fotografía de *F. equiseti* del ensayo de doble placa. Izquierda: control negativo sin cepa bacteriana; derecha: *F. equiseti* frente a *Bacillus endofiticos*, se aprecia como la acción de los compuestos volátiles.

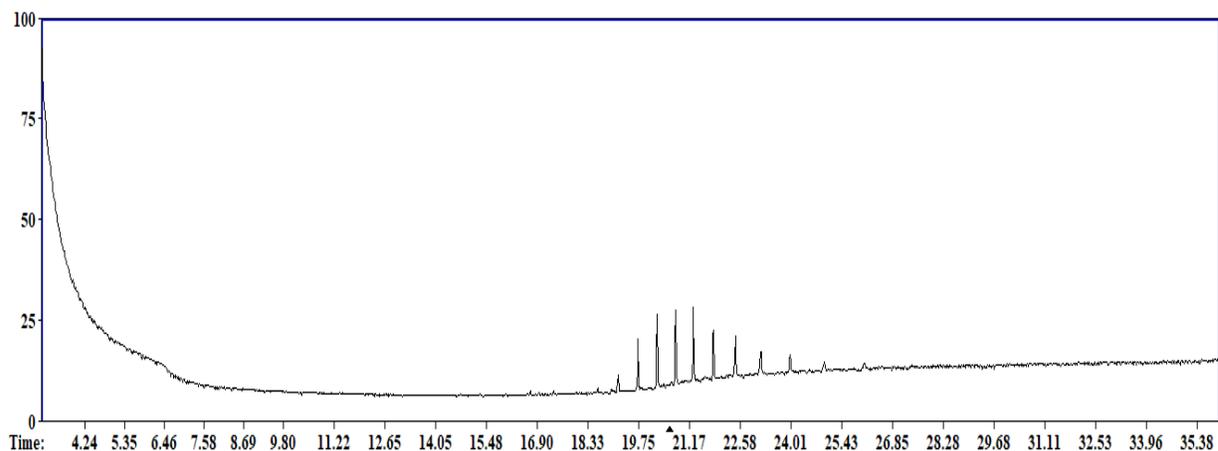


Figura 6.5. Cromatograma de los compuestos volátiles producidos en el ensayo de *Bacillus endophyticus* frente a *Fusarium equiseti*

El cromatograma (figura 6.5) fue analizado con el programa AMDIS analysis, de acuerdo a la biblioteca del software los compuestos extraídos de la caja ensayo (hongo frente a bacteria), posiblemente en su mayoría secretados por *Bacillus endophyticus*, ya se habían reportado anteriormente como antagonistas por [Tenorio-Salgado et al \(2013\)](#) identificó compuestos volátiles presentes durante la inhibición de *Fusarium coluorum*, *F. oxysporum* utilizando a *Burkholderia tropica* como antagonista. Entre ellos se encuentran el xileno, tolueno y nonano. Además, se encontró ácido undecanoico que ha sido reportado por [Liu et al \(2008\)](#), como un efectivo antifúngico contra *Alternaria solani Cucumerinum lagenarium* y *Fusarium oxysporum*, esto nos hace suponer que este ácido pudiera ser el agente principal de la inhibición hacia *Fusarium equiseti* por parte de *Bacillus endophyticus*. En el cromatograma también se identificó al ácido 2-metil heptanoico, también conocido como ácido enántico del cual se han elaborado reportes de este ácido como un indicador de la presencia de hongos, por lo que se deduce que este es un compuesto producido por el hongo como método de defensa y que hay una serie de señalizaciones entre ambos microorganismos.

En otro reporte se concluyó que los compuestos volátiles orgánicos producidos por *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 redujeron el crecimiento micelial y la germinación de las esporas de *F. oxysporum* de 30% a 40% en comparación con las placas de control. Los antibióticos no volátiles, incluidos los lipopéptidos, tienen fuertes actividades antifúngicas ([Kim, 2004](#)). Sin embargo, estos antibióticos no volátiles no pueden propagarse a grandes distancias, y solo cuando estos antagonistas colonizan directamente las raíces de las plantas pueden evitar que los hongos patógenos infecten a las plantas. En contraste, los compuestos orgánicos volátiles pueden extenderse a gran distancia, y existen microambientes fungistáticos alrededor de las comunidades antagonistas. Además, los VOC antifúngicos producidos por bacterias pueden matar las esporas supervivientes en el suelo y limitar tanto la producción como el establecimiento de la enfermedad ([Fernando et al., 2005](#)).

Tabla 6.3 Compuestos volátiles detectados en el ensayo de *Bacillus endophyticus* frente a *Fusarium equiseti* se numeran en esta tabla

1	Tolueno
2	Xileno
3	3- metilpentano
4	Undecano
5	Hepadecano
6	3-Metil catecol
7	Tetrahidroxitronel
8	Acido 2-metil heptanoico
9	Ácido undecanoico
10	Eicosano
11	Nonano

12	Henecoisano
13	Pentadecano
14	Octacosano

### **6.5 Establecimiento de la cinética de crecimiento de las cepas de estudio.**

Diferentes autores indican que la fase de crecimiento de una cepa bacteriana está directamente relacionada con la producción de metabolitos. Tal es el caso de las bacteriocinas que se ha reportado que son sintetizadas en la fase logarítmica de crecimiento. Mientras que los metabolitos secundarios como los antibióticos son secretados en la fase estacionaria. Por todo lo anterior mencionado se realizó las cinéticas de crecimiento de las cepas antagónicas para reconocer los tiempos en que estas cepas llegan a sus diferentes fases, por todo lo anterior mencionado.

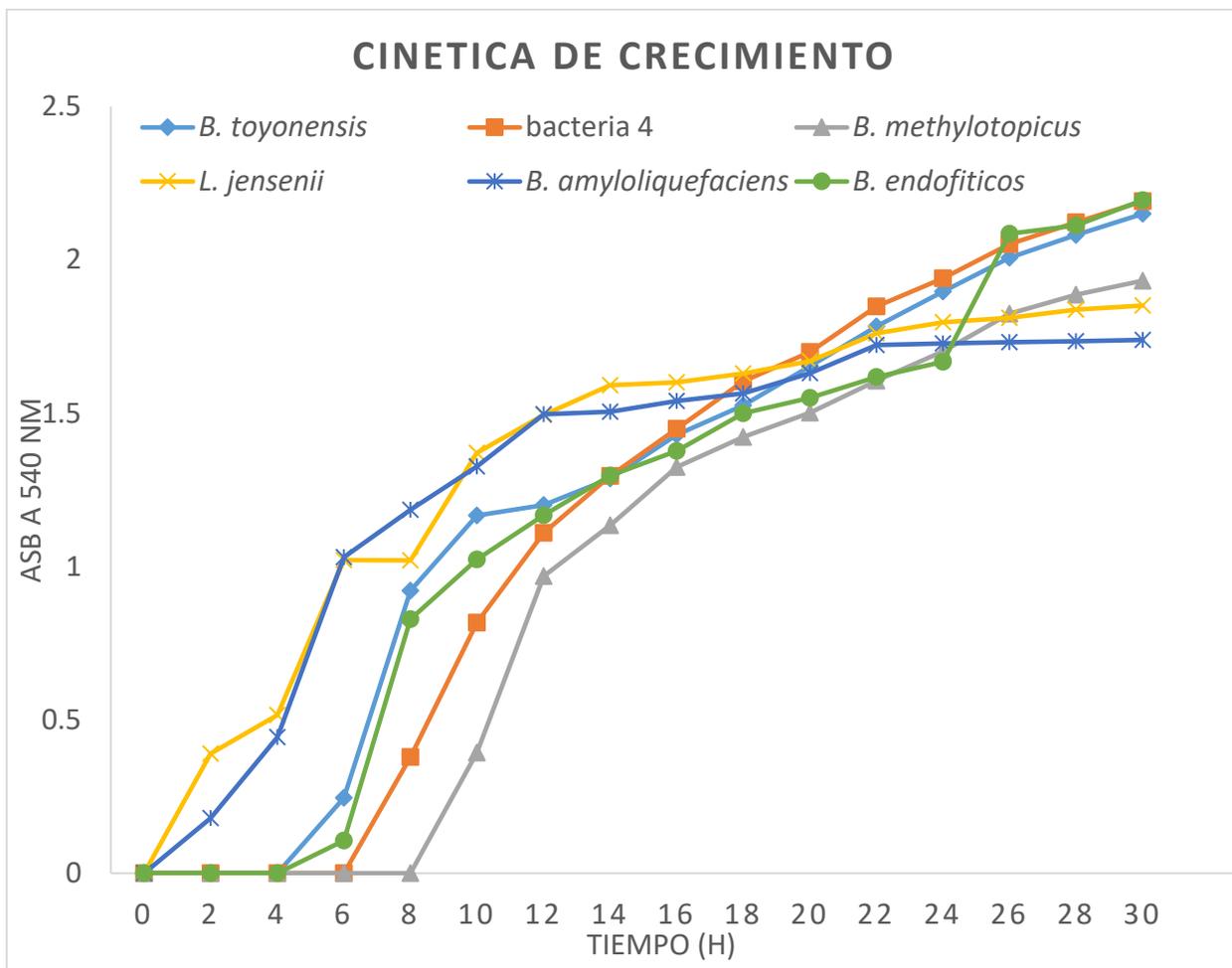


Figura 6.6 Cinética de crecimiento de las cepas antagónicas en medio LB a 35°C durante 30 horas de crecimiento

En la figura 6.6 Se muestra la cinética de crecimiento de las cepas donde se puede observar una diferencia de las fases de adaptación que va desde el tiempo 0 hasta el tiempo 8, empezando la fase logarítmica de las 4 hasta las 10 horas aproximadamente, se determina que todas coinciden con el inicio de la fase estacionaria a las 12 horas.

## 6.6 Ensayo de actividad proteolítica

### Ensayo de Actividad proteolítica en medio LB-leche

Numerosos estudios mostraron que las especies del género *Bacillus* se caracterizan por producción de proteasas. Las bacterias del género *Bacillus* pueden tener diferentes mecanismos cuando se usan como agentes de control biológico para controlar enfermedades y promover el crecimiento de las plantas. Las enzimas antifúngicas, que incluyen quitinasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa y proteasa, desempeñan papeles importantes en la supresión del crecimiento de hongos fitopatógenos. [Rodas et al \(2011\)](#) concluyó que *Bacillus pumillus* ATCC7061 fue la cepa bacteriana más potente para la producción de enzimas.

En la figura 6.6 se muestran las fotografías las cajas en medio LB—leche teñidas con azul de comassie, en después de 24 horas de inoculación se observan halos alrededor del crecimiento bacteriano, esto producido por hidrólisis de la proteína de la leche por acción de las proteasas secretadas por las cepas. Todas las cepas mostraron diferentes grados de proteólisis. Según lo observado se puede concluir que la *Bacillus methylotopicus* presentó el mayor halo de inhibición, lo que esta directamente relacionado con la producción enzimática.

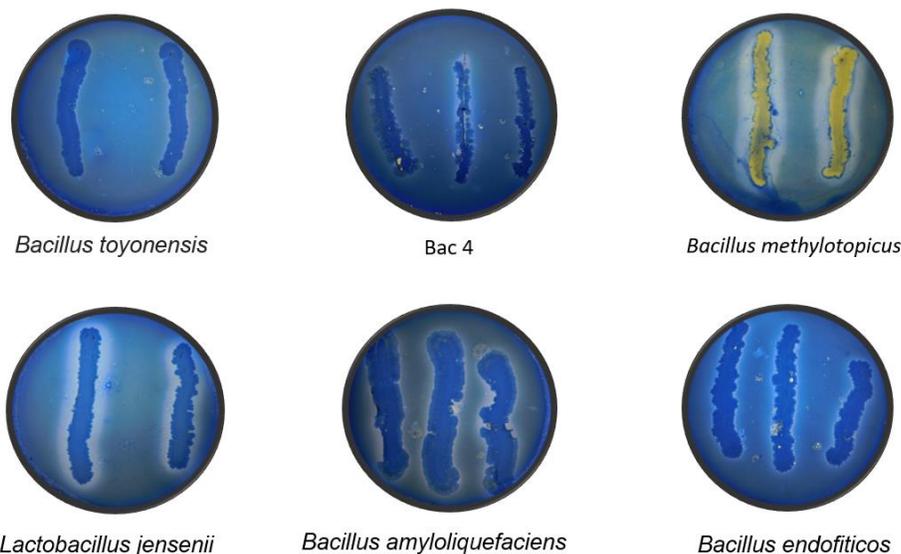


Figura 6.6. Cajas de medio LB-leche inoculadas con las bacterias antagónicas. Las cajas fueron teñidas con azul de Commasie

En otro estudio realizado por Li *et al* (2016) de *B. amyloliquefaciens* SYBC H47 podría formar una zona de limpieza al hidrolizar la leche desnatada y la quitina, lo que indica que es positiva para proteasa, quitinasa y. Es bien sabido que la solubilización de IAA, sideróforo y fosfato puede promover el crecimiento de las plantas. Los niveles de producción de IAA y sideróforos en *B. amyloliquefaciens* SYBC H47 fueron positivos.

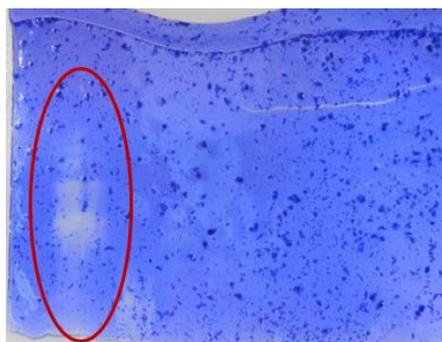


Figura 6.7 Gel de poliacrilamida al 12% y gelatina desnaturalizante

### **Ensayo de actividad proteolítica en gel SDS-PAGE gelatina desnaturalizante**

Esta técnica permite separar mezclas complejas de polipéptidos en función de su tamaño molecular. La electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sodico (SDS-PAGE). El dodecil sulfato sódico es un detergente que, con otros agentes, como el  $\beta$ -mercaptoetanol y el calor, interviene en la desnaturalización de las proteínas a subunidades y. además, proporciona a las cadenas polipeptídicas una densidad de carga similar. De esta forma cuando el complejo SDS-proteína se somete a electroforesis en un gel que contiene SDS, su velocidad de migración viene determinada principalmente por la masa de la partícula SDS-polipéptido según el

principio de exclusión molecular. El campo eléctrico, en este caso, sólo suministra la fuerza impulsora. Aunque la técnica aun no la domino y falta mejorar el ensayo se puede apreciar en la figura bandas decoloradas lo que indica la actividad proteolítica.

## 6.7 Evaluación del extracto crudo y fraccionado

En la figura 6.8 se muestra el ensayo *in vitro* de los extractos libres de células y los extractos fraccionados y concentrados de 4 cepas frente a 3 fitopatógenos, 5 días después de la inoculación de inoculación; teniendo la fracción mayor a 10kD la capacidad en todos los ensayos. Ninguno de los extractos a diferentes tiempos de las cepas antagonicas de *F. equiseti* tuvieron actividad antagonica, esto posiblemente debido a que la inhibición esta dada por competencia de nutrientes y espacio, o el volumen utilizado en el ensayo tenia una baja concentración de componentes con potencial antagonico. En la figura 6.8A se muestra a *Curvularia sp.* frente a los extractos a 60 horas después de la inoculación: extracto crudo (EC), fracción del extracto crudo con componentes mayores a 10 kD (EC >10 kD) y fracción del extracto crudo con componentes menores a 10 kD (EC <10 kD) tanto de *Bacillus methylotopicus* como *Bacillus amyloliquefaciens*, la fracción >10 kD ejerce un efecto negativo en el crecimiento de *Curvularia sp.* inhibiendo su crecimiento en un 75% y 25%. *P. capsici* fue inhibido en un 72% por el extracto mayor a 10 kD de *B. amyloliquefaciens*.

*Fusarium equiseti* presento una reducción del crecimiento frentes al extracto crudo y la fracción que contiene metabolitos mayores a 10 kD (*Lactobacillus jensenii*), en un 33% y 40% respectivamente (figura 6.8C)

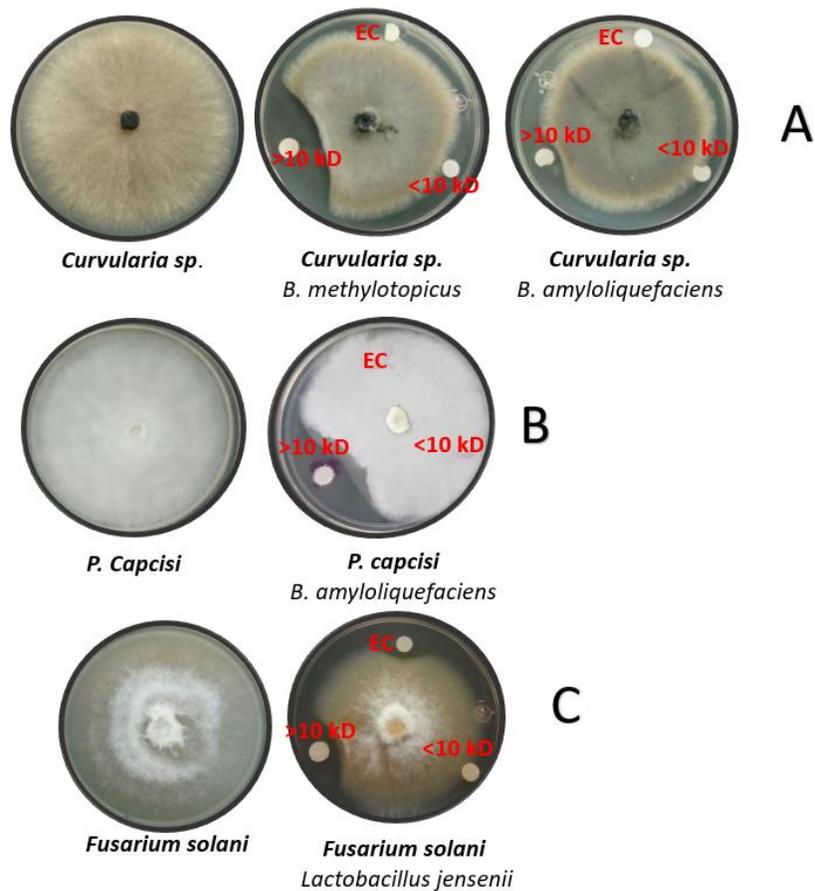


Figura 6.8. Imagen del ensayo realizado con tres fitopatógenos *Curvularia sp* (A), *P. capsici* y *F. solani* (C); frente al extracto crudo (EC), fracción del extracto crudo con componentes mayores a 10 kD (EC >10 kD) y fracción del extracto crudo con componentes menores a 10 kD (EC <10 kD).

En un ensayo en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 15% (figura 6.9) teñido con azul de comassie, se analizaron los extractos libres de células de las 6 cepas de estudio a las 10 horas después de su inoculación (fase logarítmica) y se observan en los carriles A, B, C, E, F, G diferentes perfiles proteicos los cuales posteriormente serán fraccionados y analizados por separado para determinar cual de ellos es responsable de la actividad.

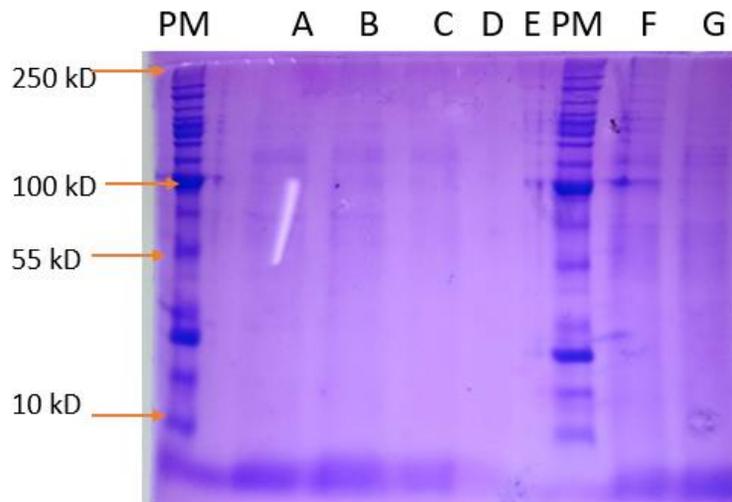


Figura 6.9 Perfil proteico de extractos libres de células de las cepas *Bacillus toyonensis* (A), Cepa 4 (B), *Bacillus methylotopicus* (C), *Lactobacillus jensenii* (E), *Bacillus amyloliquefaciens* (F), *Bacillus endofíticos* (G). marcador de peso molecular (PM); Control negativo (D).

### 6.8 Evaluación Antagónica *in planta*.

Se realizó un ensayo en el cual se usaron plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*) para observar la reacción de la planta cuando ésta interactuaba con los microorganismos de estudio. Aunque el ensayo se realizó con todos los fitopatógenos la infección no fue éxitos para el resto. Se tiene evidencia que *P. capsici* tiene la capacidad al infectar a *Capsicum chinense*, a los 12 días después de la inoculación se percibieron los primeros signos de necrosis en la planta para el día 20 la planta estaba completamente necrosada. Del lado izquierdo de la figura 6.10 se muestrala planta sin tratamiento (S/T); seguida de la planta asperjada con *Bacillus amyloliquefaciens* (B); posteriormente se observan dos muestras necrosadas una de ellas infectada con *P. capsici* (F) y la otra infectada con *P. capsici* y asperjada con medio LB (F-M); seguida de las plantas tratadas con caldo bacteriano de *B. amyloliquefaciens* e infectada con *P. capsici* (F-CB); también se asperjó la planta con el extracto fraccionado >10 kD que

se obtuvo de la fermentación de *B. amyloliquefaciens* (EF) e infectada con *P. capsici* (F-EF).

Las plantas infectadas con *P. capsici* y no recibieron ningún tratamiento ya sea con el caldo bacteriano o la fracción libre de células de *B. amyloliquefaciens* sufrieron necrosis y una reducción en el desarrollo de las raíces esto respecto a la planta control (S/T); se puede concluir que el medio de cultivo no le confiere ningún tipo de protección; por otra parte, las plantas infectadas con el fitopatógeno y tratadas con *B. amyloliquefaciens* y el extracto >10 kD obtenido de este antagonista no mostraron efecto fenotípico negativo respecto a la planta control. Se asperjaron plantas *B. amyloliquefaciens* y el extracto >10 kD, esto para determinar que el antagonista no sea patógeno para *Capsicum chinense*, sin embargo, se observa que estos no provocaron ningún efecto negativo comparación con la planta control.



Figura 6.102. Plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*) 20 días después de ser asperjadas. Planta sin tratamiento (S/T); planta asperjada con *B. amyloliquefaciens* (B); Planta infectada con *P. capsici* (F); Planta infectada con *P. capsici* y asperjada con medio LB (F-M); Planta infectada con *P. capsici* y asperjada

con *B. amyloliquefaciens* (F-CB); planta asperjada con el extracto >10 kD (EF);  
Planta infectada con *P. capsici* y asperjada el extracto >10 kD (F-EF).

## 7. CONCLUSIÓN

En este estudio se determinó que las bacterias aisladas de consorcios para la producción de alimento tipo Kéfir, pertenecientes al género *Bacillus* y *Lactobacillus*, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de fitopatógenos: *Fusarium solani*, *Curvularia sp.*, *Fusarium equiseti*, *Phytophthora capsici*. Algunas tuvieron un efecto fungistático, mientras que otras mostraron un efecto fungicida. Su acción posiblemente fue debido a los diferentes metabolitos que se secretaron las bacterias y fueron identificados como los ácidos orgánicos volátiles, enzimas proteolíticas y proteínas, además de su capacidad para competir por el espacio donde habita y los nutrientes disponibles. La ventaja del uso de estas bacterias como agentes antagónicos de organismos fitopatógenos es que al ser aisladas de un consorcio utilizado para la producción de un alimento consumido por los seres humanos éstos no representan un peligro para la salud de quien lo manipule en el campo o de quien consuma el producto final y teniendo como ventaja que no causa un efecto nocivo sobre plantas de *Capsicum chinense*.

## 8. REFERENCIAS

Agrios, G.N. (2005) Plant Pathology. Quinta edición. Academic Press. 803 p.

Aktar, M. W., Sengupta, D., and Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdiscip. Toxicol.* 2, 1–12.

Alamri A, El -Newehy MH, Al -Deyab SS. (2012) Biocidal polymers: synthesis and antimicrobial properties of benzaldehyde derivatives immobilized onto amine-terminated polyacrylonitrile. *Chem. Cent J.*

Andrews JH, Harris RF, Spear RN, Lau GW, Nordheim EV (1994). Morphogenesis and adhesion of *Aureobasidium pullulans*. *Can. J. Microbiol.* 40:6–17.

Arrebola E, Jacobs R, Korsten (2010). Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 108:386–395.

Barchenger D.W, Lamour K.H, Bosland P.W (2018). Challenges and Strategies for Breeding Resistance in *Capsicum annuum* to the Multifarious Pathogen, *Phytophthora capsici*. *Front. Plant Sci.* 9:628.

Barkai-Golan R (2001). Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables: Development and Control. Amsterdam, the Netherlands: Elsevier Sciences.

Barnett HL, Binder FL. (1993). The fungal host –relationship. *Annu Rev Phytopathol.* 11.

Bechinger B. (1997). Structure and function of channel-forming peptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin. *J. Membrane Biol.* 156: 197-211.

Beibei G., Binghua L., Thinn N., Wenjun Z., Liming S., Kecheng Z. (2016) *Bacillus methylotrophicus* Strain NKG-1, Isolated from Changbai Mountain, China, Has Potential Applications as a Biofertilizer or Biocontrol Agent. *PLOS ONE* 11(11):

Bemena LD, Mohamed LA, Fernandes AM, Lee BH (2014) Applications of bacteriocins in food, livestock health and medicine. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 3

Blom D, Fabbri C, Connor EC, Schiestl FP, Klauser DR, Boller T, Eberl L, Weisskopf L. (2011). Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ Microbiol.* 13

Booth V. (1978). *Fusarium equiseti*. In: *IMI description of fungi and bacteria*. CABI Biosciences, Surrey. No. 58, Sheet 571.

Booth, C.1978. *Fusarium equiseti*. In IMI descriptions of fungi and bacteria. CABI Bioscience, Surrey, No. 58. Sheet 571.

Bosch U., Mirocha C.J. (1992). Toxin production by *Fusarium* species from sugar-beets and natural occurrence of zearalenone in beets and beet fiber. *Appl. Environm. Microbiol.* 58: 3233–3239.

Brogden KA. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 238-250

Calvente V, Benuzzi D, De Tosetti MIS (1999). Antagonistic action of siderophores from *Rhodotorula glutinis* upon the postharvest pathogen *Penicillium expansum*. *Int. Biodeterior. Biodegradation.* 43:167–172.

Cardosa R.A., Pires L.T., Zucchi F.D., Zucchi T.M. (2010). Mitotic crossing-over induced by two commercial herbicides in diploid strains of the fungus *Aspergillus nidulans*. See comment in PubMed Commons Below *Genet. Mol. Res.* 9: 231-238.

Carrasco, M.S., Scarincini, H.E. and Simonetta, A.C. (2002). Antibacterial Activity of Lactic Acid bacteria Isolated from Argentinian Dairy Products. *The Australian Journal of Dairy Technology.* Vol. 57.No. 1, 15-19.

Cheèrif M, Benhamou N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma sp.* On *Fusarium oxysporum f sp. radiscis-licopersici*. *Phytopathology.* 83: 1406

- Chen HC, Wang SY, Chen MJ (2008). Microbiological study of lactic acid bacteria in kefir grains by culture-dependent and culture-independent methods. *Food microbiology* 25: 492–501.
- Chimbekujwo IB. (2000). Frequency and pathogenicity of fusarium wilts (*Fusarium solani* and *Fusarium equiseti*) of cotton (*Gossypium hirsutum*) in Adamawa in Nigeria. *Revista de Biología Tropical*. 48, 1–5.
- Chiron N, Michelot D (2005) Odeurs de champignons: chimie et rôle dans les interactions biotiques- une revue. *Cryptogam Mycol* 26: 299–364.
- Chmiel, D. (2001). Mode of action of antimicrobial peptides. *Adv. Cell. Biol.* 16: 261-73
- Cho SJ, Lee SK, Cha BJ, Kim YH, Shin KS. 2003. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin a from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiol. Lett.* 223:47–51.
- Coleman Jeffrey J. (2015). The *Fusarium solani* species complex: ubiquitous pathogens of agricultural importance. *Molecular Plant Pathology*. 14: 146–158.
- Cotter PD, Hill C, Ross RP. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature. Microbiol. Rev.* 3: 777-788.
- Cubillos Hinojosa JG; Páez A, Mejía L (2011). Evaluación de la Capacidad Biocontroladora de *Trichoderma harzianum* Rifai contra *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. Asociado al Complejo “Secadera” en Maracuyá, Bajo Condiciones de Invernadero. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*. Vol. 64, núm, pp. 5821-5830
- Cunha KC da, Sutton DA, Fothergill AW, Gené J, Cano J. (2013). *In vitro* antifungal susceptibility and molecular identity of 99 clinical isolates of the opportunistic fungal genus *Curvularia*. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.* 76: 168–174.
- Darji B., Ratani J., Doshi M., Kothari V. (2012). *In vitro* antimicrobial activity in certain plant products/ seed extracts against selected phytopathogens. *Res. Pharm.* 2, 1–10.

De Costa D.M., Erabadupitiya H.R.U.T. (2005). An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. Post. Biol. Technol. 36.

De Souza JTA., Arnould C, Deulvot C, Lemanceau P, GianinazziPearson V, Raaijmakers JM (2003). Effect of 2, 4-diacetylphloroglucinol on *Pythium*: cellular responses and variation in sensitivity among propagules and species. Phytopathology 93:966–975.

Di Francesco A, Martini C, Mari M (2016). Biological control of postharvest diseases by microbial antagonists: how many mechanisms of action?. Eur. J. Plant Pathol. 145:711–717.

Dimkic I, Zivkovi S, Beri T, Ivanovi Z, Gavrilovi V, Stankovi S, Fira D (2013). Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. Biol. Control. 65:312–321.

Dukare AS, Paul S, Nambi VE, Gupta RK, Singh R, Sharma K, Vishwakarma RK (2018). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. Crit. Rev. Food Sci.Nut.

El-Ghaouth A, Wilson C, Wisniewski M (2004). Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases of fruit and vegetables. In: Diseases of Fruits and Vegetables, Ed. S. A. M. H. Naqvi, Vol. II, 511–535. the Netherlands: Springer.

El-Tarabily KA (2006). Rhizosphere-competent isolates of Streptomycete and non-streptomycete Actinomycetes capable of producing cell-wall degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. Can. J. Bot. 84:211–222.

Endo A., y Dicks LM. (2014). Physiology of the LAB. *In: Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*, 1st edition. Holzapfel WH., Wood BJ (eds.). John Wiley & Sons, New Jersey, USA.

Erwin DC, Ribeiro OK (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. Am. Phytopath. Soc. St. Paul, MN.

Ezziyani Mohammed, Pérez Sánchez Consuelo, Requena María Emilia, Sid Ahmed Ahmed, Candela María Emilia. (2004). Evaluación del biocontrol de *Phytophthora capsici* en pimiento (*Capsicum annuum* L.) por tratamiento con *Burkholderia cepacia*. Anales de Biología. Murcia, España. 8: 61-68.

FAO (2004). Manejo integrado de enfermedades en cultivos Hidroponicos.

Farnworth E (2005) Kefir - A complex probiotic. Food Sci.Technol. Bulletin 2: 1–17.

Feria Caceres, Pedro Felipe. (2007) Aislamiento y caracterización Bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* LPBM10 en suero de leche. Tesis Msc Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias. Medellín - Colombia, pp 84.

Fernández C, Chávez Y. (1999) Aplicación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa para la detección de micoplasmas en cultivos celulares. Rev. Salud. Anim. 18:31-34.

Fernando WGD, Linderman RG. (1995). Inhibition of *Phytophthora vignae* and root rot of cowpea by soil bacteria. Biol. Agric. Hortic. 12:1–14

Fernando WGD, Ramarathnam R, Krishnamoorthy AS, Savchuk SC. (2005). Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. Soil Biol. Biochem. 37:955–964

Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. Nature 484, 186–194. doi: 10.1038/nature10947

Fraile S.L., (1993). Extractos vegetales en el control del tizon temprano de *Alternaria solani* y el tizon tardío de *Phytophthora infestans* en jitomate, en laboratorio, campo y vivero. Tesis de Maestría. Instituto tecnológico Agropecuario No. 23, Oaxaca, Mexico. 106 p.

Gallucci MN, Oliva M, Casero C, Dambolena J, Luna A, Zygadlo J. (2009). Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. Flavour Fragr J 24: 348–354.

Galvez A, Abriouel H, Benomar N, Lucas R (2010). Microbial antagonists to food-borne pathogens and biocontrol. Curr. Opin. Biotechnol. 21:142–148.

Garcia CV (2004). Introducción a la Microbiología. Segunda Edición. Editorial EUNED. Costa Rica. pp 103-107

Granke LL, Quesada-Ocampo L, Lamour K, Hausbeck MK (2012). Advances in research on *Phytophthora capsici* on vegetable crops in the United States. Plant Dis. 96: 1588–1600

Grgurina I, Mariotti F, Fogliano V, Gallo M, Scaloni A, Lacobellis NS, Lo Cantore P, Mannina L, van Axel Castelli L, Graniti A (2002). A new syringopeptin produced by bean strains of *Pseudomonas syringae pv. syringae*. BBA Prot. Struct. Mol. Enzymol. 1597:81–89.

Gutiérrez Ramírez L., Montoya Campuzano O., Ruiz Villadiego S. (2005) Evaluación del potencial Bactericida de los extractos de Bacterias Acido Lácticas Sobre el crecimiento In Vitro de *E.coli*, *Salmonella sp.* y *Listeria monocytogenes*. CENIC Ciencias Biol; (36): 1-6.

Guzel-Seydim ZB, Kok-Tas T, Greene AK, Seydim AC (2011). Review: functional properties of kefir. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 51: 261–268.

Hale D.F, Hancock EW. (2007). Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. Source:Expert Review of Anti-infective Therapy. 5:951-959

Hancock REW, Falla T, Brown M. (1995). Cationic bactericidal peptides. Adv. Microbiol. Physiol. 37: 135-175.

Herrmann A. (2010) The chemistry and biology of volatiles. Wiley, Chichester

Infante D, Martínez B, González N, Reyes Y. (2009). *Trichoderma* mechanisms of action against phytopathogen fungi. Rev. Protección Veg. v.24 n.1.

Jacas Miret Josep Anton, Primitivo Caballero. (2011). El control biológico de plagas y enfermedades. Publicacions de la Universitat. 143.

Jangho-Hyuk, Annsung-Ho, Deokkim Myung, Whakim Chan. (2008) Use of hydrogen peroxide as an effective disinfectant to *Actinobacillus ureae*, Process. Biochem .2008; 43:225-228.

Jin MZ. (1991). Preliminary Study of Discolored Rice Grain Caused by *Curvularia*. Seed Pathol. Microbiol. CAB Abstracts, 2:29-33.

Jurado Miguel, Vázquez Covadonga, Patiño Belèn, González-Jaèn M. Teresa. (2005) PCR detection assays for the trichothecene-producing species *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poae*, *Fusarium equiseti* and *Fusarium sporotrichioides*. Madrid, España. SysT. Appl. Microbiol. 28 562–568.

Kachuei R., M.H. Yadegari, S. Rezaie, A.A. Allameh, N. Safaie, F. Zaini and F.K. Yazdi, (2009). Investigation of stored wheat mycoflora, reporting the *Fusarium* cf. *Langsethiae* in three provinces of Iran during 2009. Ann. Microbiol., 59: 383-390.

Kamysz W, Okruj M, Lukasiak J. (2003). Novel properties of antimicrobial peptides. Acta Biochim. 50: 461-469.

- Kesmen Z, Kacmaz N (2011) Determination of lactic microflora of kefir grains and kefir beverage by using culture-dependent and culture-independent methods. *J. food Sci.* 76: 276–283.
- Kim PI. (2004) Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J. Appl. Microbiol.* 97.
- Knight, S. C., Anthony, V. M., Brady, A. M., Greenland, A. J., Heaney, S. P., Murray, D. C., et al. (1997). Rationale and perspectives on the development of fungicides. *Annu. Rev. Phytopath.* 35, 349–372.
- Korpi A, Jarnberg J, Pasanen A-L (2009) Microbial volatile organic compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 39.
- Kosiak, B., Torp, M., Skjerve, E., and Thrane, U., (2003). The prevalence and distribution of *Fusarium* species in Norwegian cereals: a survey. *Acta Agri. Scand. Sect. B Soil Plant Sci.* 53: 168-176
- La Riviere JW, Kooiman P (1967). Kefiran, a novel polysaccharide produced in the kefir grain by *Lactobacillus brevis*. *Arch. Mikrobiol.* 59: 269–278.
- Ladokin A, White H. (2001). Detergent-like permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim. Biophys.*, 1514: 253-260.
- Lagunas-Lagunas, J.; Zavaleta-Mejía, E.; Osada-Kawasoe, S. y Aranda-Ocampo, S. (2001). *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Rev. Mex. Fitopatol.* 19: 57-65.
- Lamour, K. H.; Stam, R.; Jupe, J. y Huitema, E. (2012). The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Mol. Plant Pathol.* 13: 329-37.
- Lemfack MC, Nickel J, Dunkel M, Preissner R, Piechulla B (2014) VOC: a database of microbial volatiles. *Nucleic Acids Res* 42:D744–D748.

Leslie, J. F.; Summerell, B. A. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual. Blackwell Professional, Ames, Iowa, USA. 388 p.

Li Q, Ning P, Zheng L, Huang J, Li G, Hsiang T (2012). Effects of volatile substances of *Streptomyces globisporus* JK-1 on control of *Botrytis cinerea* on tomato fruit. Biol. Control. 61:113–120.

Li X, Zhang Y, Wei Z, Guan Z, Cai Y, Liao X (2016) Antifungal Activity of Isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the Biocontrol of *Peach Gummosis*. PLOS ONE 11(9).

Li, Q. L., P. Ning, L. Zheng, J. B. Huang, G. Q. Li, and T. Hsiang.(2010). Fumigant activity of volatiles of *Streptomyces globisporus* JK-1 against *Penicillium italicum* on *Citrus microcarpa*. Posth. Biol. Technol. 58:157–165.

Lin C, Tsai C-H, Chen P-Y, Wu C-Y, Chang Y-L, Yang Y-L, et al. (2018) Biological control of potato common scab by *Bacillus amyloliquefaciens*Ba01. PLOS ONE 13

Liu S, Weibin R, Jing L, Hua X, Jingan W, Yubao G, Jingguo W. (2008) Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids. Mycopathologia.166:93-102.

Lopitz-Otsoa F, Rementeria A, Elguezabal N, Garaizar J. (2006). Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. Rev. Iberoam. Micol. 23:67–74.

Lugtenberg B, Kamilova F (2009) Plant-growth-promoting rhizobacteria. Annu. Rev. Microbiol. 63.

Manamgoda DS, Cai L, McKenzie EHC, Crous PW, Madrid H. (2012). A phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. Fungal Div. 56: 131–144.

Mari M., Neri F., Bertolini P. (2007). Novel approaches to prevent and control postharvest diseases of fruit. *Stewart Postharvest Review*. Stewart Postharvest Solutions Ltd., London, UK. 3(6): Article 4.

Mercier J, Wilson CL (1994). Colonization of apple wounds by naturally occurring microflora and introduced *Candida oleophila* and their effect on infection by *Botrytis cinerea* during storage. *Biol. Control* 4: 138–144.

Meziane H, Gavriel S, Ismailov Z, Chet I, Chernin L, Hofte M. (2006). Control of green and blue mould on orange fruit by *Serratia plymuthica* strains IC14 and IC1270 and putative modes of action. *Postharv. Biol. Technol.* 39:125–133.

Michel-Aceves A.C., Otero-Sánchez M.A., Martínez-Rojero R.D., Ariza-Flores R., Barrios-Ayala A. (2008). Control biológico in vitro de enfermedades fungosas en tomate *Lycopersicum esculentum* Mill. *Avances en investigación agropecuaria AIA*. 12: 55-66.

Minerdi D, Bossi S, Gullino ML, Garibaldi A. (2009). Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35. *Environ. Microbiol.* 11:844–854

Morales de la Vega L, Barboza-Corona E, Aguilar-Uscanga MG, Ramírez-Lepe M (2006). Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. *Can. J. Microbiol.* 52: 651-657.

Moreira Do Santos, Wagner Luiz (1993). Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producidas por *Pediococcus* sp 347 de origen cárnico. Tesis Doctorado Universidad complutense de Madrid Facultad de veterinaria. Departamento de Nutrición y Bromatología III. 266 pág.

Ninane E, Mukandayambaje R, Berben G. (200). Identification of lactina cid bacteria within the consortium of a kéfir grain bay sequencing of 16S rDNA variable región. *Journal of AOAC Intertational.* 41: 578-582.

Nissen-Meyer J, Nes IF. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. Arch. Microbiol. 167: 67-77.

Nunes CA (2012). Biological control of postharvest diseases of fruit. Eur. J. Plant Pathol. 133:181–196.

Orietta Fernández-Larrea Vega (2001) Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas. 100

Pérez-y-Terrón R, Gonzalez-Montfort T S, Muñoz-Rojas J (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicum esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). Revista Iberoamericana de Ciencias.

Pohl Carolina, Johan LF, Thibane Kock S and Vuyisile. (2015) Antifungal free fatty acids: A Review. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. 61-71.

PORQUE DE REFERENCIA Z PASAS A A, f?, d? EN DESORDEN

Pretorius D, van Rooyen J, Clarke KG (2015). Enhancen production of antifungal lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of postharvest disease. *New Biotechnol.* 32: 243-252..

Reyes MEQ, Rohrbach KG, Paull RE (2004). Microbial antagonists control postharvest black rot of pineapple fruit. *Posth.Biol.Technol.* 33: 193–203.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., y Lonvaud, A. (2006). Metabolism of lactic acid bacteria. *Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications.* 2nd edition. John Wiley & Sons, New Jersey, USA.

Rivera A.E., Zuñiga. (2012) Induced plant secondary metabolites for phytopatogenic fungi control: a review. *J. Soil Sci. Plant Nut.* 12: 893-911

Ryu CM (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100:4927–4932

Saraf M, Pandya U, Thakkar A (2014). Role of allelochemicals in plant growth promoting rhizobacteria for biocontrol of phytopathogens. *Microbiol. Res.* 169:18–29.

Saravanakumar D., Ciavorella A, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML. (2008). *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 out competes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Posth. Biol. Technol.* 49:121–128.

Sathe SJ, Nawani NN, Dhakephalkar PK, Kapadnis BP. (2007). Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 103

Seidl V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. *Fungal Biol. Rev.* 22:36– 42

Serrano-Carreón L., Galindo-Fentanes E., (2007). Control biológico de organismos fitopatógenos: un reto multidisciplinario. *Ciencia.* 13: 77-89.

Shai Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by  $\alpha$ -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim. Biophys. Acta.* 1462: 55-70.

Sharma RR, Singh D, Singh R. (2009). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol. Control.* 50:205–221.

Simova E, Beshkova D, Angelov A, Hristozova T, Frengova G. (2002). Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1–6.

Singh, R., Shedbalkar, U. U., Wadhvani, S. A., y Chopade, B. A. (2015). Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 99, 4579–4593.

Singh, Z., Kaur J., Kaur R., Hundal S.S (2016). Toxic effects of organochlorine pesticides: a review. *Am. J. Biosci.* 4, 11–18.

Spadaro D, Droby S. (2016). Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* 47:39–49.

Spadaro D. Gullino ML. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *Int. J. Food Microbiol.* 91:185–194.

Spadaro D., Ciavorella A, Zhang D, Garibaldi A, Gullino ML. (2010). Effect of culture media and pH on the biomass production and biocontrol efficacy of a *Metschnikowia pulcherrima* strain to be used as a biofungicide for postharvest disease control. *Can. J. Microbiol.* 56:128–137.

Sparks, T. C., Lorsbach, B. A. (2017). Perspectives on the agrochemical industry and agrochemical discovery. *Pest Manage. Sci.* 73, 672–677.

Talibi I., Boubaker H, Boudyach EH, Ait Ben Aoumar A. (2014). Alternative methods for the control of postharvest citrus diseases. *J. Appl. Microbiol.* 117:1–17.

Tenorio-Salgado Silvia, Tinoco Raunel, Vazquez-Duhalt Rafael, Caballero-Mellado Jesus, Perez-Rueda Ernesto. (2013). Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered.* 9: 236-243.

Tian D, Babadoost M, (2004) Host Range of *Phytophthora capsici* from Pumpkin and Pathogenicity of Isolates. *Plant Dis.* 88, 485-489.

Tortora Gerard J., Funke Berdell R., Case Christine L. (2007). Introducción a la microbiología. Novena edición. Pag 424: 559.

Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C et al. (2005). Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49: 2474–2478.

Urrego Velásquez M. C, Cadavid Rojas L. A. (2005). Efecto sobre la calidad microbiológica, sensorial y reológica, de la aplicación de tres diferentes niveles de ácido láctico en un corte de carne de res (Huevo de Solomo). Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 72.

Valcke, M., Bourgault, M. H., Rochette, L., Normandin, L., Samuel, O., Belleville, D., et al. (2017). Human health risk assessment on the consumption of fruits and vegetables containing residual pesticides: a cancer and non-cancer risk/benefit perspective. *Environ. Int.* 108, 63–74.

Vásquez MSM, Suárez MH, Zapata BS (2009) Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido-lácticas en la conservación de la carne. *Rev. Chil. Nutr.* 36

Waewthongrak W., Pisuchpen S, Leelasuphakul W. (2015). Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. *Postharvest Biol. Technol.* 99:44–49.

Weisburg William G., Barns Susan M., Pelletier Dale A., Lane David J. (1990). 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J. Bacteriol.* 8: 697-703

Weisskopf, L. (2013) The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi. *In* microbial pathogens and strategies for combating them: Sci. Technol. Edu. ed. Méndez -Vilas, A. pp. 1352

Weller DM. (2007). *Pseudomonas* biocontrol agents of soil borne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology.* 97:250–256.

Wilson, C.L., and Wisniewski, M.E. 1989. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: An emerging technology. *Ann. Rev. Phytopath.* 27

Wisniewski ME., Biles C, Droby S, Mclaughlin R, Wilson CL, Chalutz E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*: I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Path.* 39:245–258.

Witthuhn RC, Schoeman T, Britz TJ (2005). Characterisation of the microbial population at different stages of Kefir production and Kefir grain mass cultivation. *Int. Dairy J.* 15: 383–389.

Xu CK, Mo MH, Zhang LM, Zhang KQ. 2004. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biol. Biochem.*36:1997–2004

Xue G. Allen, Keh Ming Ho, Butler Gail, Babcock Carolyn. (2006). Pathogenicity of *Fusarium* species causing head blight in barley. *Phytoprotection.* 87. 10.7202/013973ar.

Yagihara M, Kawasaki M, Ishizaki H, Anzawa K, Udagawa S. (2010). Tiny keratotic brown lesions of the interdigital web between the toes of a healthy man caused by *Curvularia* species infection and a review of cutaneous *Curvularia* infections. *Mycoscience*. 51: 224–233.

Yang L, Harroun TA, Weiss TM, Ding L, Huang HW. (2001). Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys. J.* 81: 1475–1485

Yuan J, Raza W, Shen Q, Huang Q. (2012) Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*. *Appl. Environ. Microbiol.*

Yusuf MA (2013) Lactic Acid Bacteria: Bacteriocin producer: A mini review. *IOSR J. Pharm.* 3

Zheng M, Shi J, Wang Q, Li Y. (2013). Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. *Biol. Control*. 65:200–206.

