



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
MAESTRIA INTERINSTITUCIONAL EN
BIOTECNOLOGÍA**



TESIS

**DESARROLLO A NIVEL DE LABORATORIO DE UN
BIOPLAGUICIDA A BASE DE *Bacillus subtilis*, PARA EL
CONTROL DE HONGOS FITOPATÓGENOS EN CULTIVOS DE
INTERÉS AGRÍCOLA**

Para optar al Título de Máster en Biotecnología

Elaborado por

Ing. José Mamerto Méndez Úbeda

Tutor

PhD. Leandro Alberto Páramo Aguilera

Managua, Nicaragua

Julio 2018

DEDICATORIA

Quiero dedicar la culminación de este trabajo primeramente a Dios Padre todo poderoso, que gracias a su infinita bondad y misericordia ha permitido mi formación espiritual y profesional.

A mi esposa e hijos quienes son el motor que impulsa mi deseo de superación y me animan para seguir adelante con cada una de las metas y proyectos que me propongo, para ellos todo mi amor y cariño.

A mis padres y hermanos, quienes han sido mi apoyo moral, con sus consejos y buenos deseos, me han motivado para dar lo mejor de mí día con día.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios y a María santísima, por proteger mi camino, guiarme, darme fortaleza y salud, para cumplir con este propósito en mi vida.

A toda mi familia y de manera especial a mi esposa Gloria Alvarado y mis hijos Allyson Lidieth y José Alejandro, gracias por su apoyo y comprensión en todo este tiempo dedicado a mi formación profesional.

A la Universidad Nacional de Ingeniería, a través de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo, por el financiamiento otorgado para el desarrollo de este trabajo.

Al Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) y a su Directora Ing. Larisa Korsak, por ser contraparte de este proyecto de investigación, poniendo a disposición su personal e instalaciones para el desarrollo del trabajo investigativo.

Al Doctor Leandro Alberto Páramo Aguilera quien con mucho gusto aceptó ser mi asesor en este trabajo de investigación, gracias por todo su tiempo y esfuerzo, gracias por su amistad, buenos consejos y la disposición para atender mis consultas en todos los momentos que lo requería.

A los estudiantes y ahora Ingenieros Agrícolas, Mario Flores, Erick Roque, Mercedes Ayestas y Becker Talavera, por su compromiso, dedicación y gran aporte en el desarrollo de este proyecto.

Al personal del PIENSA, en especial a la Lic. Omara Gari y Hassel Aragón, por su apoyo y contribución en las actividades vinculadas con este trabajo.

A todos los que hicieron posible que formara parte del selecto grupo de becarios de la Maestría Interinstitucional de Biotecnología, al CNU, CONICIT, a mis compañeros de maestría y a todos los docentes que compartieron sus conocimientos y experiencias.

RESUMEN

Los microorganismos fitopatógenos son una amenaza importante para la producción de alimentos y su control mediante el uso de microorganismos antagonistas es una práctica mundial, lo que ha llevado a la investigación y búsqueda de nuevos aislados que sean efectivos en el control biológico. En esta investigación se llevó a cabo el aislamiento e identificación de bacterias a partir de bioinsumos producidos artesanalmente en Nicaragua, evaluando in vitro y en condiciones de invernadero su antagonismo frente a hongos fitopatógenos de interés agrícola. Para esto, se realizó la caracterización morfológica de 14 aislados bacterianos y confirmación por secuenciación del gen ADNr 16S, seguidamente se evaluó el potencial antagónico mediante confrontación dual frente a los hongos identificados como *Fusarium equiseti*, *Fusarium sp.* y *Alternaria alternata*, obteniendo 6 cepas con potencial efecto inhibitorio, sobresaliendo *Bacillus subtilis* DCL4-31 cepa F con los mejores porcentajes de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos evaluados en un rango de 50-100%. Posteriormente, se multiplicó *Bacillus subtilis* a nivel de shakeaker para producir un volumen necesario del bioplaguicida y se determinó su antagonismo contra hongos fitopatógenos en el cultivo de papa variedad Monte Carlo en condiciones de invernadero, obteniendo resultados de inhibición a los 50 DDS contra los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata* y *Fusarium sp.* con una eficacia del bioplaguicida aplicado de 52.10% y 44.49% respectivamente; contra *Fusarium equiseti* los resultados obtenidos indican que no hubo inhibición. Otros resultados de interés fueron obtenidos mediante la identificación de *Bacillus megaterium* y la utilización de *Rhizobium sp.*, este último inhibió entre 50-90% el crecimiento de los hongos de trabajo en condiciones de placa Petri, lo cual sugiere considerar su aplicación no solo como bioestimulante, sino también como bioprotector al inhibir el crecimiento de ciertos fitopatógenos.

ABSTRACT

Plant pathogens microorganisms are an important threat to food production and their control through the use of antagonistic microorganisms is a world practice, which has led to research and search for new isolates that will be effective in biological control. In this investigation the isolation and identification of bacterium from bioinsumos produced in Nicaragua was carried out evaluating in vitro and in greenhouse conditions their antagonism against phytopathogenic fungi of agricultural interest. For this the morphological characterization of 14 bacterial isolated and confirmation by sequencing of the 16S rDNA gene was carried out, immediately afterwards the antagonistic potential was evaluated by dual confrontation against the fungi identified as *Fusarium equiseti*, *Fusarium sp.* and *Alternaria alternata*, obtaining 6 strains with potential inhibitory effect, with *Bacillus subtilis* DCL4-31 strain F standing out with the best growth inhibition percentages of phytopathogens evaluated in a range of 50-100%. Subsequently, *Bacillus subtilis* was multiplied at sheaker level to produce a necessary volume of bio pesticide and its antagonism against phytopathogenic fungi was determined in the potato farming Monte Carlo variety in greenhouse conditions, obtaining results of inhibition at 50 DDS against the phytopathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Fusarium sp.* with an applied biopesticide efficacy of 52.10% and 44.49% respectively; against *Fusarium equiseti* the results obtained indicate that there was no inhibition. Other interesting results were obtained by the identification of *Bacillus megaterium* and the application of Rhizobium sp, this last inhibited between 50-90% the growth of the evaluated fungi, which suggests to consider its application not only as a biostimulant, but also like a bioprotector when inhibiting of growth of certain phytopathogens.

INDICE DE CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	ANTECEDENTES.....	2
III.	JUSTIFICACIÓN	4
IV.	OBJETIVOS	5
4.1.	OBJETIVO GENERAL	5
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
V.	MARCO TEÓRICO	6
5.1.	BIOINSUMOS	6
5.2.	MICROORGANISMOS.....	6
5.2.1.	Bacterias.....	7
5.2.2.	Hongos	10
5.2.3.	Cultivo de microorganismos en el laboratorio.....	13
5.2.4.	Crecimiento microbiano	20
5.3.	ANTAGONISMO MICROBIANO PARA EL CONTROL FITOSANITARIO	26
5.3.1.	Género <i>Bacillus</i> como biocontrolador de enfermedades	27
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	29
6.1.	UBICACIÓN DEL ESTUDIO	29
6.2.	RECOLECCIÓN DE BIOINSUMOS COMERCIALES	29
6.3.	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	29
6.3.1.	Preparación de medios de cultivo.....	29
6.3.2.	Inoculación de muestras de bioinsumos (Primera siembra)	30
6.3.3.	Selección y aislamiento de microorganismos	31
6.4.	APROXIMACIÓN A LA IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLADOS	33
6.4.1.	Bacterias.....	33
6.4.2.	Hongos	34
6.5.	CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS.....	34
6.6.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS MICROORGANISMOS SELECCIONADOS	35
6.6.1.	Corrección de las secuencias	35
6.6.2.	Comparación de las secuencias	36

6.6.3.	Alineamiento de secuencias	37
6.6.4.	Construcción de árboles filogenéticos	38
6.7.	DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO.....	38
6.7.1.	Pruebas de antagonismo in vitro	38
6.7.2.	Pruebas de antagonismos en invernadero	40
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
7.1.	AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	52
7.2.	APROXIMACIÓN A LA IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLADOS	54
7.2.	54
7.2.1.	Identificación morfológica de los aislados bacterianos	54
7.2.2.	Identificación morfológica de los aislados de hongos filamentosos de los bioinsumos según su tipo de espora.....	56
7.2.3.	Identificación morfológica del aislado de hongo levaduriforme de los bioinsumos.....	59
7.2.4.	Identificación morfológica de los hongos fitopatógenos utilizados en pruebas de antagonismo	60
7.3.	IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.....	61
7.3.1.	Identificación molecular de bacterias.....	61
7.3.2.	Identificación molecular de hongos fitopatógenos	66
7.4.	PRUEBAS DE ANTAGONISMO	69
7.4.1.	Pruebas de antagonismo in vitro	69
7.4.2.	Pruebas de antagonismo en invernadero	76
VIII.	CONCLUSIONES.....	86
IX.	RECOMENDACIONES	88
X.	BIBLIOGRAFIA.....	89

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del mundo vivo basada en la estructura del ARN de los ribosomas.....	7
Figura 2. Distintas formas bacterianas.	8
Figura 3. Técnica de Gram.....	9
Figura 4. Partes de un hongo microscópico.	10
Figura 5. Marchitez causada por <i>Fusarium oxysporum</i> en cultivo de tomate.....	11
Figura 6. Manchas foliares ocasionadas por <i>Alternaría sp.</i> en cultivo de papa (<i>Solanum tuberosum</i>).	12
Figura 7. Siembra de inóculo en placa Petri con medio de cultivo.	15
Figura 8. Cultivo impuro/ cultivo puro.	16
Figura 9. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.....	17
Figura 10. Curva de Crecimiento en un cultivo por lotes.	24
Figura 11. Preparación de los medios de cultivo. A: Medios de cultivo comerciales en sus envases; B: Calentamiento del medio de cultivo en el Hot Plate; C: Esterilización en el autoclave a 121°C durante 15 minutos; D: Placas Petri con el medio de cultivo solidificado.	30
Figura 12. Proceso de inoculación (siembra) por extensión o bañado en superficie.	31
Figura 13. Placas Petri con cultivos mixtos producto de la primera siembra.....	31
Figura 14. Re inoculación (Resiembra) por agotamiento en estrías de las colonias seleccionadas.....	32
Figura 15. Aislamiento de hongos filamentosos. A) Micelio del hongo tomado con el asa de siembra recta; B) Depósito del hongo en medio PDA; C) Microorganismo aislado.	33
Figura 16. Tinción Gram en bacterias. A) Preparación del frotis en un portaobjetos; B) Fijación del frotis con calor; C) Recipientes de los colorantes, solución mordiente y decolorante utilizados en la tinción de Gram; D) Observación en el microscopio con objetivo 100x.	34
Figura 17. Electroferograma corregido con el uso de Bioedit v7.0.9.	35
Figura 18. Secuencia nucleotídica en formato FASTA.....	36
Figura 19. Listado de secuencias de microorganismos con mayor porcentaje de identidad respecto a la secuencia en estudio mostrado por BLAST.	37
Figura 20. Ventana mostrada en el alineamiento múltiple usando Clustal W versión 1.4 incluido en el programa Bioedit v7.0.9.	37
Figura 21. Colocación de los microorganismos a utilizarse en la preselección.	39
Figura 22. Colocación de los microorganismos en las pruebas de confrontación dual (screen fino). A) Tratamiento Bacteria vs Fitopatógeno; B) Tratamiento testigo con el fitopatógeno sin presencia de bacteria.	40

Figura 23. Curva de crecimiento por determinación Turbidimétrica. A) Lectura de absorbancia en espectrofotómetro, B) Curva de crecimiento del microorganismo.	41
Figura 24. A. Muestra en agitación en shaker, B. Colocación de muestra en celda, C. Medición de absorbancia en espectrofotómetro.	42
Figura 25. Conteo de bacterias por el método de diluciones y recuento en placa.	42
Figura 26. A. <i>Alternaría alternata</i> , B. <i>Fusarium sp</i> , C. <i>Fusarium equiseti</i>	43
Figura 27. A. Raspado del hongo con una aza; B. Tubo de ensayo con patógeno; C. Filtrado a Erlenmeyer; D. Homogenización en shaker.	43
Figura 28. A. Cámara de Neubauer con cubreobjetos; B. Llenado de la cámara; C. Observación y conteo en Microscopio.....	44
Figura 29. Invernadero tipo Túnel Individual, A. Marco de hierro galvanizado, B. Recubrimiento con malla antivirus, C. Tensado con Lockers y Zigzag, D. Colocación de plástico y malla sarán.	45
Figura 30. Riego por goteo tipo espagueti. A. Gotero de botón conectado a un lateral de polietileno, B. Conexión de distribuidor y microtubo de 8 mm de diámetro, C. Conexión de goteros de estaca en el microtubo, D. Conexión de los goteros de estaca al gotero de botón, E. Colocación de goteros de estaca en cada macetera, F. Aplicación del agua en cada macetera.	46
Figura 31. Desinfección de semilla de papa.....	47
Figura 32. A. Homogenización de compost y arena; B. Aumento de humedad del sustrato; C. Recubrimiento del sustrato con plástico negro; D. Medición de temperatura.	47
Figura 33. Preparación y llenado de maceteras. A. Macetera plástica de 15 lts, B. Perforación de ranuras en los costados, C. Inserción de macetera ranurada en otra macetera sin ranurar, D. Llenado de maceteras con sustrato.	48
Figura 34. A. Tubérculo semilla; B. Distribución de semilla de papa en la macetera.	48
Figura 35. Distribución de tratamientos en el invernadero.	49
Figura 36. Aplicación de los tratamientos en atomizadores manuales. Distribución de tratamientos en el invernadero. A. Hongo patógeno <i>Fusarium equiseti</i> . B. Hongo patógeno <i>Fusarium sp</i> . C. Hongo patógeno <i>Alternaría alternata</i> . D. Bioplaguicida <i>Bacillus subtilis</i>	50
Figura 37. Aislamiento de microorganismos cultivables presentes en las muestras de los bioinsumos. AI-AIII: Placas Petri con cultivo mixto inicial. Las flechas señalan colonias seleccionadas para aislarse de una bacteria, un hongo filamentoso y uno levaduriforme, que se muestran aislados en BI, BII y BIII respectivamente.	53
Figura 38. Morfología en placa y tinción de Gram de los aislados bacterianos. AI-HI, All: Muestra 4; BII-DII: Muestra 3; EII-HII, AIII, BIII: Muestra 2; CIII-GIII: Muestra 1; HIII a: Cultivo mixto obtenido en la primera inoculación y HIII b: agotamiento por estrías.	55

Figura 39. Hongos filamentosos aislados de muestras de bioinsumos. En las filas A y C se muestra la morfología en placa de cada hongo filamentoso, mientras que en B y D, debajo de cada hongo, se muestran las esporas observadas en cada uno.	58
Figura 40. Morfología en placa (AI) y observación de tinción simple al microscopio de luz con objetivo 40x de DCLIV-11 posible <i>Aerobasidium pullulans</i> (AII). En AIII puede observarse la presencia de una pseudohifa.	59
Figura 41. Hongos fitopatógenos utilizados en pruebas de antagonismo. AI, AIV: <i>Fusarium</i> M1-2-1 (D) y M3-1-1 (J) aislados de papa; AII, AV: <i>Fusarium</i> F15 (E) y F9 (T) aislados de maní; AIII: <i>Alternaría</i> M5-62N (I) aislado de papa.	60
Figura 42. Árbol filogenético de aislados bacterianos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 7.0.14, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.	63
Figura 43. Árbol filogenético de hongos fitopatógenos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 7.0.14, el código de acceso al Gen Bank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.	67
Figura 44. Muestra de la preselección de bacterias con efecto antagonístico. AI-AIII: A la izquierda de la placa Petri <i>Bacillus subtilis</i> DCL4-31 (F) frente a los fitopatógenos <i>Alternaría alternata</i> M5-62N (I), <i>Fusarium</i> sp. F15 (E) y <i>Fusarium</i> sp. M1-2-1 (D); BI-BIII: A la derecha de la placa <i>Bacillus subtilis</i> LS6-11 (G) frente a hongos fitopatógenos; CI-CIII: Aislados que no mostraron ningún grado de inhibición, el hongo pasó por encima de ellos.	71
Figura 45. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos: <i>Fusarium</i> sp. M 1-2-1 (D), <i>Fusarium</i> sp. F15 (E), <i>Alternaría alternata</i> M5-62N (I), <i>Fusarium equiseti</i> M 3-1-1 (J) y <i>Fusarium equiseti</i> F9 (T), frente a las Bacterias previamente seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: <i>Bacillus subtilis</i> DCL4-31 (F), <i>Bacillus subtilis</i> LS6-11 (G), <i>Bacillus</i> sp LS6-211 (P), <i>Rhizobium</i> sp. DCL12-11 (Q), <i>Bacillus cereus</i> X2-10(2)2 (R) y <i>Bacillus cereus</i> X5-9CD2 (S).	72
Figura 46. Efecto antagónico in vitro de <i>Bacillus subtilis</i> DCL4-31 (F), <i>Bacillus subtilis</i> LS6-11 (G), <i>Bacillus</i> sp LS6-211 (P), <i>Rhizobium</i> sp. DCL12-11 (Q), <i>Bacillus cereus</i> X2-10(2)2 (R) y <i>Bacillus cereus</i> X5-9CD2 (S) frente a AI: <i>Fusarium</i> sp. M 1-2-1 (D); AII: <i>Fusarium</i> sp. F15 (E); AIII: <i>Alternaría alternata</i> M5-62N (I). Abajo en cada fotografía testigo sin presencia de bacterias. BI: <i>Fusarium equiseti</i> M 3-1-1 (J); BII: <i>Fusarium equiseti</i> F9 (T). En BIII se observa las tres repeticiones del tratamiento testigo de <i>Alternaría alternata</i> M5-62N (I).	74
Figura 47. Efecto antagónico de la cepa DCL4-31 F identificada como <i>Bacillus subtilis</i> frente a los diferentes fitopatógenos. En la fila A, de AI-AV tratamientos testigos de los fitopatógenos; en la fila B, de BI-BV tratamientos de F contra fitopatógenos. De izquierda a derecha de I a V: <i>Alternaría alternata</i> M5-62N (I),	

<i>Fusarium equiseti</i> F9 (T), ambos con 6 días de crecimiento; <i>Fusarium sp.</i> F15 (E) con 7 días; <i>Fusarium equiseti</i> M3-1-1 (J) y <i>Fusarium sp.</i> M1-2-1 (D) con 9 días. .	76
Figura 48. Curva de crecimiento bacteriano (Absorbancia Vs Tiempo)	78
Figura 49. Curva de Concentración del bioplaguicida UFL mL ⁻¹ vs Tiempo (min). 79	79
Figura 50. Curva de Concentración del bioplaguicida UFC/mL vs Absorbancia ...	80
Figura 51. Resultados de variables de sanidad (severidad e incidencia de daños) en ensayo de antagonismo en invernadero.	83

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Lugar y fecha de aplicación de los tratamientos	50
Cuadro 2. Escala usada para mediación de severidad en los tratamientos	51
Cuadro 3. Cantidad de microorganismos aislados a partir de las muestras de los 4 bioinsumos, estado del producto (sólido o líquido), zona de procedencia y código de estos.....	52
Cuadro 4. Características macro y microscópicas de los hongos filamentosos aislados de muestras de bioinsumos.	57
Cuadro 5. Identificación de bacterias mediante análisis filogenético utilizando el árbol de la figura 42. En la tabla se muestra el código de la secuencia, el código del microorganismo, muestra de donde se aisló, puntuación e identidad máxima con el vecino cercano y la identidad final de la bacteria.	64
Cuadro 6. Identificación molecular de hongos fitopatógenos. El cuadro muestra el código de la secuencia y el código del microorganismo, el cultivo a partir del cual se aisló, departamento de procedencia, puntuación e identidad máxima con el vecino más cercano y la identidad final del hongo.	68
Cuadro 7. Resultados de las cepas seleccionadas en el screen grueso. En el cuadro se muestra el código de la secuencia y código de aislamiento de las bacterias, así como el tipo de muestra de donde se aisló para su identificación final.	70
Cuadro 8. Tasa de crecimiento de fitopatógenos: <i>Fusarium sp.</i> M 1-2-1 (D), <i>Fusarium sp.</i> F15 (E), <i>Alternaría alternata</i> M5-62N (I), <i>Fusarium equiseti</i> M 3-1-1 (J) y <i>Fusarium equiseti</i> F9 (T), en presencia de bacterias seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: <i>Bacillus subtilis</i> DCL4-31 (F), <i>Bacillus subtilis</i> LS6-11 (G), <i>Bacillus sp.</i> LS6-211 (P), <i>Rhizobium sp.</i> DCL12-11 (Q), <i>Bacillus cereus</i> X2-10(2)2 (R) y <i>Bacillus cereus</i> X5-9CD2 (S). En la parte inferior de la tabla se muestra el crecimiento de los testigos (sin presencia de bacterias).	73
Cuadro 9. Concentración de bioplaguicida aplicado	80
Cuadro 10. Concentración de hongos Fitopatógeno	81

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Árbol filogenético de bacterias y hongos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 5.0, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.....	i
Anexo 2. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de microorganismos identificados vía molecular.	ii
Anexo 3. Ampliación a los principales resultados obtenidos en el trabajo.	viii
Anexo 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos: <i>Fusarium sp.</i> M 1-2-1 (D), <i>Fusarium sp.</i> F15 (E), <i>Alternaría alternata</i> M5-62N (I), <i>Fusarium equiseti</i> M 3-1-1 (J) y <i>Fusarium equiseti</i> F9 (T), frente a las Bacterias previamente seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: <i>Bacillus subtilis</i> DCL4-31 (F), <i>Bacillus subtilis</i> LS6-11 (G), <i>Bacillus sp.</i> LS6-211 (P), <i>Rhizobium sp.</i> DCL12-11 (Q), <i>Bacillus cereus</i> X2-10(2)2 (R) y <i>Bacillus cereus</i> X5-9CD2 (S).	xxi

I. INTRODUCCIÓN

La agricultura bajo el modelo de producción convencional resulta cada día menos sostenible, afectando la parte ambiental, económica y social de las zonas y regiones donde se práctica. El uso indiscriminado de plaguicidas y fertilizantes químicos, sumado a la labranza inadecuada y la expansión de la frontera agrícola, ha generado desgaste en los ecosistemas (Barquero *et al.*, 2007). En el caso de la aplicación sistemática de productos químicos en la agricultura implica algunas dificultades como el resurgimiento de plagas primarias y secundarias, el desarrollo de resistencia genética, la contaminación del medio ambiente y afectaciones a la salud humana. Muchos de estos productos provocan daños irreparables sobre el sistema nervioso central, y otros están clasificados como carcinogénicos (Pérez, 2004, citado por Reinoso *et al.*, 2006).

Bajo la perspectiva de los modelos agrícolas sustentables y como parte del manejo agroecológico de plagas, el control biológico es una técnica que ocupa un papel preponderante en el combate de las mismas. El control biológico es una estrategia de control de plagas en la que se utilizan enemigos naturales, antagonistas o competidores vivos u otras entidades bióticas inocuas capaces de mantener la densidad de población de un organismo plaga a un nivel que no cause daños relevantes y mantenga la sustentabilidad de los agroecosistemas (García-Gutiérrez & González-Maldonado, 2013). Se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* presentan un gran potencial como antagonistas, principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida, que son capaces de producir efectos de control sobre varias especies de organismos fitopatógenos (Sosa *et al.*, 2005; Castillo-Reyes *et al.*, 2015).

Esta investigación estuvo orientada al desarrollo de un bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis*, aislado y caracterizado microbiológica y molecularmente a partir de bioinsumos artesanales. Para esto se realizó un proceso de aislamiento y purificación de los microorganismos, así como pruebas moleculares (secuenciación del ADNr 16S para bacterias y de la región ITS1 para hongos) de aislados seleccionados para su respectiva identificación a nivel de especie, finalizando con las pruebas de antagonismo de especies identificadas como *Bacillus subtilis* in vitro y en condiciones de invernadero en el cultivo de papa, resultando promisorias en el control biológico, frente a hongos fitopatógenos de los géneros *Alternaria* y *Fusarium*.

II. ANTECEDENTES

La utilización de microorganismos en el control biológico de patógenos causantes de enfermedades en los cultivos, constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y productos químicos (Whipps, 2001 citado por Ruiz-Sánchez *et al.*, 2014). Algunas investigaciones se han enfocado en la búsqueda de microorganismos nativos que actúen bajo las condiciones ambientales de cada región y puedan usarse para restablecer las interacciones de la microbiota del suelo, al punto que sean empleados como biofertilizantes y/o biocontroladores (bioinsumos), que mitiguen el impacto ambiental de los agroquímicos y reduzcan los costos de producción (Rodríguez, 2013; Orberá *et al.*, 2014). De acuerdo con Compant *et al.*, (2005) el desarrollo de estos bioproductos para el control de enfermedades en las plantas, se encaminan a aspectos como la preservación ecológica de la interacción planta-microorganismo, las estrategias de aplicación de los inoculantes, el aislamiento de cepas nuevas y el descubrimiento de mecanismos de acción novedosos. Se enfatiza, además, en el uso de los agentes de biocontrol como parte de los programas de tratamiento integral de enfermedades y de la calidad de los suelos.

En el caso de *Bacillus subtilis*, ha demostrado eficiencia *in vitro* en el control de más de 23 tipos de patógenos de plantas, la competencia frente a otros microorganismos patógenos, se da mediante la secreción de diversas sustancias que se producen cuando la bacteria recibe los nutrientes presentes en la superficie de las raíces de las plantas que induce la elaboración de metabolitos secundarios con capacidad de suprimir el crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas (Raghavendra J., 2006) citado por (Layton *et al.*, 2011).

A nivel mundial se han realizado numerosas investigaciones donde se han aislado bacterias del género *Bacillus* a partir de muestras recolectadas en la rizósfera de distintos cultivos, con el fin de probar su acción antifúngica frente a fitopatógenos. Dentro de estas destacamos las siguientes:

- ✓ Badía *et al.*, (2011) reportaron que cepas de *Bacillus subtilis* aisladas de muestras de raíces y suelo en el cultivo de arroz, presentaron potencialidades para la promoción del crecimiento y el control biológico de hongos fitopatógenos. Se demostró que producen auxinas estimuladoras del crecimiento vegetal, solubilizan fosfatos y fijan nitrógeno, lo que pudiera actuar en la promoción del crecimiento del cultivo del arroz. A la vez ejercen efecto antagónico contra cuatro hongos fitopatógenos: *Pyricularia grisea*,

Alternaria solani, *Fusarium sp.* y *Curvularia sp.*, lo que permitiría su utilización en el control biológico.

- ✓ Corrales et al. (2012) evaluaron in vitro y en condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris L.*) 6 aislados de rizósfera de *Bacillus sp.* frente a un aislamiento de *Fusarium sp.* En las pruebas de antagonismo directo en placa evaluaron el radio de crecimiento de la colonia, porcentaje de inhibición y tasa de crecimiento. La identificación de los bacilos se realizó mediante pruebas bioquímicas y en los resultados la cepa bacteriana que mostró los mayores porcentajes de inhibición fue identificada como *Bacillus subtilis*.
- ✓ Orberá et al. (2014) describen las potencialidades de una cepa autóctona de la microbiota de los suelos de Cuba, *Bacillus subtilis* SR/B-16, aislada a partir de rizósfera de cultivos fertilizados con substrato orgánico, para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de importancia económica. Las investigaciones dirigidas a evaluar las potencialidades de SR/B-16 para el control de enfermedades, mostraron la actividad inhibitoria del crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos procedentes de cultivos de plantas ornamentales y de bancos de semillas de caña de azúcar, pertenecientes a las especies *Curvularia lunata*, *Curvularia gudauskasii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y al género *Colletotrichum*.
- ✓ El efecto biocontrolador de *Bacillus spp.* frente a *Fusarium spp.* bajo condiciones de invernadero en el cultivo de Romero (*Rosmarinus officinalis L.*) fue evaluado por Corrales et al., (2011), obteniendo que todos los aislamientos de *Bacillus spp.*, presentaron efecto biocontrolador sobre *Fusarium spp.* en romero al disminuir la severidad de la marchitez vascular en las plántulas por debajo del 50%.

III. JUSTIFICACIÓN

En el país, existen serias limitaciones en la oferta y desarrollo de bienes y servicios orientados a la producción orgánica, uno de los casos particulares son los bioinsumos (biocontroladores de plagas) producidos a nivel local, la mayoría de estos productos poseen un bajo nivel tecnológico por lo que se desconoce las alternativas de biocontrol (parasitoides, tipo de microorganismos presentes, otros), no se tiene estudios del espectro de funcionamiento de los mismos. (MAGFOR, INTA, IICA, COSUD, & EMBAJADA DE AUSTRIA/COOPERACION PARA EL DESARROLLO, 2005).

Por otro lado, las pérdidas en la producción de alimentos causada por la incidencia de enfermedades, además del impacto ecológico al tratar de controlarlas mediante el uso de plaguicidas químicos y la demanda insatisfecha de productos orgánicos en el mercado internacional, constituyen actualmente algunas de las principales limitantes en el sector agrícola. En Nicaragua, se estima que las pérdidas por concepto de plagas y enfermedades podrían llegar hasta el 30% de la cosecha, siendo su control mediante productos químicos que resultan de alto valor económico (según el MAGFOR en 2013, las importaciones de agroquímicos fueron de 148 millones de dólares), a la vez aumentan la contaminación en los ecosistemas e incrementan la resistencia de los hongos (IICA & MAG, 1992).

El poder generar una alternativa de control eficiente frente a enfermedades tan agresivas como las causadas por los géneros fúngicos *Fusarium* y *Alternaria*, que disminuya las pérdidas económicas de los productores, ayudaría a aumentar la producción de los cultivos y a abrir cada vez más mercados internacionales, que son mucho más exigentes en cuanto a la calidad fitosanitaria del producto. En este contexto, la investigación estuvo orientada al aislamiento e identificación morfológica y molecular de microorganismos nativos de Nicaragua partiendo de bioinsumos artesanales, en la búsqueda de bacterias (*Bacillus subtilis*) antagonistas de hongos fitopatógenos; para lo cual, se realizaron ensayos de antagonismo contra los hongos identificados como *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp*, tanto in vitro a través de la confrontación dual de las bacterias con potencial antagónico de los hongos fitopatógenos evaluados, como en condiciones de invernadero en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L); siendo esta la primera fase en el desarrollo de un producto biológico nacional que tendrá como ingrediente activo *Bacillus subtilis*, reportada como antagonista de un amplio rango de hongos y que será usado para el control de enfermedades en cultivos de interés agrícola.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

- Desarrollar un bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* aislado y caracterizado microbiológica y molecularmente a partir de bioinsumos artesanales para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de interés agrícola.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Explorar la diversidad microbiana posible de obtener por métodos cultivables, utilizando medios enriquecidos partiendo de bioinsumos comerciales procedentes de dos zonas del país (occidente y norte).
- Caracterizar los microorganismos por tipos: bacterias, hongos filamentosos y levaduriformes que estén presentes en las matrices de bioinsumos, a través de observación de características morfológicas en microscopio.
- Realizar la caracterización molecular de los microorganismos pertenecientes al género *Bacillus* presentes en las muestras de bioinsumos, para la identificación de la especie *Bacillus subtilis*.
- Realizar la formulación de un bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis*, para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de interés agrícola, considerando la realización de ensayos de patogenicidad in vitro y en invernadero.

V. MARCO TEÓRICO

5.1. BIOINSUMOS

En Nicaragua, la Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense de Agricultura Ecológica NTON 11 010-03 define insumo orgánico o bioinsumo como: “todo aquel material de origen orgánico o de síntesis biológica utilizado en la producción agropecuaria” y materia orgánica como: “los restos de cualquier organismo, y residuos o desperdicios de productos de origen vegetal o animal”.

Los bioinsumos son componentes vitales de los sistemas sostenibles dado que constituyen medios económicamente activos y ecológicamente aceptables para reducir los insumos químicos y mejorar la calidad y cantidad de los productos, se clasifican como insumos de riesgo reducido, principalmente productos naturales u organismos, derivados de materiales naturales como animales, plantas, microorganismos y ciertos minerales (Barquero *et al.*, 2007).

5.2. MICROORGANISMOS

Los microorganismos constituyen un grupo de seres vivos sumamente heterogéneo cuya única característica común es su reducido tamaño: todos son lo suficientemente pequeños como para pasar inadvertidos al ojo humano, siendo preciso el uso de dispositivos de aumento como el microscopio óptico o en algunos casos, el microscopio electrónico para poder observarlos (Froni, 2005).

Gracias a las diversas técnicas innovadoras en las investigaciones microbiológicas, como el uso de las técnicas de secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y el estudio del ARN de los ribosomas, los microorganismos se han agrupado desde el punto de vista evolutivo en tres grupos principales: arqueobacterias, eubacterias y eucariotas. La Figura 1 muestra un esquema de la evolución del mundo vivo basado en la estructura del ARN de los ribosomas (Froni, 2005).



Figura 1. Evolución del mundo vivo basada en la estructura del ARN de los ribosomas.
Fuente: Frioni, 2005.

5.2.1. Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares que se reproducen generalmente por fisión binaria (una célula se parte y se convierte en dos células idénticas) y generalmente necesitan de un medio de crecimiento rico en proteínas y con ambiente de alta humedad relativa para su reproducción y diseminación. Bajo condiciones ambientales favorables de temperatura, humedad y nutrientes, las bacterias pueden dividirse cada 20 minutos. Sin embargo, este exagerado ritmo de crecimiento puede verse limitado por la falta de nutrientes, acumulación de desechos metabólicos y otros factores limitantes (Lastres & Soza, 2009).

✓ **Morfología bacteriana**

Microscópica:

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral) (Figura 2). Las bacterias pueden mantenerse unidas unas con otras después de la división celular, pero conservando siempre la independencia celular. Si el plano de división es único, podemos encontrar diplococos o cocos en cadena (microorganismos del género *Streptococcus*). Si los planos de división son muchos, los cocos pueden agruparse en tétradas o en racimos (*Staphylococcus*). Los bacilos pueden ser muy cortos (cocobacilos) o muy largos. Sus extremos pueden ser redondeados o rectos; pueden estar aislados, en cadenas, en filamentos o formando letras chinas (*Corynebacterium*). Los bacilos curvos pueden tener forma de coma (*Vibrio cholerae*) (Pírez & Mota, 2006).

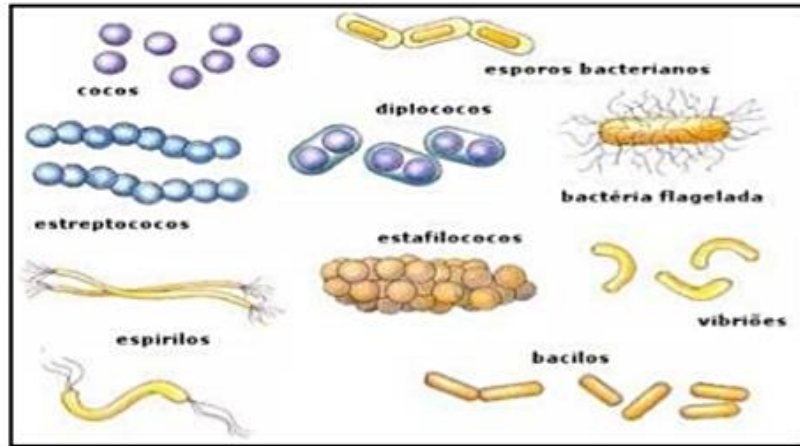


Figura 2. Distintas formas bacterianas.
Fuente: Bravo, 2014.

La morfología bacteriana debe ser observada con el microscopio óptico o el microscopio electrónico, dado el tamaño pequeño de estos microorganismos. El más usado en el laboratorio es el microscopio óptico de campo claro.

Las bacterias pueden observarse sin tinción (examen en fresco) si se las coloca en glicerol o soluciones no acuosas que aumenten el índice de refracción o con tinción usando distintas coloraciones que mejoran su visualización ya que son células incoloras. Dichas tinciones se basan en la afinidad que presentan los colorantes por las estructuras bacterianas. Los colorantes catiónicos por ejemplo, son atraídos por los componentes de carga negativa como los ácidos nucleicos y los polisacáridos. Ejemplo de este tipo son: el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina.

El examen en fresco no es el más usado para observar la morfología bacteriana porque las bacterias tienen citoplasma incoloro y su índice de refracción no difiere mucho del vidrio y del agua. Con esta técnica se puede verificar la existencia de bacterias y evidenciar su capacidad para moverse. El examen en fresco también puede ser usado con técnicas especiales como la tinción con tinta china que nos permite determinar la presencia de cápsula rodeando la bacteria.

a. Tinción Gram

La coloración de Gram es la más usada en bacteriología; debe su nombre a quién la describió en 1884. Es una coloración diferencial, dado que las bacterias pueden clasificarse según su respuesta en Gram positivas o Gram negativas. Las primeras se tiñen de color azul violeta y las segundas adquieren un color rosado o rojo. La diferente reacción de las bacterias a la coloración de Gram se relaciona con diferencias fundamentales de la envoltura celular de estas dos clases de células (Pírez & Mota, 2006).

La pared celular es responsable del resultado de la tinción de Gram. El procedimiento se inicia con una tinción de las células bacterianas fijadas (frotis) mediante el colorante básico cristal violeta. Posteriormente se trata con una disolución de yodo, que a su vez forma un complejo con el cristal violeta insoluble en agua y sólo medianamente soluble en alcohol o acetona (Pérez, 2006). Las células se tratan después con alcohol para diferenciarlas: las células Gram positivas retienen el complejo colorante-yodo, por lo que las vemos de color morado-azules; y las células Gram negativas son decoloradas por el alcohol, por lo que se hacen visibles mediante la coloración de contraste, en este caso la fucsina o safranina (Figura 3).

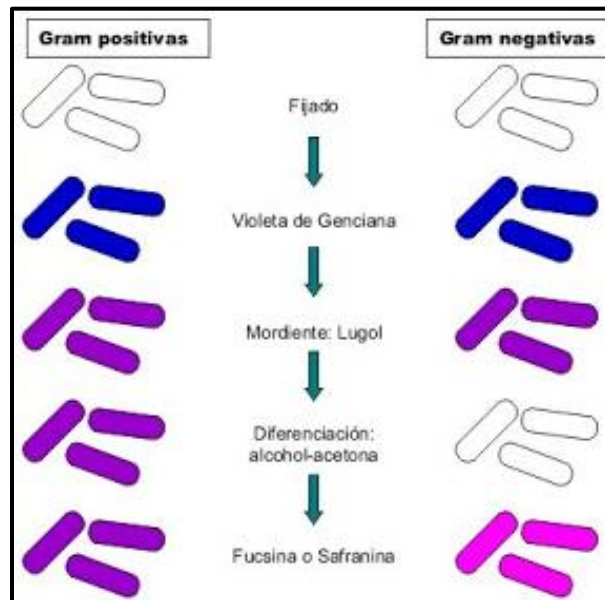


Figura 3. Técnica de Gram.

Fuente: <http://ayudantiasunab.bligoo.cl/microbiologia-tincion-gram>

Macroscópica

La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se las siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. Requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una atmósfera que favorezca su desarrollo, a temperatura óptima.

Las colonias pueden caracterizarse según su:

- Forma: circular (*Staphylococcus*), irregular o filamentosa (*Bacillus*).
- Borde: ondulado (característico de los bacilos largos como *Bacillus anthracis*), en sierra o dentados (*Yersinia pestis*) o lisos (por ejemplo *Escherichia coli*).
- Superficie: plana, convexa, mamelonada, umbilicada.
- Comportamiento frente a la luz: brillante (*Streptococcus*) u opaca (*Staphylococcus*).

- Pueden presentar olores particulares como el frutal de *P. aeruginosa* o el putrefacto de los anaerobios.
- Consistencia: mucoide (M), liso (S) o rugoso (R).

5.2.2. Hongos

Los hongos son organismos eucariontes uni o pluricelulares que se desarrollan en sitios húmedos y con poca luz. Las células de los hongos se agrupan en filamentos llamados hifas (Figura 4) que en conjunto recibe el nombre de micelio. El micelio da a los hongos una apariencia algodonosa. Esta es una característica utilizada en el campo para distinguir las enfermedades causadas por estos de aquellas causadas por bacterias (Urbina, 2011). Su nutrición es heterótrofa, es decir, que no pueden producir sus propios alimentos como lo hacen las plantas, sino que descomponen la materia orgánica por medio de enzimas, absorbiendo las sustancias nutritivas. Por otro lado, su identificación está primariamente basada en las diferencias morfológicas de las estructuras reproductivas y la forma en que las esporas o conidios se producen en células especializadas. La mejor ayuda la constituyen las Claves taxonómicas.

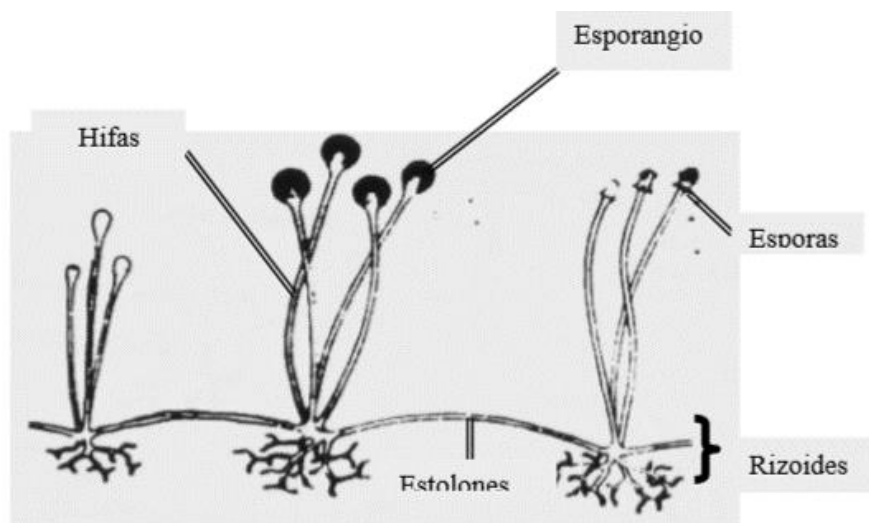


Figura 4. Partes de un hongo microscópico.

Fuente: Pérez, 2006.

✓ Hongos fitopatógenos

Cada año, el 10% de la producción mundial de alimentos se pierde por la incidencia de las enfermedades y plagas que atacan los cultivos de interés agroalimentario: el 50% de ellas provocadas por especies de hongos fitopatógenos (Strange & Scott, 2005) citado por (Orberá *et al.*, 2014).

Los hongos fitopatógenos son microorganismos que producen enfermedades en las plantas. Las enfermedades causadas por hongos producen en sus hospederos una amplia variedad de tipos diferentes de síntomas. Entre otros, los hongos fitopatógenos pueden producir manchas cloróticas y necróticas, cribados, canchales, tizones, podredumbres húmedas o secas, momias, agallas, abolladuras, costras, ahogamientos, marchitamientos y pústulas (Urbina, 2011). Para que suceda una enfermedad, es necesaria la completa interacción de tres componentes: patógeno, huésped y condiciones ambientales favorables (Agris, 1995).

a. Hongos patógenos vasculares

Los hongos que causan la enfermedad denominada como “marchitez vascular” tapan los conductos internos de conducción de agua de las plantas y como consecuencia se observan síntomas de marchitez (Figura 5). Puede presentarse muerte del follaje, hojas o de la planta en general. Para detectar si hay marchitez vascular, se efectúan cortes diagonales en una rama afectada y se observa si hay una decoloración verde oscura a marrón en la parte interna del tallo, lo cual es un síntoma diagnóstico de la presencia de estos patógenos vasculares. Las ramas afectadas por estos hongos generalmente mueren. Algunas plantas mueren rápidamente mientras que en otras se observa la muerte de algunas ramas y posteriormente la de la planta (Arias & Jeréz, 2008).

Fusarium sp: Este hongo penetra la epidermis de las raíces, la corteza y endodermis, finalmente entra a los vasos del xilema, colonizando el sistema vascular, en el cual el fitopatógeno produce compuestos complejos que interfieren con la capacidad de la planta al traslocar la toma de agua y nutrientes, ocasionando la degradación de los tejidos y la muerte.



Figura 5. Marchitez causada por *Fusarium oxysporum* en cultivo de tomate.

Fuente: <http://www.forestryimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=9494>

b. Hongos causantes de enfermedades foliares

Las enfermedades foliares limitan el rendimiento del cultivo, porque se desarrollan a expensas de la planta, consumiendo energía. De manera general, estas afectan el cultivo, provocando un mal funcionamiento y destrucción de los tejidos fotosintéticos, ya que los patógenos ejercen su parasitismo aprovechándose de la energía producida por el cultivo. De esta manera colonizan, crecen y se reproducen exclusivamente a expensas de la planta, generándoles pérdidas de carbohidratos y nutrientes producidos o de reserva (Arias & Jeréz, 2008).

La mayoría de las enfermedades foliares producen clorosis, necrosis, afectando la fotosíntesis, disminuyendo la interceptación de radiación y aumentando la reflectancia. Así también, la mayoría de ellas generan senescencia y algunas más graves, una intensa defoliación afectando la interceptación lumínica. Esta senescencia anticipada de las hojas puede inducir también una removilización de las reservas del tallo, lo cual aumenta la predisposición a las pudriciones de raíz y tallo con el consiguiente riesgo de vuelco de las plantas y/o quebrado durante la cosecha.

Alternaría sp. En las hojas se presentan pequeñas manchas circulares de color café frecuentemente rodeadas de un halo amarillo (Figura 6). Las manchas tienen características de tener anillos concéntricos de color oscuro. Usualmente las manchas aparecen en las hojas más viejas y de estas suben al resto de la planta. A medida que la enfermedad progresa, el hongo puede atacar tallos. En los anillos concéntricos se producen esporas polvorrientas y oscuras.



Figura 6. Manchas foliares ocasionadas por *Alternaría sp.* en cultivo de papa (*Solanum tuberosum*).

Fuente: Acuña & Tejeda, 2015.

5.2.3. Cultivo de microorganismos en el laboratorio

El cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. En general, podemos distinguir cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio.

✓ Requerimientos nutricionales de los microorganismos

Como todos los organismos vivos, los microorganismos requieren ciertos nutrientes básicos y factores físicos para el mantenimiento de su vida, estas necesidades varían según el tipo de microorganismo y es necesario conocerlas para cultivarlos en el laboratorio (Rojas, 2011).

Las necesidades nutricionales básicas pueden satisfacerse en el laboratorio, mediante el uso de medios de cultivos artificiales, los cuales se encuentran disponibles en una gran variedad y en general aportan a los microorganismos: una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, elementos no metálicos, elementos metálicos, vitaminas, agua y energía.

Por otro lado, las necesidades físicas involucran factores como: Temperatura, pH y gases, los cuales se encuentran en un rango óptimo específico para cada microorganismo; por lo tanto, su variación puede acelerar o disminuir el crecimiento. Los medios de cultivos son sustratos o soluciones de nutrientes que permiten el desarrollo de microorganismos. En las condiciones de laboratorio para realizar un cultivo, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para dar colonias (Solano, 2006).

El profesional que desarrolla trabajos con microorganismos o con un microorganismo en particular, debe satisfacer sus necesidades nutricionales, con el objetivo de recuperarlo y hacerlo crecer adecuadamente. De manera general, estos medios pueden ser artificiales o químicamente definidos. Para estos últimos se conocen las cantidades exactas de compuestos químicos puros que los conforman, ya sean de tipo orgánico o inorgánico. Los medios artificiales están compuestos de un número limitado de sustancias complejas, como extractos de plantas o de animales cuya composición química exacta no se conoce (Rojas, 2011).

Los medios de cultivo se pueden clasificar en definidos cuando su composición química se conoce totalmente y complejos cuando no es el caso porque están compuestos por mezclas de extractos de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, etc.). Por otra parte, los medios de cultivo pueden ser

líquidos o sólidos si se añade algún agente solidificante que no sea consumible por los microorganismos (normalmente agar).

✓ **Aislamiento de microorganismos**

En nuestros ecosistemas los microorganismos se encuentran como poblaciones mixtas. Sin embargo, para el estudio, caracterización e identificación necesitamos tenerlos como cultivos puros (proviene de una misma célula). La obtención de los cultivos puros a partir de una población mixta se lleva a cabo en dos etapas (Álvarez, 2015).

- **Aislamiento:** La muestra debe diseminarse de manera tal que los diferentes microorganismos queden lo suficientemente separados sobre la superficie de un medio de cultivo sólido, de manera que luego de la incubación ellos formen colonias visibles aisladas.
- **Trasplante:** Luego de tener las colonias aisladas, estas deben transferirse a otras placas para ser cultivadas por separado.

Se considera que se ha obtenido un cultivo puro, cuando al realizar este proceso, todas las colonias presentan las mismas características. El medio de cultivo utilizado en el proceso de aislamiento dependerá, entre otros factores, de los requerimientos nutricionales de los microorganismos que se espera aislar y de la presencia de microorganismos que, por sus características y/o por la cantidad en que se encuentren en la muestra, dificulten la obtención de los microorganismos objeto del aislamiento (Álvarez, 2015).

a. Siembra

Sembrar o inocular (Figura 7) es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incubaba a una temperatura adecuada para el crecimiento (Santambrosio & Ortega, 2009).

Las reglas fundamentales para efectuar la siembra exigen:

- Que se efectúen asépticamente.
- Que los medios de cultivo y el instrumental a utilizar estén esterilizados.
- Que se realicen solo los manipuleos indispensables.
- Que se trabaje fuera de toda corriente de aire. De ser posible utilizando un mechero o bien Flujo laminar.



Figura 7. Siembra de inóculo en placa Petri con medio de cultivo.

Fuente: http://www.ehowenespanol.com/proposito-estriar-placa-agar-info_207916/

Existen diferentes tipos de siembra de acuerdo al medio utilizado y los requerimientos del microorganismo a estudiar. En medios sólidos podemos utilizar los siguiente: (Santambrosio & Ortega, 2009).

- **Siembra por inmersión:** se coloca el inóculo en una placa o caja de Petri y sobre el mismo se vierte el medio de cultivo previamente fundido. Este método se utiliza para microorganismos aerobios.
- **Siembra en doble capa:** se procede de la misma manera que por inmersión. Una vez solidificado el medio se vierte una cantidad extra de medio necesaria para cubrir la capa anterior (generalmente 10 ml aprox.). Este método se utiliza para microorganismos anaerobios facultativos y microaerófilos.
- **Siembra en superficie:** se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido, se deja solidificar y se coloca sobre la superficie el inóculo. Con ayuda de una espátula de Drigalsky se extiende el inóculo hasta su absorción total por el medio de cultivo. Este tipo de siembra se recomienda para microorganismos aerobios estrictos.
- **Siembra en estría:** se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido y se deja solidificar. Dicha técnica consiste en dibujar estrías perpendiculares sobre el medio solidificado y en los cuatro puntos cardinales de la placa lo más separado posible para identificar diferentes morfologías en los crecimientos de bacterias.

b. Purificación o aislamiento

El proceso de purificación o aislamiento se define como la separación de un determinado microorganismo del resto de microorganismos que le acompañan (Figura 8). El método más usual para este proceso es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido adecuado dispuesto en una placa Petri (Solano, 2006).



Figura 8. Cultivo impuro/ cultivo puro.

Fuente: Mediosdecultivo.com

El éxito del aislamiento, recae en realizar el mayor número de estrías posibles. En las primeras estrías aparecerán colonias confluentes o una masa continua de microorganismos. En las estrías finales deberán aparecer colonias separadas unas de otras. El aislamiento requiere un reducido inóculo de partida. La sucesiva disminución del tamaño de la población sobre el asa, debe asegurar que finalmente algunas células queden suficientemente separadas sobre la superficie.

✓ Identificación molecular de microorganismos

Los métodos basados en biología molecular, se basan en el uso de procedimientos y reactivos, en los cuales se puede detectar determinadas secuencias de ADN que son propias de un determinado agente microbiano (Alejos *et al.*, 2014).

Los datos moleculares han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución; el comportamiento; la selección natural; las interacciones biológicas; la composición, funcionamiento y dinámica de comunidades microbianas; las relaciones filogenéticas, entre otros.

a. Fundamento de las técnicas de identificación molecular

Las técnicas de identificación molecular en bacterias mediante el análisis del ARNr 16S u otros genes mencionados se basa en la amplificación genómica y en la secuenciación de esos genes o sus fragmentos. El medio de cultivo o las condiciones de incubación no serán factores determinantes, pero si serán factores críticos la técnica de extracción del ADN cromosómico y la amplificación.

A continuación se describen las etapas metodológicas a considerar en la identificación molecular según (Rodicio & Mendoza, 2004), mostradas también en la Figura 9.



Figura 9. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S.

Fuente: Rodicio & Mendoza, 2004.

Extracción de ADN: El ADN genómico se extraerá a partir de las células totales mediante diferentes métodos estándar o sistemas comerciales con versatilidad sobre el tipo de muestra o de matrices, en el caso de tratarse de una muestra alimentaria o ambiental. Dependiendo del tipo microorganismo se pueden aplicar modificaciones que simplifiquen u optimicen la extracción cromosómica (Rodicio & Mendoza, 2004).

Amplificación de ADN: En un termociclador, este ADN se utilizará como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una secuencia del ARNr 16S con un rango de tamaño entre 500-1500 pb (o de otro tamaño si se analizan otros genes). Con cebadores universales o de amplio espectro complementarios a las regiones conservadas, se amplificaría teóricamente el gen del ARNr 16S en todas las bacterias. Ninguno de los cebadores utilizados en la actualidad se considera totalmente universal, por lo que no se puede realizar una recomendación específica de cebadores que garantice la amplificación de todos los procariotas (Rodicio & Mendoza, 2004).

Secuenciación de ADN: El gran avance de los métodos de secuenciación ha permitido el conocimiento de un volumen extraordinario de secuencias, obteniéndose con mayor rapidez y calidad. La secuenciación es un proceso análogo a la PCR, que utiliza el ADN como molde pero que los cebadores directo y reverso actúan en reacciones independientes. Estos cebadores pueden ser los mismos cebadores de amplificación u otros diseñados para esta etapa del ensayo. A diferencia de la PCR, no se genera un nuevo molde, sino que se reutiliza en los ciclos programados (25-35). Se añaden bases marcadas con fluorocromos o terminadores y bases no marcadas, que se irán incorporando aleatoriamente a la síntesis. Los terminadores finalizan la síntesis de la secuencia, por lo que al final se obtiene una mezcla de productos de ADN de diferentes tamaños. Cada base (adenina, timina, guanina y citosina) se marca con un fluorocromo diferente que absorbe a diferente longitud de onda, detectándose posteriormente (Rodicio & Mendoza, 2004).

Los terminadores no incorporados se eliminan mediante la purificación del producto y el tamaño de cada uno se determina mediante electroforesis capilar. Según se va conociendo el tamaño y el terminador de cada fragmento (separados en gel o por elución) se determina la secuencia de bases representadas cada una por un color diferente y se editan de forma manual o automática. Las cadenas de ADN se secuencian independientemente, generándose la secuencia directa y la reversa (complementaria). Según el modelo de secuenciador, el tipo de capilar utilizado, y las variables en la secuenciación, es posible simplificar el proceso, reducir el tiempo de ensayo y el coste y aumentar el tamaño de la secuencia a analizar (500-900 bases).

Bioinformática: La bioinformática es una disciplina que se encuentra en la intersección entre las ciencias de la vida y de la información. Trata de desarrollar sistemas que sirvan para entender el flujo de información desde los genes a las estructuras moleculares, su función bioquímica, conducta biológica y, finalmente, su influencia en las enfermedades. Si bien algunos restringen el rango de estudio de la

bioinformática al manejo y análisis de bases de datos biológicas -principalmente de secuencias-, podría atribuírsele un sentido más amplio, como la fusión de las técnicas computacionales con el entendimiento y apreciación de datos biológicos, el almacenamiento, recuperación, manipulación y correlación de datos procedentes de distintas fuentes (Cañedo & Arencibia, 2004).

La Bioinformática no sólo se ha convertido en una ciencia esencial para la genómica básica y la investigación en biología molecular, también está teniendo un gran impacto en muchas áreas de la biotecnología y las ciencias biomédicas. Tiene aplicaciones, que están basadas por ejemplo, en los conocimientos de diseño de fármacos, análisis forense de ADN y Biotecnología agrícola (Meneses, *et al.*, 2011).

Análisis de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos:

El análisis de la secuencia de ADN, es el descubrimiento de similitudes funcionales y estructurales, y las diferencias entre múltiples secuencias biológicas. Esto puede hacerse comparando las nuevas secuencias (desconocidas) con las bien estudiadas y anotadas (conocidas) (Meneses, *et al.*, 2011). Este análisis incluye la alineación de secuencias, la búsqueda en la base de datos de secuencias, el descubrimiento de patrones, la reconstrucción de las relaciones evolutivas, la formación y la comparación del genoma. La comparación de las secuencias del gen ADNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre organismos procariontes, de forma similar la región ITS permite hacer lo mismo en eucariotas (Rodríguez, 2013).

Esto ha traído una gran repercusión en la taxonomía microbiana, ya que ha dado lugar al sistema de clasificación actual que ha permitido la identificación rápida y precisa tanto de procariontes como de eucariotas. La identificación molecular que se basa en el análisis del gen ADNr 16S es comúnmente usada para la identificación de bacterias en donde otro tipo de técnica resulta imposible o simplemente requiere mucho tiempo. La amplificación del gen permite su posterior secuenciación y este proceso comienza preferentemente del ADN extraído de un cultivo puro bacteriano, aunque también puede conseguirse de una muestra proveniente de distintos tipos de fuente. Las moléculas del ADNr 16S e ITS están presentes en todas las bacterias y en todos los eucariotas respectivamente, y su análisis es por tanto, un instrumento de identificación universal, una de las características que las hace tan útil es que su estructura y función han permanecido sin mayores alteraciones durante un tiempo muy largo, de modo que cualquier cambio en la secuencia refleja sobre todo cambios aleatorios que ocurren de una forma suficientemente lenta, de modo que puede aportar información acerca de todos los procariontes a través de la escala evolutiva (Rodicio & Mendoza, 2004).

Existen relaciones jerárquicas entre los microorganismos que surgen a través de la evolución, los árboles filogenéticos nos permiten esquematizar dichas relaciones. Estos árboles constan de nodos unidos entre sí por ramas, las longitudes de estas ramas pueden significar la distancia evolutiva que hay entre nodos. Los árboles agrupan los organismos, de manera que todo lo que hay alrededor de un nodo es considerado un grupo monofilético, es decir, que todo el grupo se originan de un único ancestro común y por tanto pueden poseer rasgos comunes, cuando se presenta que un grupo excluye a algunos de sus descendientes se denomina parafilético (Baudalf, 2003).

Actualmente hay diversos métodos que permiten la construcción de árboles filogenéticos, que han sido categorizados en uno de los siguientes grupos: Basados en distancias: Realizan un cálculo de la distancia evolutiva para todos los pares de unidades taxonómicas operacionales o secuencias de ADN, de manera que el árbol filogenético finalmente se construye utilizando las relaciones entre estas distancias, entre los métodos más conocidos están; Método de evolución mínima (ME), Método Neighbor-Joining (NJ) y UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means), sin embargo UPGMA asume siempre una tasa de evolución constante por esta razón no es recomendable usarlo para inferir árboles filogenéticos en aquellos casos en que el conjunto de secuencias no cumple con esta hipótesis, ya que podría no reflejar necesariamente una historia evolutiva (Sandria, 2003).

5.2.4. Crecimiento microbiano

El crecimiento se puede considerar como el aumento ordenado de todos los constituyentes químicos de un organismo, lo cual, para los organismos unicelulares, conduce a un aumento en el número de individuos en la población. Se puede considerar el crecimiento al nivel de individuos dentro de una población (ciclo celular) o el crecimiento de poblaciones celulares (ciclo de crecimiento). En un medio de apoyo para el crecimiento adecuado, los microorganismos unicelulares aumentan de tamaño y, por último, se dividen en dos por un proceso de fisión binaria o gemación (Crueger & Crueger, 1989).

Es importante distinguir entre el crecimiento de células individuales y el crecimiento de poblaciones, ya que en los microorganismos debido a su pequeño tamaño no se hacen estudios de crecimiento individual sino estudios de crecimiento de poblaciones. El crecimiento de una población es el aumento del número de células como consecuencia de un crecimiento individual y posterior división. El crecimiento de una población ocurre de una manera exponencial. El crecimiento exponencial es una consecuencia del hecho de que cada célula se divide dando dos (2) células

hijas, las cuales al dividirse darán cada una dos células hijas, así es que en cada período de división la población se duplica (Pedrique & De Castro, 2008).

La velocidad de crecimiento exponencial se expresa como tiempo de generación (G) y este se define como el tiempo que tarda una población en duplicarse. Los tiempos de generación varían ampliamente entre los microorganismos, algunos crecen rápidamente y presentan tiempos de generación de unos 30 minutos y otros tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días (Pedrique & De Castro, 2008).

Se designa como:

$$\begin{aligned}
 x &= N^0 \text{ de bacterias al tiempo } 0 \\
 y &= N^0 \text{ de bacterias al tiempo } t \\
 t &= \text{tiempo de crecimiento exponencial}
 \end{aligned}$$

A tiempo 0 $y = x$

Después de:

1 generación $y = x * 2$

2 generaciones $y = (x * 2) * 2 = 2^2 x$

3 generaciones $y = (2^2 x) * 2 = 2^3 x$

n generaciones $y = (2^n x)$

Para calcular n = (número de generaciones)

Resolviendo la ecuación (1) para n se tiene: $\log y = \log x + n \log 2$

$$n = \frac{\log y - \log x}{\log 2}$$

Si se sustituye en la ecuación anterior $\log 2$ por su valor 0.3010, se tiene que:

$$\frac{1}{0.3010} = 3.3n = 3.3 \log y/x$$

Por consiguiente, aplicando la ecuación anterior puede calcularse el número de generaciones que han tenido lugar, siempre que se conozca la población inicial "x", y la población "y" después del tiempo "t".

El tiempo de generación G es igual a t (tiempo transcurrido en fase exponencial para llegar de X a Y) dividido por el número de generaciones n, o sea:

$$G = t/n$$

✓ **Medición del crecimiento microbiano**

Existen varios métodos para medir el crecimiento de células microbianas, entre los cuales tenemos: Peso seco celular, absorción, peso húmedo, volumen de células empacadas, número de células, masa de un componente celular, etc.

a. Peso seco celular

El método más usado para medir el crecimiento microbiano es secar volúmenes conocidos de cultivo celular lentamente hasta obtener un peso constante. Cuando se trata de células que sedimentan rápidamente, como levaduras, esto usualmente implica centrifugación ($4,6 \times 10^3$ rpm). Luego las células concentradas se colocan en una estufa a 90°C o a 105°C hasta obtener un peso constante. El peso de las células secas usualmente se expresa en términos de g/L. En las determinaciones de peso seco celular existen fuentes de error importantes debido a la absorción de humedad atmosférica por las células secas y los tubos de centrífuga o las membranas durante el enfriamiento. Esto se puede evitar al enfriar en un desecador o mediante la determinación de la cantidad de agua absorbida por las membranas o tubos y con la corrección adecuada del peso medido (Crueger & Crueger, 1989).

b. Absorción

A menudo se obtiene ventaja del hecho de que, en una celda espectrofotométrica, las células microbianas desvían la luz, de modo que la cantidad de ésta que llega al detector del espectrofotómetro está relacionada directamente con el número de células presentes en la muestra del cultivo de acuerdo a la Ley de Beer. Por lo general, se emplean longitudes de onda alrededor de 600 nm. Es importante entender que como la absorbancia es afectada por el tamaño y la forma de las células, la relación entre la absorbancia y el número de células cambia si el tamaño o la forma de ésta cambian durante el crecimiento del cultivo (Crueger & Crueger, 1989).

c. Peso húmedo

Este quiere decir simplemente la centrifugación o filtración del cultivo seguida por el pesado directo. Aunque es un método extremadamente rápido, es importante estandarizar correctamente el procedimiento, ya que se mide el agua tanto intracelular como extracelular, lo cual puede causar errores considerables (Crueger & Crueger, 1989).

d. Volumen de células empacadas

Mediante la centrifugación de muestras del cultivo en tubos de centrífuga graduados se puede determinar rápidamente el volumen de células empacadas. Este método es muy inexacto, especialmente cuando se miden pequeños cambios en la población celular (Scragg, 1996).

e. Número de células

El crecimiento se puede determinar también en términos de número de células por litro. El número total de células se puede medir colocando muestras de cultivo adecuadamente diluidas sobre portaobjetos de microscopios graduados como los de Herber o los hematocitómetros y contando el número de células con la ayuda de un microscopio. Aunque este método es relativamente rápido y exacto no distingue entre células viables y no viables, también muy agotador; sin embargo, se cuenta con contadores de células automáticos (Crueger & Crueger, 1989).

f. Masa de un componente celular

En los casos donde se dificulte el uso de otros métodos, la cantidad de un componente celular, la cual es una cantidad constante del peso seco total, se puede usar para estimar la concentración de células o de biomasa. Se han usado componentes como el nitrógeno, proteína, RNA, DNA y ATP celulares. Pueden surgir dificultades, ya que varía la cantidad de estos componentes en la célula, a menudo considerablemente, durante el crecimiento de las células, especialmente cuando las condiciones de éste son diferentes (Scragg, 1996).

g. Mediciones físicas

El crecimiento de las células microbianas va acompañado siempre de generación de calor. Recientemente se demostró que hay una relación directa entre la cantidad de calor producido y la concentración de biomasa. Este método es directo, no requiere de muestreo y es instantáneo, pero es más adecuado para biorreactores a gran escala, puesto que la cantidad de calor generado en escala pequeña puede ser demasiado pequeña para ser adecuada. Para cultivos aeróbicos es posible medir la rapidez de captación de oxígeno, ya que se ha demostrado que está directamente relacionada con la concentración de biomasa. Es obvio que este método no es adecuado para cultivos anaeróbicos (Crueger & Crueger, 1989).

✓ Cinética de crecimiento microbiano

El conocimiento de la cinética y producción de metabolitos es fundamental en el tratamiento cuantitativo de los procesos de fermentación. El conocimiento de la cinética de un cultivo permite la predicción del transcurso de la fermentación, la evaluación de velocidades, rendimientos y productividades y entrega información útil para establecer las estrategias de producción y optimización del proceso (Scragg, 1996).

El comportamiento cinético de una población está determinado por un conjunto de factores genéticos y ambientales. Entre estos últimos destacan las condiciones de operación (composición del medio, temperatura, pH y otras) y la modalidad de cultivo entre las que distinguimos el cultivo por lotes y el cultivo por lotes alimentados o semicontinuo. El cultivo por lotes se define como aquel que se realiza sin intercambio de materia con los alrededores, salvo lo referente a los gases (aireación, producción de dióxido de carbono y otros) que se suministran y retiran del sistema en forma continua. En esta modalidad de cultivo se adicionan inicialmente los nutrientes y luego se inocula con una determinada cantidad de células viables, que produce una serie de eventos característicos denominada Curva de Crecimiento, la cual se representa por una gráfica del peso seco celular o biomasa (x), (g/L) contra el tiempo de incubación en horas (t), tal como se muestra en la figura (Scragg, 1996).

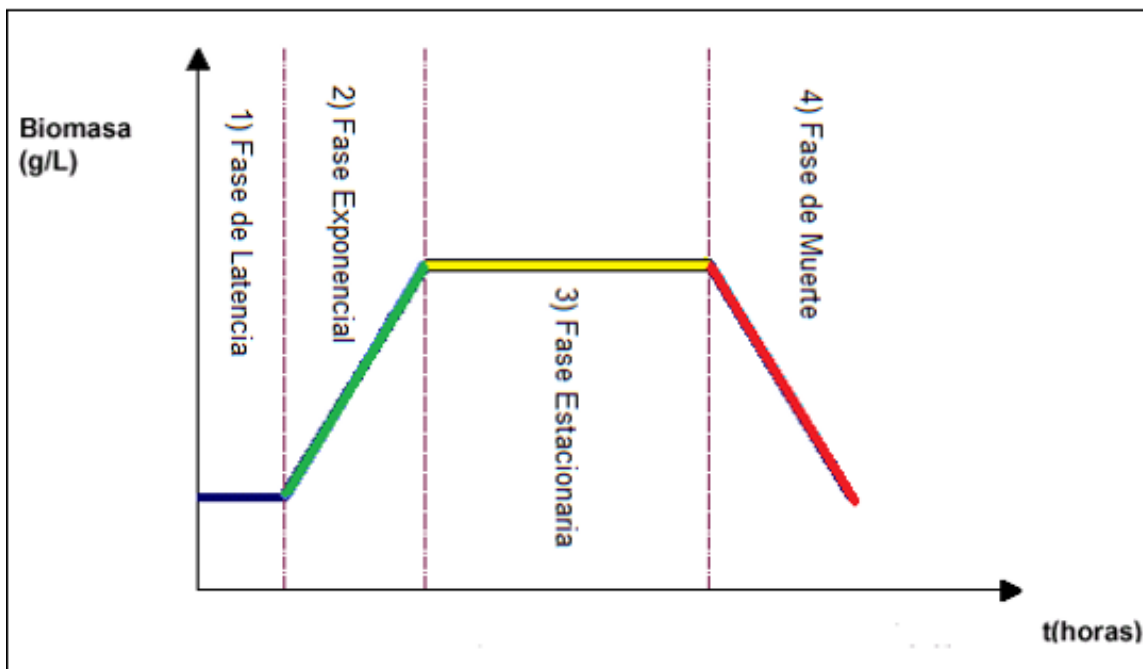


Figura 10. Curva de Crecimiento en un cultivo por lotes.

Fuente: Scragg, 1996.

✓ Fases de crecimiento microbiano

a. Fase de latencia

Cuando una población bacteriana es inoculada en medio fresco, el crecimiento usualmente no comienza de inmediato sino después de un tiempo llamado de latencia, que puede ser corto o largo dependiendo de las condiciones.

La fase de latencia representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente.

En esta fase no hay incremento en el número de células, pero hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células.

Si un cultivo que está creciendo en fase exponencial es inoculado al mismo medio de cultivo bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa fase de latencia y el crecimiento exponencial sigue a la misma velocidad. Si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, generalmente se presenta la fase de latencia esto se debe a que las células generalmente agotan una serie de coenzimas esenciales u otros constituyentes celulares y se requiere cierto tiempo para su resíntesis. También se observa latencia cuando el inóculo está formado por células que han sido dañadas, pero no muertas, bien sea por tratamiento con calor, radiaciones o sustancias químicas, puesto que requieren reparar dicho daño.

b. Fase exponencial o fase logarítmica

Es el período de la curva de crecimiento en el cual el microorganismo crece exponencialmente, es decir que cada vez que pasa un tiempo de generación la población se duplica. Bajo condiciones apropiadas la velocidad de crecimiento es máxima. Las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo, etc.) afectan a la velocidad de crecimiento exponencial.

c. Fase estacionaria

En cultivos en recipientes cerrados una población no puede crecer indefinidamente en forma exponencial. Las limitaciones del crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por una combinación de las causas anteriores. Este periodo durante el cual cesa el crecimiento se conoce como fase estacionaria.

d. Fase de muerte

Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero va a comenzar una disminución progresiva en el número de células viables y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte.

5.3. ANTAGONISMO MICROBIANO PARA EL CONTROL FITOSANITARIO

El antagonismo microbiano está dado por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos negativos a la otra. Para determinar el efecto antagónico entre dos especies microbianas se realizan ensayos inmunológicos en donde se muestran en un medio sólido la actividad productora de metabolitos tóxicos de una cepa antagónica hacia la que es sensible (Pérez *et al.*, 2014).

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrollen la enfermedad. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas (Fernández & Vega, 2001).

La utilización de microorganismos en el control biológico de enfermedades de las plantas constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y productos químicos (Whipps, 2001). Los controladores biológicos no solo actúan en la planta viva, también extienden sus efectos a la etapa pos cosecha y a los productos almacenados. A diferencia de los agroquímicos los agentes de biocontrol son biodegradables (Orberá *et al.*, 2014).

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagónicos con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales. Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrimentos, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia.

Las características óptimas que debe poseer un antagonista microbiano útil en cultivos vegetales son las siguientes: ser genéticamente estable, eficaz a bajas concentraciones, hábil para sobrevivir condiciones adversas del medio ambiente, incluyendo refrigeración y almacenamiento controlado, resistente al ataque de hiperparásitos, efectivo para una amplia gama de microorganismos patógenos en una variedad de frutas y hortalizas, fácil de producir en medios de bajo costo, resistente a los fungicidas, compatible con procedimientos de procesos comerciales, poder establecerse con rapidez para minimizar la destrucción realizada por la plaga, no ser patogénico en el hospedero y que no produzca metabolitos secundarios dañinos a la salud humana (Bautista, 2006).

5.3.1. Género *Bacillus* como biocontrolador de enfermedades

En fitopatología tiene gran importancia el antagonismo dado por bacterias saprófitas con especies de hongos. Entre las bacterias más estudiadas como antagonistas de fitopatógenos se encuentran las del género *Bacillus* (Fernández & Vega, 2001). Estos microorganismos se caracterizan por ser bacterias Gram positivas con forma bacilar, aerobias estrictos o anaerobias facultativas que en condiciones estresantes forman una endospora central, que deforma la estructura de la célula. Esta forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes. Esta bacteria es capaz de generar un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos, en donde se encuentran la producción de sustancias antibióticas, producción de lipopéptidos que actúan como biosurfactantes, solubilización de fosfatos y reducción de enfermedades en las plantas (Kokalis *et al.*, 2006).

Las especies del género *Bacillus* poseen características especiales que los hacen buenos candidatos como agentes de control biológico. Su utilización para el biocontrol de las enfermedades de las plantas es de gran interés, debido a la capacidad que presentan estas bacterias para producir antibióticos y otras sustancias con capacidad antibacteriana y antifúngica que impiden el establecimiento de patógenos vegetales. El rápido crecimiento que muestran estas bacterias en cultivo líquido, la formación de endosporas resistentes al calor y la desecación, y la producción de metabolitos secundarios son características que permiten considerar a estos microorganismos como potenciales agentes de control biológico (Shoda, 2000).

Estas bacterias formadoras de endosporas actúan directamente en el enfrentamiento de organismos fitopatógenos, mediante la producción extracelular de antibióticos, toxinas, enzimas hidrolasas y lipopéptidos antimicrobianos. Los lipopéptidos de origen bacteriano ejercen una amplia acción antifúngica, antibacteriana y antiviral, y además constituyen moléculas efectoras que activan los mecanismos de resistencia inducida en plantas (Orberá *et al.*, 2014).

Dentro de las especies de *Bacillus* que han mostrado actividad antifúngica in vitro sobresalen *Bacillus thuringiensis* contra *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia grisea*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani* (Knaak *et al.*, 2007), *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Colletotrichum* (Kim & Chung, 2004); *Bacillus subtilis* contra un amplio rango de hongos anamorfos, donde destacan *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.* y *Macrophomina phaseolina* (Melentev *et al.*, 2006) y *Bacillus licheniformis* contra *Curvularia* y *Pyricularia grisea* (Tendulkar *et al.*, 2007).

✓ Actividad antifúngica de *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es una bacteria Gram-positiva de forma bacilar, que forma una endospora central bajo condiciones de estrés, es estrictamente aeróbica; los mecanismos que median en su capacidad antagónica están dados principalmente por la producción de subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas que actúan sobre la pared celular de los hongos.

La especie de *Bacillus subtilis* se puede utilizar a través de la producción extracelular de antibióticos, lipopéptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas como las quitinasas y proteasas. Según Orberá *et al.*, (2014), se ha evidenciado la actividad antifúngica de amplio espectro de *Bacillus subtilis* en el control de hongos fitopatógenos, expresado mediante la creación de metabolitos causantes de alteraciones en la estructura y la ultra estructura fúngica. Otro mecanismo se relaciona con la estimulación de la resistencia sistémica inducida (RSI) de la planta. Maldonado y su equipo evaluaron la acción de *Bacillus subtilis* en la estimulación de la resistencia sistémica inducida (RSI) para proteger la calabacita del virus del mosaico del cohombro, encontrando que las plantas tratadas con el microorganismo mostraron diferencias estadísticas significativas en la concentración de unidades virales, además se ha demostrado que la RSI por *Bacillus subtilis*, no solo es efectiva contra virus, sino también contra hongos y bacterias patógenas (Maldonado *et al.*, 2008).

De acuerdo a Fernández y Vega (2001) *Bacillus subtilis* es uno de los mejores representantes del género *Bacillus*, es un fuerte antagonista y fitoprotector en cultivos de aguacate, tomate, frijol y cebolla, brindando protección contra fitopatógenos como *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* y *Alternaria porri*. Esta amplia capacidad antagonista en parte se debe a los mecanismos usados por *Bacillus subtilis* que le permite una alta efectividad frente a un amplio espectro de hongos filamentosos patógenos.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. UBICACIÓN DEL ESTUDIO

El aislamiento y caracterización microbiana en la búsqueda de *Bacillus subtilis* a partir de bioinsumos comerciales y las pruebas de antagonismos in vitro frente a hongos fitopatógenos se llevaron a cabo en el Laboratorio de Microbiología de las Aguas del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería, ubicado en el Recinto Universitario Simón Bolívar, en la Avenida Universitaria, Managua, Nicaragua; en cuanto a las pruebas de antagonismo en invernadero del bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* en el cultivo de papa variedad Monte Carlo, se realizaron en un invernadero instalado en el mismo Recinto Universitario.

Los microorganismos aislados y seleccionados fueron enviados al Centro de Biología Molecular (CBM) de la Universidad Centroamericana (UCA), donde se contrataron los servicios de secuenciación de ADN genómico. Una vez recibidas las secuencias se continuó con las actividades de bioinformática en el PIENSA-UNI.

6.2. RECOLECCIÓN DE BIOINSUMOS COMERCIALES

Se recolectaron 4 bioinsumos comerciales producidos en dos zonas del país (norte y occidente), en presentaciones líquidas y sólidas. Estos se transportaron de los sitios donde se comercializan al laboratorio de microbiología de las aguas, en el PIENSA-UNI donde se conservaron en el refrigerador hasta su utilización el siguiente día.

6.3. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

El aislamiento de microorganismos se realizó en medios de cultivo sólidos a partir de muestras individuales tomadas de cada bioinsumo recolectado. Para esto se inoculó (sembró) en superficie, por triplicado. Posteriormente se seleccionaron los diferentes tipos de colonias obtenidas y se sembraron por estrías para la obtención de cultivos puros.

6.3.1. Preparación de medios de cultivo

Medio Agar Nutritivo (AN): Se agregaron 23 g de agar nutritivo comercial en un litro de agua destilada.

Agar Plate Count (PCA): Se agregaron 23.5 g de agar plate count comercial en un litro de agua destilada.

Agar Papa Dextrosa (PDA): Se agregaron 39 g de agar papa dextrosa comercial en un litro de agua destilada.

Se sometieron a calentamiento hasta comenzar a hervir en el Hot Plate CORNING PC-620D. Posteriormente se procedió a esterilizar por calor húmedo en autoclave Danfoss Mod. 40/70 a 121°C durante 15 minutos a una presión de 100 kPa. La correcta esterilización se garantizó mediante el uso de cinta adhesiva para el control de autoclave. Finalmente se vació el medio en placas Petri dejándolos solidificar a temperatura ambiente (Figura 11A-D) (Solano, 2006).

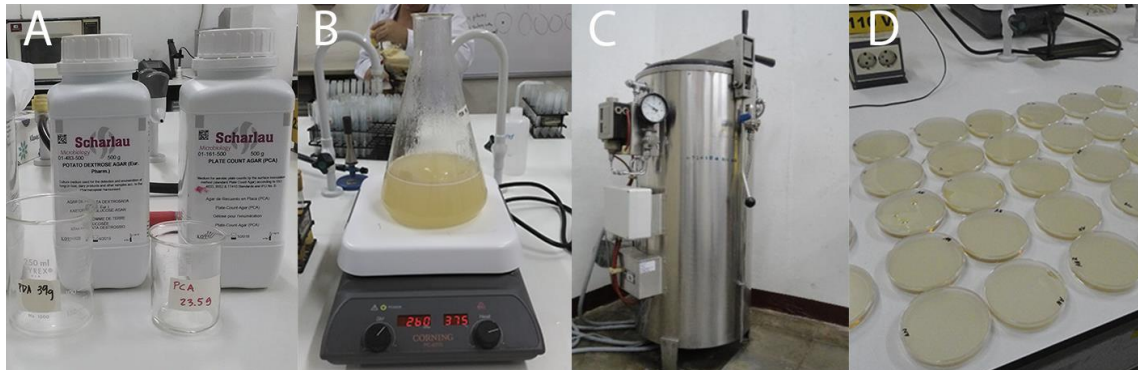


Figura 11. Preparación de los medios de cultivo. A: Medios de cultivo comerciales en sus envases; B: Calentamiento del medio de cultivo en el Hot Plate; C: Esterilización en el autoclave a 121°C durante 15 minutos; D: Placas Petri con el medio de cultivo solidificado.

6.3.2. Inoculación de muestras de bioinsumos (Primera siembra)

Se tomaron muestras representativas de cada bioinsumo para ser inoculadas en tres medios de cultivos. La inoculación (primera siembra en este caso) se realizó por triplicado en placas Petri desechables con Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Plate Count (PCA) y Agar Nutritivo (AN); en los medios PCA y AN se pretendía observar el crecimiento bacteriano, mientras que en el medio de PDA el crecimiento de hongos en general, tanto filamentosos como levaduriformes. La técnica utilizada fue la siembra en superficie por extensión o bañado (Figura 2), ya que se deseaba pescar todos los microorganismos posibles para posteriormente proceder a la selección y aislamiento. Para los bioinsumos sólidos se prepararon filtrados, por medio de la suspensión aséptica de 1 g de muestra de bioinsumos en 5 mL de agua destilada estéril en un tubo de ensayo; en cambio para los bioinsumos líquidos solamente se tomó una muestra de 5 mL, la cual también fue colocada en un tubo de ensayo.

Todos los tubos con las muestras se agitaron en vortex por 20 s; luego se tomó 0.1 mL con una micropipeta (Figura 2A) y se depositó en gotas sobre el medio de cultivo en la placa Petri (Figura 2B), el inóculo se distribuyó sobre toda la superficie del

medio usando una espátula de Digrafsky previamente esterilizada (Figura 2C), finalmente todas las placas se incubaron a 35°C por 24 horas para bacterias y de 7 a 14 días para hongos (Benítez *et al.*, 2007; Badía *et al.*, 2011; Cuervo, 2010; Reinoso *et al.*, 2006).

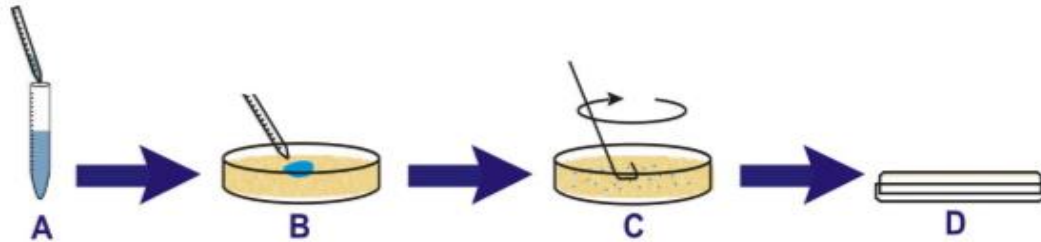


Figura 12. Proceso de inoculación (siembra) por extensión o bañado en superficie.
Fuente: Moreno & Albarracín, 2012.

6.3.3. Selección y aislamiento de microorganismos

La selección y aislamiento se realizó a partir de las colonias obtenidas en la primera inoculación de las muestras. Al tener las placas con crecimiento microbiano en un cultivo mixto se seleccionaron las colonias de bacterias y hongos que poseían características que permitían diferenciarlas macroscópicamente (Figura 3 y 4A). Estas se purificaron por repiques sucesivos hasta observar que todas las colonias en la misma placa eran idénticas. Posteriormente se realizaron las pruebas de tinción de Gram a las bacterias, observación de esporas para hongos filamentosos y tensión simple para los hongos levaduriformes (Badía *et al.*, 2011; Cuervo, 2010).

Para garantizar la calidad de los resultados, todos los procedimientos se realizaron siguiendo las normas de asepsia y limpieza en el laboratorio de microbiología, con la debida desinfección del área de trabajo y la esterilización de los medios y materiales utilizados por calor húmedo (autoclave) o calor seco (horno), respectivamente.

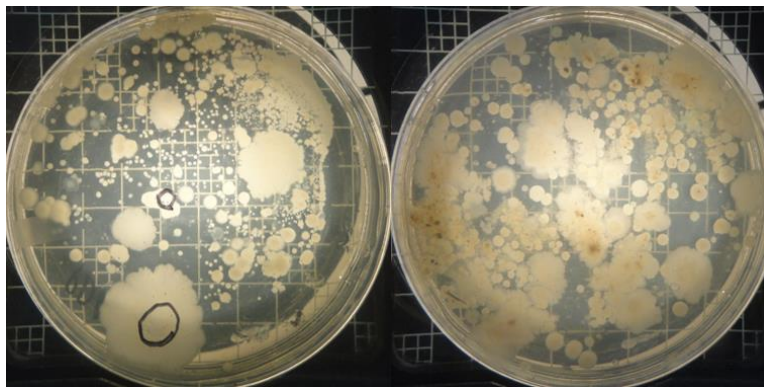


Figura 13. Placas Petri con cultivos mixtos producto de la primera siembra.

Bacterias: Las placas Petri con la primera inoculación (siembra) fueron observadas al contador de colonias con lupa de aumento a las 24 horas de incubación, para seleccionar las colonias bacterianas de características morfológicas (color, borde, textura) distintas. El aislamiento de las colonias seleccionadas se realizó en medio agar nutritivo utilizando la técnica de agotamiento por estrías (Figura 14B), por duplicado. Las placas se incubaron por 24 horas. Los repiques sucesivos o resiembras se realizaron tomando inóculo de las colonias que crecían aisladas en las últimas estrías (Cuervo, 2010).

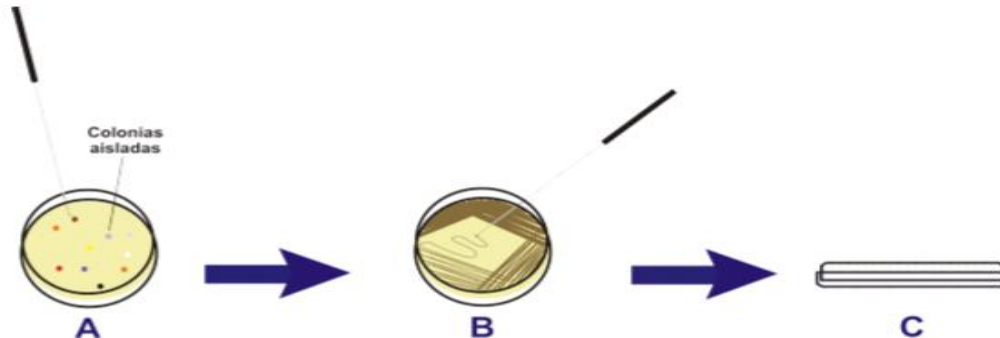


Figura 14. Re inoculación (Resiembra) por agotamiento en estrías de las colonias seleccionadas.

Fuente: Moreno & Albarracín, 2012.

Hongos: Las placas Petri con la primera inoculación (siembra) en medio PDA se revisaron a los 5, 7 y 14 días de incubación, para observar si existía crecimiento de hongos filamentosos y/o levaduriformes. Se seleccionaron las colonias que poseían aspectos y colores distintos de micelio. Los hongos filamentosos se aislaron tomando filamentos o trocitos del hongo con el asa de siembra recta (Figura 15A-B) y las levaduras utilizando el agotamiento por estrías (Figura 14), procurando en ambas tomar de las zonas donde no hubiera contaminación de algún otro microorganismo y sembrándolo por duplicado en medio fresco PDA (Solano, 2006).

Las placas se dejaron en incubación entre 5 y 7 días dependiendo del crecimiento que estos presentaran. Cuando crecían contaminantes se realizaban repiques sucesivos hasta obtener el hongo puro (Figura 15C).

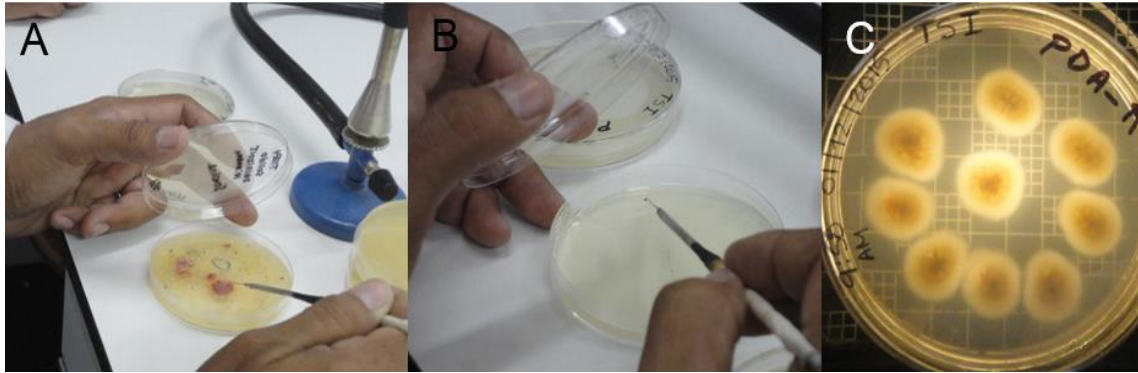


Figura 15. Aislamiento de hongos filamentosos. A) Micelio del hongo tomado con el asa de siembra recta; B) Depósito del hongo en medio PDA; C) Microorganismo aislado.

6.4. APROXIMACIÓN A LA IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLADOS

Para la identificación morfológica de los microorganismos se realizaron observaciones al microscopio de luz OLYMPUS CHT. Se realizó tinción de Gram a las bacterias, observación de esporas para los hongos filamentosos y tinción simple para observar la forma de las células de las levaduras.

6.4.1. Bacterias

Se realizó la tinción de Gram a los aislados de bacterias a las 24 horas de incubación siguiendo el procedimiento descrito por Moreno & Albarracín (2012). Inicialmente se preparó y fijó un frotis (Figura 16A-B), tomando una pequeña parte de la colonia con el asa de siembra, la cual se dispersó en una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos. Luego, usando el asa se extendió homogéneamente la muestra sobre el portaobjetos para formar una capa delgada y uniforme. Simultáneamente el portaobjetos se flameaba sobre la llama del mechero hasta conseguir la sequedad total de éste. Posteriormente se realizó la aplicación de colorantes y decolorantes (Figura 16C) en el siguiente orden: Cristal violeta por 1 minuto, Yodo-Lugol por 1 minuto, Alcohol-acetona durante 20 segundos y Safranina por 1 minuto. Luego de cada aplicación se lavaba suavemente con agua para eliminar el exceso. Finalmente se dejó secar y se observó en el microscopio (OLYMPUS) con el objetivo 100X y aceite de inmersión (Figura 16D). Esta técnica nos permitió determinar si las bacterias aisladas eran Gram positivas o Gram negativas, así como la forma de las colonias si eran coccas, bacilares, esféricas, etc.

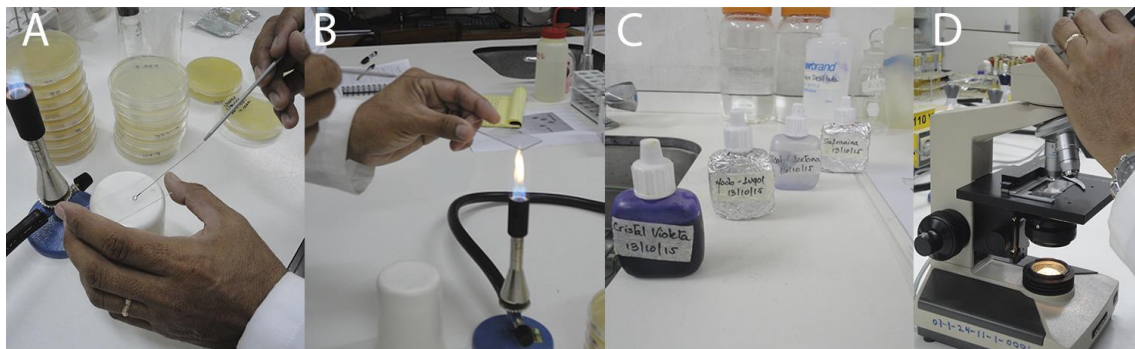


Figura 16. Tinción Gram en bacterias. A) Preparación del frotis en un portaobjetos; B) Fijación del frotis con calor; C) Recipientes de los colorantes, solución mordiente y decolorante utilizados en la tinción de Gram; D) Observación en el microscopio con objetivo 100x.

6.4.2. Hongos

Filamentosos: En el caso de los hongos filamentosos se realizó la observación de esporas al microscopio con objetivo de 50X, utilizando la técnica de impresión con cinta adhesiva transparente; para ello, los hongos se dejaron en esporulación a temperatura ambiente del laboratorio ($28^{\circ}\text{C} \pm 1$) en las placas Petri con medio PDA, entre 7 y 14 días. Posteriormente, para la observación morfológica se realizó un montaje con cinta adhesiva transparente presionando un trozo de cinta suavemente sobre la superficie del hongo y colocándola sobre un portaobjetos (Moreno & Albarracín, 2012).

Levaduriforme: Para los aislados de hongos levaduriformes, se realizó tinción simple con cristal violeta. En una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos se colocó una pequeña muestra de la colonia con el asa de siembra. Posteriormente se colocó una gota de cristal violeta y se cubrió con un cubreobjetos. Finalmente se observó en el microscopio de luz con los objetivos 40X y 100X (Moreno & Albarracín, 2012).

6.5. CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS AISLADOS

Los microorganismos se conservaron usando el método de transferencia periódica, que consiste en transferir el microorganismo a un medio de cultivo fresco y nutritivo a intervalos que aseguren la viabilidad del mismo (Hernández & Loaiza, 2014). La transferencia se realizó en medio LB para bacterias y PDA para hongos filamentosos y levaduriformes. Los intervalos entre cada transferencia fueron de un mes. Los subcultivos se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 10°C .

6.6. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS MICROORGANISMOS SELECCIONADOS

Se llevó a cabo a través de la secuenciación parcial del gen ADN ribosomal 16S para bacterias e ITS 1 (Internal Transcribed Space) para hongos (Álvarez *et al.*, 2013), estos genes son una alternativa para buscar la información filogenética y taxonómica de microorganismos (Jiménez, 2007). La comparación de las secuencias del gen ADNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre organismos procariotas, de forma similar la región ITS permite hacer lo mismo en eucariotas (Rodríguez, 2013). El servicio de secuenciación de ADN se realizó en el Centro de Biología Molecular (CBM) de la Universidad Centroamericana (UCA). Luego de recibir los electroferogramas (secuencias de bases ofrecidas por los secuenciadores) con la secuencia de bases (Adenina, Guanina, Citosina, Timina), se procedió a trabajar en la bioinformática y análisis de las secuencias para la obtención de los árboles filogenéticos siguiendo los pasos que se describirán a continuación. Esto nos permitió identificar a nivel de especie la mayoría de los microorganismos seleccionados.

6.6.1. Corrección de las secuencias

Los electroferogramas (Figura 17) recibidos fueron corregidos visualmente usando el programa Bioedit v7.0.9. La observación del electroferograma constituye el primer paso del análisis de las secuencias. Algunas veces se producen errores durante la secuenciación y se reflejan en el electroferograma y la secuencia; por ejemplo, asignación de dos T existiendo 3, o posiciones ambiguas (N) (Bou *et al.*, 2011). Se observó la secuencia de bases, donde se editaron los errores producidos por el secuenciador. Posteriormente se guardaron en formato FASTA (Figura 18).

Es importante revisar los electroferogramas antes de continuar con los análisis de la muestra debido a que nos dan mucha información, incluyendo la calidad de la PCR y por ende la confiabilidad de los datos obtenidos (Márquez *et al.*, 2013).

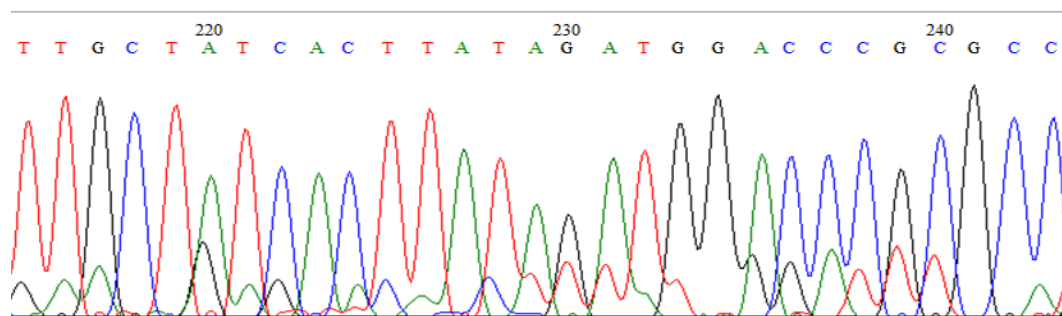


Figura 17. Electroferograma corregido con el uso de Bioedit v7.0.9.

```

>gi|530722907|gb|KF322037.1| Bacillus subtilis strain GPSSC 16S ribosomal RNA gene
AAGAGCATTTGGGCCTTGCCTTAATAATGGCAAGTTCGAGCGGACAGATGTGGAGCTTGCTCCCTGATGT
TAGCGGCGGACGGGTAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG
CTAATACCGGATGTTGTTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGAT
GGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGT
TGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGC
TCGACGGCGGTTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAGTGGGG
AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCT
GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGGTGCAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACAT
CCTCTGACAATCTAGAGATAGGACGTCCCTTCGGGGGAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTC
GCTCGTGTGCGTAGATGTTGGGTTAAGTCCCACAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCA
GTTGGGCACTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCC
AATCCACAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACGACCGGCCAAAGATCGGCTA
CCCCAACCGGGGAAGG

```

Figura 18. Secuencia nucleotídica en formato FASTA.
Fuente: NCBI.

6.6.2. Comparación de las secuencias

Se obtuvieron de la base de datos del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) secuencias de las regiones estudiadas de hongos y bacterias relacionadas taxonómicamente con los microorganismos, utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar secuencias altamente similares, de cada secuencia parcial del gen 16S para bacterias e ITS para hongos (Castillo-Reyes, *et al.*, 2015).

La introducción de la secuencia y su comparación con otras disponibles en la base de datos con la cual se trabaja, proporciona un informe constituido por varias secciones. En el caso del programa BLAST del GenBank, en la primera sección aparece un gráfico que indica el nivel y el tamaño de los fragmentos alineados, seguido de un listado en orden decreciente de las secuencias de microorganismos con los que se muestra la identidad (% de coincidencia) (Figura 19). En la siguiente sección, aparece cada alineamiento de la secuencia problema o query frente a cada secuencia de otro microorganismo, indicando el número y porcentaje de bases idénticas (identity) (Bou *et al.*, 2011).

Se seleccionaron las cinco secuencias que presentaban mayor Identidad y frecuencia con la secuencia del microorganismo en estudio.

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain GPSSC 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	850	850	99%	0.0	92%	KF322037.1
<input type="checkbox"/> Bacillus tequilensis strain PSBL12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	850	850	97%	0.0	93%	JX979116.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain WR-W2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	848	848	91%	0.0	94%	FJ222553.1
<input type="checkbox"/> Bacillus tequilensis strain ARC340 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	845	845	97%	0.0	92%	KJ381139.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain 30P3-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	843	843	91%	0.0	94%	JN366775.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. hb30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	841	841	96%	0.0	93%	KF863830.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. BAB-3444 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	841	841	96%	0.0	93%	KF917174.1
<input type="checkbox"/> Bacillus malacitensis strain ARC036 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	839	839	98%	0.0	92%	KJ381109.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. RB8U4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	839	839	98%	0.0	92%	GU366216.1
<input type="checkbox"/> Bacillus subtilis strain 9407 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	837	837	98%	0.0	92%	KX281183.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. J-30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	837	837	97%	0.0	92%	KP966467.1
<input type="checkbox"/> Bacillus sp. J-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	837	837	96%	0.0	92%	KP966461.1
<input type="checkbox"/> Bacillus tequilensis strain OTEB57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	837	837	96%	0.0	92%	KT265081.1

Figura 19. Listado de secuencias de microorganismos con mayor porcentaje de identidad respecto a la secuencia en estudio mostrado por BLAST.

Fuente: NCBI.

6.6.3. Alineamiento de secuencias

Se realizó un alineamiento múltiple con las cinco secuencias elegidas para cada secuencia en estudio, utilizando la aplicación Clustal W Multiple alignment versión 1.4 incluida en el menú Accesory Application del programa Bioedit v7.0.9 (Figura 20) y se utilizaron los parámetros por defecto (Rodríguez, 2013). Posteriormente se repitieron los pasos de comparación de la secuencia alineada en el BLAST y la selección de las cinco secuencias con mayor identidad para ser guardadas en formato FASTA.

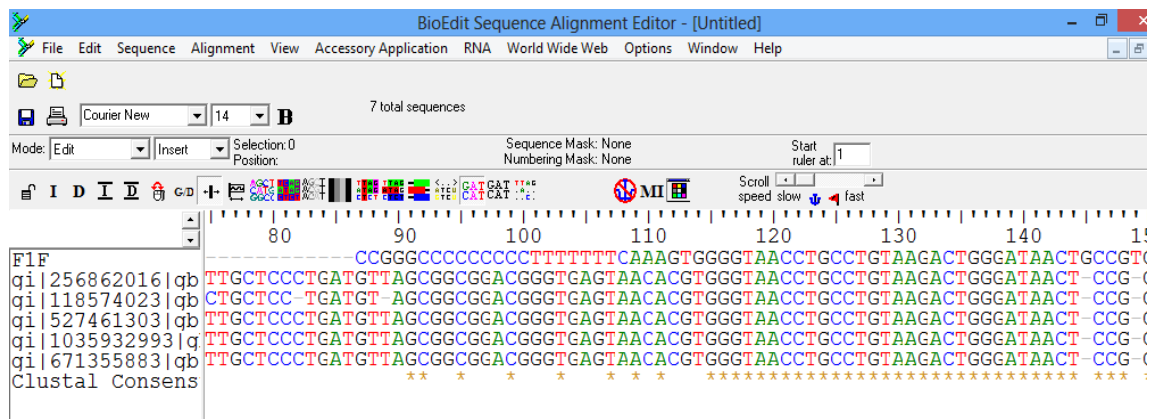


Figura 20. Ventana mostrada en el alineamiento múltiple usando Clustal W versión 1.4 incluido en el programa Bioedit v7.0.9.

6.6.4. Construcción de árboles filogenéticos

Se utilizó el programa MEGA 7.0.14 para la construcción de los árboles filogenéticos, usando el método Neighbor-Joining Tree, evaluando la confiabilidad haciendo bootstrapping de 1000 repeticiones, teniendo en cuenta que cada rama se deberá repetir como mínimo en el 50% de las veces (Bou *et al.*, 2010; Castillo-Reyes *et al.*, 2015; Tamura *et al.*, 2011 citado por Rodríguez, 2013 y Álvarez *et al.*, 2013).

6.7. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTAGÓNICO

6.7.1. Pruebas de antagonismo in vitro

Se realizó una preselección de bacterias con potencial antagónico de los fitopatógenos (screen grueso). Posteriormente se determinó el efecto antagónico de las bacterias seleccionadas mediante la técnica de confrontación dual (screen fino).

✓ Hongos fitopatógenos utilizados en las pruebas

Se utilizaron cinco aislamientos nativos, uno de *Alternaria* y cuatro de *Fusarium*. *Alternaria* fue aislado de hojas de papa (*Solanum tuberosum* L) provenientes de cultivos de papa de fincas en Jinotega; las cepas F9 y F15 aisladas de maní (*Arachis hypogaea*) pertenecientes a la colección de aislados del Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agroecología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-León); M121 y M311 aisladas de papa (*Solanum tuberosum* L) facilitadas por el Programa Institucional Agropecuario y Agroindustrial de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI). A todos los hongos se les realizó observación de las características morfológicas en placa y al microscopio de luz y comparación con la literatura. Posteriormente fueron identificados vía molecular para definir con que especies se estaba tratando.

✓ Preselección de aislados como potenciales antagonistas (screen grueso)

La metodología utilizada para este ensayo fue la empleada por Benítez *et al.*, (2007), con algunas modificaciones. Se inocularon dos aislados bacterianos distintos (Previo a su identificación) en placas Petri con PDA haciendo dos líneas paralelas, cada una a 1 cm de distancia del borde de la placa Petri (Figura 21). Seguidamente, se colocó un explante del hongo fitopatógeno en el centro de la placa y se incubó a temperatura ambiente (28°C) hasta observar algún efecto sobre el crecimiento del fitopatógeno. Esto permitió realizar un screen grueso de los 23 aislados bacterianos de los bioinsumos y 3 aislados bacterianos de ciego de pollo (controles positivos) suministrados por el Laboratorio de Microbiología de la

Universidad Nacional Agraria (UNA) frente a 3 de los hongos fitopatógenos *Alternaria* y *Fusarium* aislados de los cultivos de papa (*Solanum tuberosum* L) y maní (*Arachis hypogaea*). Se seleccionaron las bacterias que mostraron un efecto en la inhibición del crecimiento micelial de uno o varios hongos fitopatógenos.

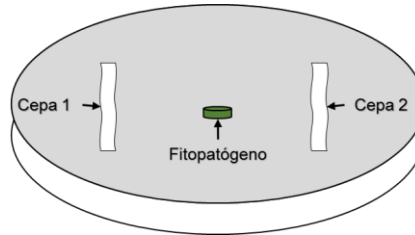


Figura 21. Colocación de los microorganismos a utilizarse en la preselección.

✓ **Evaluación del efecto antagónico in vitro haciendo énfasis en la búsqueda de *Bacillus subtilis***

El efecto antagonista se determinó por medio de la técnica de confrontación dual entre los antagonistas y los fitopatógenos (Figura 22A) (Tejera *et al.*, 2012; Badía *et al.*, 2011; Corrales *et al.*, 2011). En placa Petri con medio PDA, las bacterias seleccionadas (en la etapa anterior) se sembraron por estrías en toda la superficie del medio, se incubaron por 24 horas a 35°C. Posteriormente se colocó en el centro un disco de 0.5 cm de diámetro del fitopatógeno con 7 días de crecimiento previo y se incubó a 28°C, hasta que el testigo con el hongo (Figura 22B) y sin bacteria llenara la placa Petri.

Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. La variable medida fue el diámetro de crecimiento radial del hongo fitopatógeno en presencia del antagonista bacteriano. Como control negativo o testigo se utilizaron placas donde se encontraban únicamente los hongos evaluados; con las mediciones obtenidas se determinó el porcentaje de inhibición, utilizando la Ecuación 1 de Badía *et al.*, (2011) y la tasa de crecimiento micelial en centímetros por día mediante la Ecuación 2 sugerida por Mead *et al.*, (1993).

• **Ecuación 1**

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(\frac{(D.C.C - D.C.P)}{D.C.C} \right) \times 100$$

Dónde:

D.C.C: Diámetro de la colonia control (testigo) (cm).

D.C.P: Diámetro de la colonia problema (hongo en presencia de los antagonistas) (cm).

- **Ecuación 2**

$$Tasa\ de\ crecimiento = \left(\frac{Cf - Ci}{Tf - Ti} \right)$$

Dónde:

Cf: Crecimiento final (cm).

Ci: Crecimiento inicial, día uno (cm).

Tf: tiempo final de crecimiento (cm).

Ti: tiempo inicial, día uno (cm).

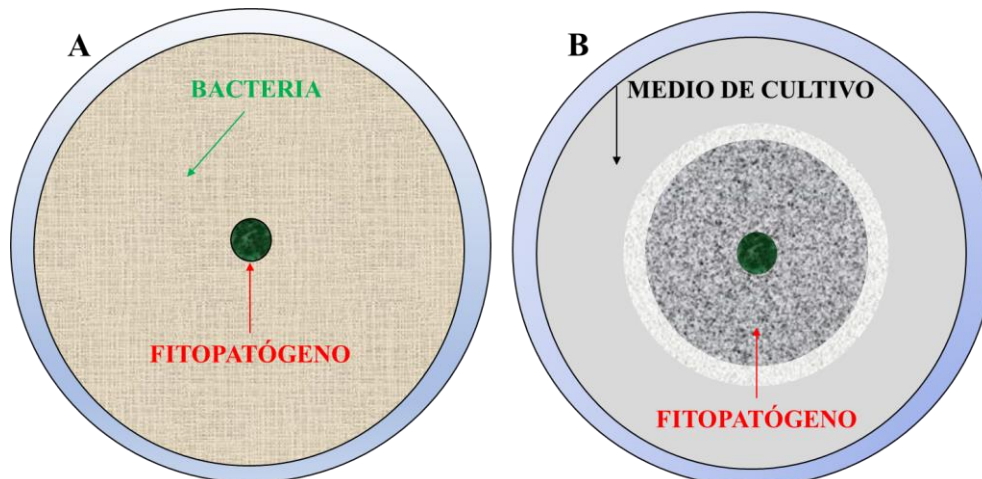


Figura 22. Colocación de los microorganismos en las pruebas de confrontación dual (screen fino). A) Tratamiento Bacteria vs Fitopatógeno; B) Tratamiento testigo con el fitopatógeno sin presencia de bacteria.

6.7.2. Pruebas de antagonismos en invernadero

✓ Selección de la cepa Microbiana

Para la fase de invernadero se utilizó la cepa de *Bacillus subtilis* que expresó los mejores resultados en las pruebas de antagonismo in vitro, presentando los mejores porcentajes de inhibición contra *Fusarium sp*, *Alternaria alternata* y *Fusarium equiseti* (Flores & Roque, 2017; Méndez-Úbeda *et al.*, 2017).

✓ Preparación del pre-inoculo del bioplaguicida

En un frasco de erlenmeyer con capacidad de 200 mL, se preparó una solución de medio de cultivo LB Broth líquido; de una placa Petri que contenía un cultivo de *Bacillus subtilis* con 24 hrs de crecimiento, se tomó una pequeña porción con el asa de siembra y se inoculó en el erlenmeyer con LB Broth, la bacteria se dejó en crecimiento entre 12-16 horas, con agitación constante en un shaker Meyvis TR-125 (Cabeza, 2013; Páramo, 2014).

✓ **Determinación de la cinética de crecimiento microbiano**

Curva de crecimiento de *Bacillus subtilis* por determinación turbidimétrica

Esta medición se realizó utilizando un espectrofotómetro LAMDA BIOXLS UV/VIS, la cual se basa en el hecho de que un cultivo de bacterias actúa como una suspensión coloidal que intercepta la luz que pasa a través de ella (Figura 23A). Dentro de ciertos límites, la cantidad de luz que es absorbida es directamente proporcional a la concentración de células; es decir que la densidad óptica es una medida de la luz absorbida y/o dispersada por la muestra. Para medir turbidez se utilizó una longitud de onda de $\lambda = 540 \text{ nm}$, ya que es sabido que los cultivos bacterianos no presentan una absorción significativa a esta longitud de onda (Cabeza, 2013; Páramo, 2014).

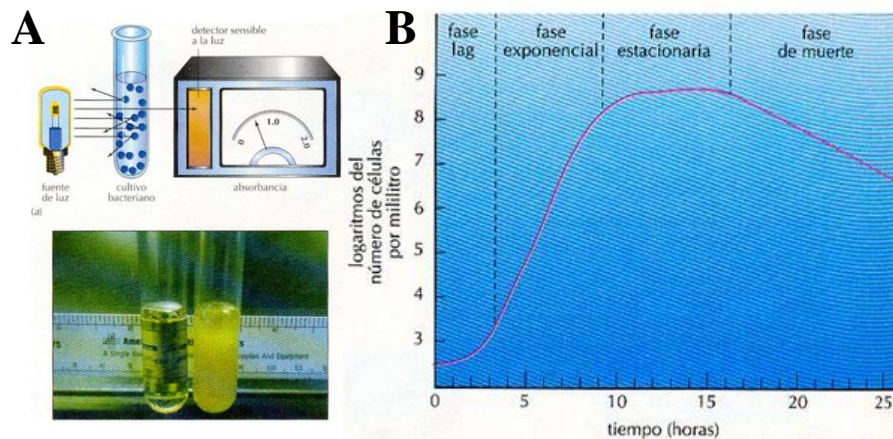


Figura 23. Curva de crecimiento por determinación Turbidimétrica. A) Lectura de absorbancia en espectrofotómetro, B) Curva de crecimiento del microorganismo.

En un shaker de laboratorio Meyvis TR-125, equipado para trabajar con Erlenmeyer de 250 mL se dispuso una muestra y un control con 90 mL del medio de cultivo LB Broth líquido, previamente preparado (Figura 24A). Del pre-inoculo que desde la noche anterior se dejó en crecimiento y se encontró en condiciones metabólicas aptas para ser inoculado a un volumen mayor de medio, se tomaron 10 mL y se inoculó en uno de los Erlenmeyer preparados en el paso anterior y se llevó al Shaker, anotando el tiempo cero y habiendo hecho una primer lectura de absorbancia a 540 nm (Figura 24B). Cada 15 minutos se tomaron 3mL de la muestra a las cuales se les midió la absorbancia (Figura 24C). El experimento inició a las 10:00 am y terminó a las 03:00 pm; obteniendo como resultado la curva de crecimiento bacteriano (absorbancia vs tiempo) (Cabeza, 2013; Páramo, 2014).



Figura 24. A. Muestra en agitación en shaker, B. Colocación de muestra en celda, C. Medición de absorbancia en espectrofotómetro.

✓ **Determinación de la concentración del bioplaguicida (UFC/mL), por el método de diluciones seriadas y vaciado en placa**

Es un recuento de células bacterianas vivas solamente; para esto se prepararon 6 tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, los cuales se marcaron con las diluciones 1×10^{-1} hasta 1×10^{-6} dependiendo la muestra tomada (Figura 25). De cada una de las muestras a las cuales se les midió la absorbancia en el ensayo de curva de crecimiento por determinación turbidimétrica, con ayuda de una pipeta estéril se tomó un 1 mL y se transfirió al tubo de dilución 1:10, mezclando en vortex y descartando la pipeta y repitiendo el proceso hasta la solución 1:1000000; con una nueva pipeta se depositó 0.1 mL de la dilución 1:10000 en una placa Petri previamente etiquetada con el número de muestra y dilución correspondiente y se agregó el medio de cultivo LB (siembra en profundidad)

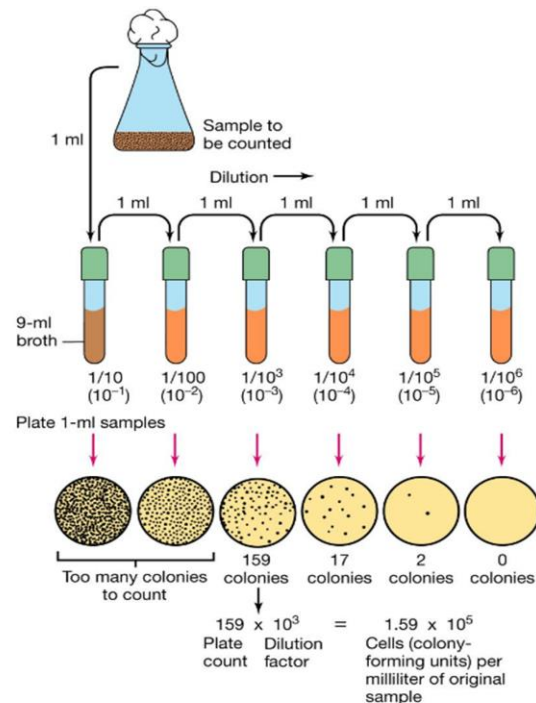


Figura 25. Conteo de bacterias por el método de diluciones y recuento en placa.

Fuente: (Madigan *et al.*, 2006).

esparciendo el inóculo homogéneamente en el medio de cultivo agitando la placa con movimiento oscilatorios; una vez las placas Petri inoculadas el medio de cultivo había solidificado, se dejaron incubando en posición invertida por 12 horas, finalmente se procedió a contabilizar las unidades formadoras de colonia (UFC) de cada placa Petri y tomando en cuenta el factor de dilución, se determinó la concentración en UFC/mL y se obtuvieron como resultados las gráficas de UFC/mL vs Tiempo y UFC/mL vs Absorbancia (Cabeza, 2013; Páramo, 2014).

✓ **Preparación del inóculo de los hongos fitopatógenos utilizados en las pruebas de antagonismo**

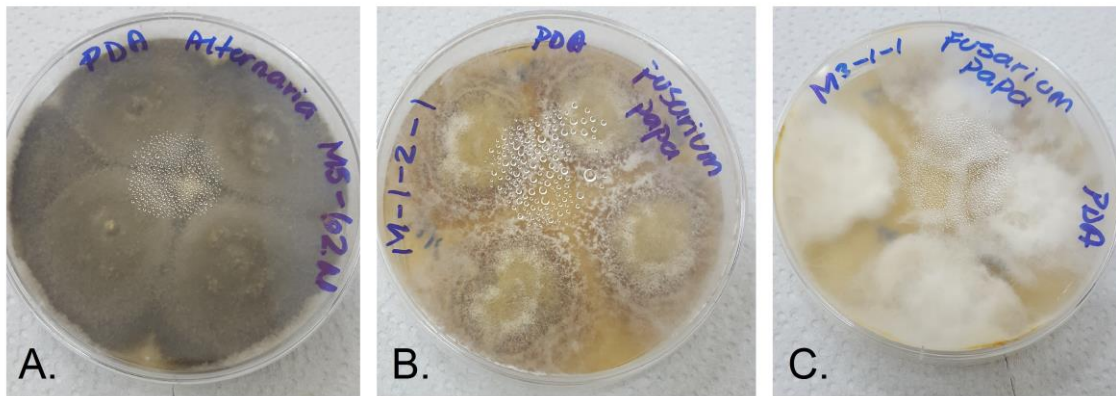


Figura 26. A. *Alternaria alternata*, B. *Fusarium sp.*, C. *Fusarium equiseti*

Se utilizaron cultivos de los hongos fitopatógenos de una semana de crecimiento en PDA (Figura 26), con los cuales se realizó una suspensión de esporas, siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

- 1) Se agregaron 20 mL de agua destilada estéril a las placas Petri que contenían cada uno de los hongos fitopatógenos evaluados.
- 2) Se realizó una suspensión con la totalidad del hongo, raspando la superficie del hongo con un aza estéril (Figura 27A).

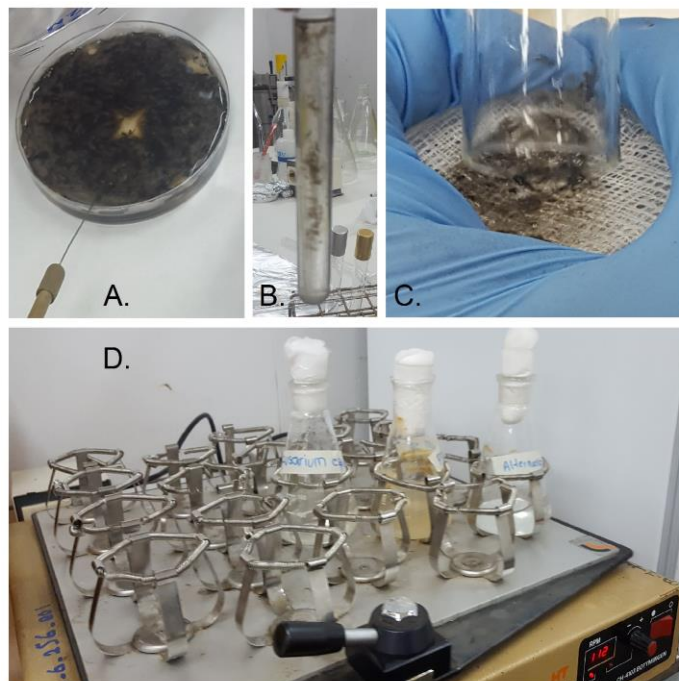


Figura 27. A. Raspado del hongo con una aza; B. Tubo de ensayo con patógeno; C. Filtrado a Erlenmeyer; D. Homogenización en shaker.

- 3) Posteriormente con ayuda de una pipeta, se extrajo la suspensión de esporas de la placa Petri y se depositó en un tubo de ensayo para su homogenización en vortex (Figura 27B).
- 4) Una vez realizada la homogenización se filtró con gasa estéril en un erlenmeyer que contenía 80 mL de agua destilada estéril (Figura 27C).
- 5) Se colocó el erlenmeyer en un shaker Meyvis TR-125 (equipado para trabajar con Erlenmeyer de 250 mL), para su homogenización final (Figura 27D).
- 6) Se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer y se determinó la concentración del inóculo de cada uno de los fitopatógenos como se observa en la Figura 28A-C (Corrales *et al.*, 2012).



Figura 28. A. Cámara de Neubauer con cubreobjetos; B. Llenado de la cámara; C. Observación y conteo en Microscopio.

✓ ***Preparación de las condiciones para las pruebas de antagonismo en invernadero***

Instalación del invernadero

Conociendo los requerimientos óptimos para el cultivo de la papa, se tomaron en cuenta todos estos factores para la instalación del invernadero. El cual se instaló, según las condiciones climáticas de la ciudad de Managua que se encuentra a una altura aproximada de 82.97 msnm y una temperatura promedio de 27°C (Según características generales de los distritos de Managua, Alcaldía de Managua), por lo tanto se debe tener en cuenta el movimiento del aire en el interior del invernadero, el cual es de vital importancia en las zonas tropicales en especial por debajo de los 1000 metros sobre el nivel del mar, donde la alta radiación solar calienta el aire dentro de las estructuras; por lo que utilizando una posición este-oeste (que es la orientación para las zonas cálidas), se facilitó la aireación en el interior del invernadero (Marlow, 2011).

El invernadero utilizado para realizar el estudio fue del tipo túnel, con dimensiones de 3 m de ancho y 7 m largo, conformado por tres arcos de tubos de hierro galvanizado (Figura 29A) y la cubierta externa de malla antiviral y plástico transparente en el techo (Figura 29B), los cuales se sujetaron a la estructura del túnel utilizando lockers y zigzag de hierro galvanizado (Figura 29C). Para evitar el exceso de luz solar, se colocó una malla sarán (30% sombra) también conocida como malla sombra (Figura 29D).



Figura 29. Invernadero tipo Túnel Individual, A. Marco de hierro galvanizado, B. Recubrimiento con malla antiviral, C. Tensado con Lockers y Zigzag, D. Colocación de plástico y malla sarán.

Instalación del riego

Se ha escogido el riego por goteo, ya que es el método más extendido en los cultivos, por su fácil instalación, su reducido costo económico y por su eficiencia. Con este sistema el cultivo recibe las proporciones óptimas de agua (Sela, 2017).

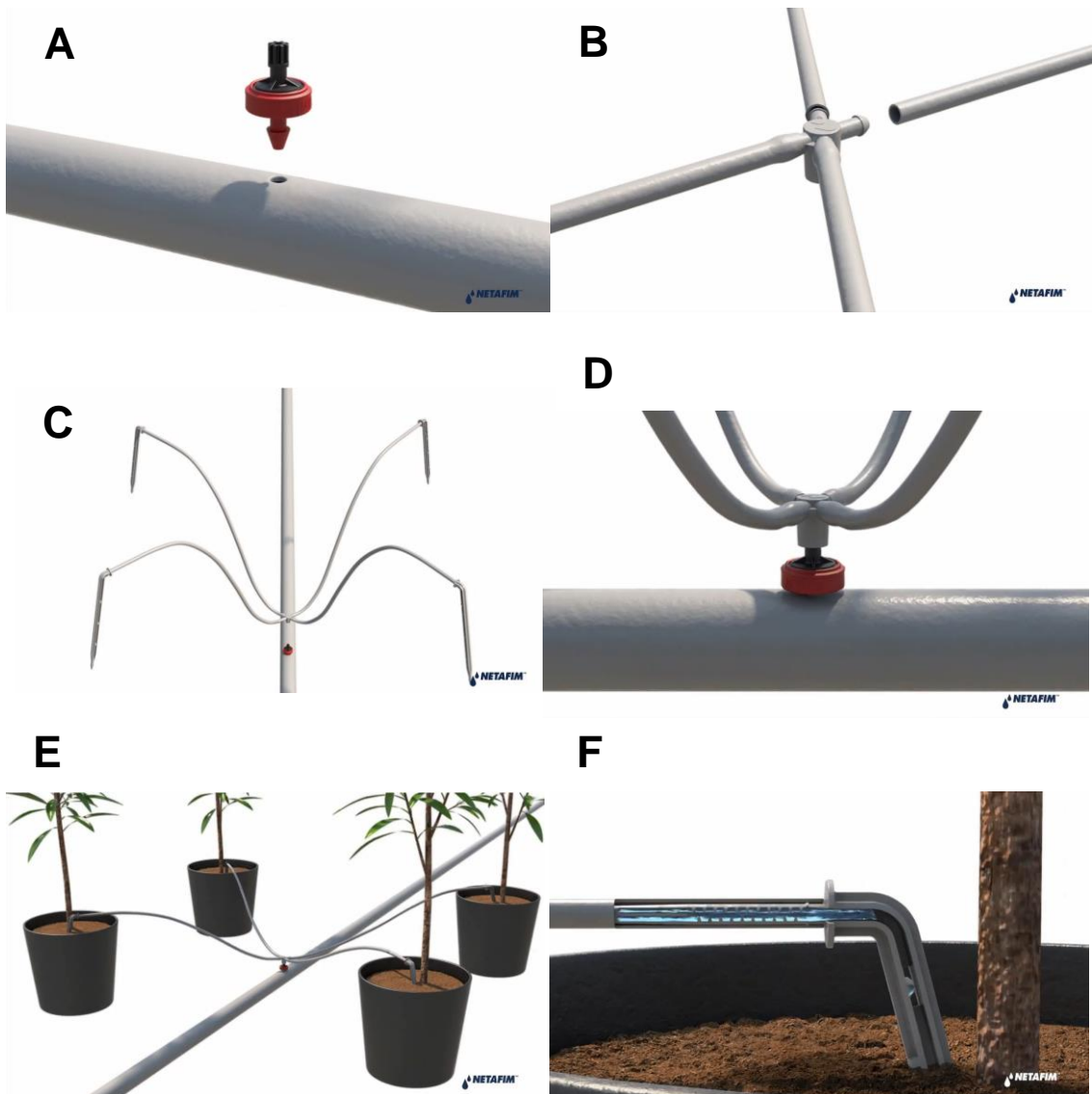


Figura 30. Riego por goteo tipo espagueti. A. Gotero de botón conectado a un lateral de polietileno, B. Conexión de distribuidor y microtubo de 8 mm de diámetro, C. Conexión de goteros de estaca en el microtubo, D. Conexión de los goteros de estaca al gotero de botón, E. Colocación de goteros de estaca en cada macetera, F. Aplicación del agua en cada macetera.

Fuente: Netafim, 2017.

Como se observa en la Figura 30, el sistema de riego instalado fue del tipo espagueti, para lo cual se instalaron goteros de botón de 4 litros/hora sobre un lateral de manguera de Polietileno de 16mm de diámetro (Figura 30A), seguidamente se conectaron microtubos de 8 mm de diámetro en un distribuidor (Figura 30B); al final de cada microtubo se conectaron goteros de estaca de 1 litro/hora (Figura 30C), los cuales se unieron a los goteros de botón por medio del distribuidor (Figura 30D), posteriormente los goteros de estaca fueron distribuidos en las maceteras insertándolos en el sustrato (Figura 30E); finalmente, se suministró

el agua necesaria para el cultivo, a través de los goteros de estaca en las maceteras. (Figura 30F) Netafim, 2017. El sistema de riego estuvo alimentado por la red de agua potable que abastece al Recinto Universitario Simón Bolívar (UNI-RUSB).

Para reducir la temperatura en el interior del invernadero, se colocaron Nebulizadores, los cuales se ubicaron en la parte más alta del mismo, de tal forma que cuando se pusieran a funcionar se creara una neblina que posibilitara disminuir las altas temperaturas en las horas más críticas del día.

Desinfección de semilla de papa

Se utilizó en este experimento, semilla de papa de la variedad Monte Carlo, conocida por ser una variedad de madurez semi-precoz de 85 días, la cual se adquirió en el norte del país en la ciudad de Jinotega. Para su desinfección, los tubérculos se asperjaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3%, seguidamente se lavaron con agua destilada estéril y se dejaron secar sobre papel toalla (Figura 31) (Hernández-Castillo *et al.*, 2008).



Figura 31. Desinfección de semilla de papa.

Preparación y esterilización del sustrato

Se utilizó compost producido en un vivero y arena en proporciones 60 – 40 (60% compost y 40% arena), para obtener una textura que permitiera una buena aireación y retención de humedad. El sustrato preparado con los componentes y las proporciones descritas anteriormente (Figura 32A) y se esterilizo utilizando el método de solarización, para lo cual se cubrió el sustrato con plástico negro (Figura 32C) y se dejó expuesto al sol por 60 días. Con un termómetro digital, se monitoreo las temperaturas alcanzadas en el sustrato (Figura 32D), que permitieran eliminar



Figura 32. A. Homogenización de compost y arena; B. Aumento de humedad del sustrato; C. Recubrimiento del sustrato con plástico negro; D. Medición de temperatura.

cualquier microorganismo presente que pudieran afectar el desarrollo del experimento (Sandoval Villa, 2010).

Preparación y llenado de maceteras

Para este ensayo se utilizaron maceteras plásticas con capacidad de 15 litros, a las cuales se les perforaron 4 ranuras en los costados, con los cuales se pudiera facilitar la observación del crecimiento radicular y la tuberización (Figura 33) (Elhayes, 2017).



Figura 33. Preparación y llenado de maceteras. A. Macetera plástica de 15 lts, B. Perforación de ranuras en los costados, C. Inserción de macetera ranurada en otra macetera sin ranurar, D. Llenado de maceteras con sustrato.
Fuente: Elhayes, 2017.

Siembra

Se depositaron 4 tubérculos semillas en cada macetera, previamente llenadas con una capa de 15 cm de sustrato estéril (Figura 34B), luego se le aplicó el tratamiento correspondiente, en el caso de los tratamientos con hongos se aplicó primeramente el bioplaguicida e inmediatamente después se aplicó el patógeno a tratar. En las maceteras que solo contenían el hongo, se tuvo el cuidado de no aplicar el producto de bioplaguicida en las semillas, posteriormente se cubrieron los tubérculos con una capa más de sustrato estéril (Toledo *et al.*, 2002; Elhayes, 2017).

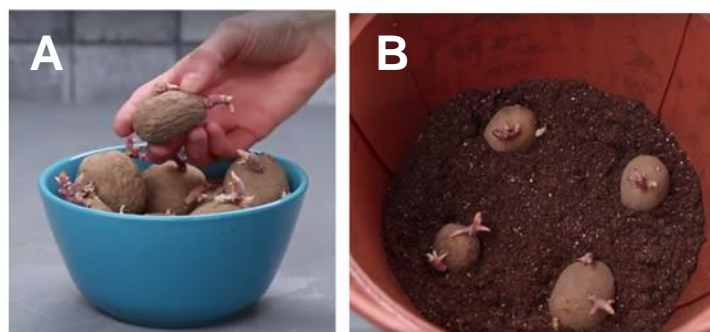


Figura 34. A. Tubérculo semilla; B. Distribución de semilla de papa en la macetera.
Fuente: Elhayes, 2017.

Descripción de los tratamientos

En esta investigación se confrontó el bioplaguicida con cada uno de los hongos fitopatógenos. Asimismo se consideraron testigos positivos, aplicando individualmente cada uno de los hongos fitopatógenos y el bioplaguicida por separado. También se consideró un testigo absoluto sin ninguno de los microorganismos (Figura 35).

T1: *Alternaría alternata* VS Bioplaguicida

T2: *Fusarium* sp VS Bioplaguicida

T3: *Fusarium equiseti* VS Bioplaguicida

T4: *Alternaría alternata*

T5: *Fusarium* sp

T6: *Fusarium equiseti*

T7: Bioplaguicida

T8: Testigo Absoluto

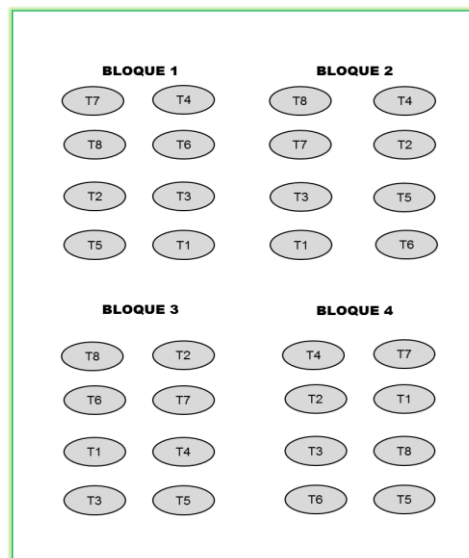


Figura 35. Distribución de tratamientos en el invernadero.

Inoculación de los tratamientos

Bioplaguicida: Para el control de las enfermedades causadas por hongos en el cultivo de papa, se realizó una primera aplicación del tratamiento a base de *Bacillus subtilis* al momento de la siembra, aplicando una lámina del bioplaguicida pulverizada con un atomizador manual (Figura 36D) sobre los tubérculos semilla. Únicamente se inocularon los tubérculos semilla en los tratamientos que se contempló el uso del bioplaguicida, siguiendo la metodología de (Corrales *et al.*, 2012) en cultivo de tomillo y adecuándolo al cultivo de la papa.

Posteriormente, se realizaron aspersiones tanto en la superficie del sustrato como en el área foliar de la planta (tratando de cubrir todo el follaje), aplicando 10 mL y 20 mL respectivamente. En el Cuadro 1, se especifican las fechas de aplicación del bioplaguicida.

Patógenos: Para la aplicación de los hongos fitopatógenos *Alternaría alternata*, *Fusarium* sp y *Fusarium equiseti*, se depositaron 100 mL del inóculo de cada hongo en atomizadores manuales previamente etiquetados con el nombre de cada patógeno (Figura 36A-C). Seguidamente se asperjó cada hongo en el tratamiento

correspondiente, aplicando un volumen de 10 mL en la superficie del sustrato al momento de la siembra y a los 25 Días Después de la Siembra (DDS). Posteriormente se realizaron dos aplicaciones de 20 mL en el área foliar de la planta a los 50 y 75 DDS (Cuadro 1).

Cuadro 1. Lugar y fecha de aplicación de los tratamientos

Lugar	Tratamiento	DDS
Sustrato y semilla	bioplaguicida y patógenos	Siembra
Sustrato	bioplaguicida y patógenos	25
Foliar	bioplaguicida y patógenos	50
Foliar	bioplaguicida y patógenos	75



Figura 36. Aplicación de los tratamientos en atomizadores manuales. Distribución de tratamientos en el invernadero. A. Hongo patógeno *Fusarium equiseti*. B. Hongo patógeno *Fusarium sp.* C. Hongo patógeno *Alternaria alternata*. D. Bioplaguicida *Bacillus subtilis*.

Medición de variables

Severidad: el porcentaje de severidad, corresponde al grado de la enfermedad en aquellas plantas que resultaron infectadas en cada muestreo. Para esta variable se sugiere la siguiente escala (Cuadro 2), tomando en cuenta el porcentaje de daño del área total a los 50, 65 y 75 días después de siembra (Velásquez, 2012).

Cuadro 2. Escala usada para mediación de severidad en los tratamientos

Escala	Descripción	% de infección
0	Sin síntomas en el follaje o raíz	0
1	Necrosis radical leve, sin síntomas en el follaje	20
2	Necrosis radical y clorosis leve del follaje	40
3	Pudrición radical y amarillamiento moderado del follaje	60
4	Pudrición radical severa y amarillamiento severo del follaje	80
5	Muerte de la planta	100

$$\%SEV = \left[\frac{(N_0 \times 0) + N_1 \times 1 + N_2 \times 2 + N_3 \times 3 + N_4 \times 4 + N_5 \times 5}{N_n \times 5} \right]$$

Donde:

N_0 = No. de plantas con valor 0 de la escala.

N_1 = No. de plantas con valor 1 de la escala.

N_2 = No. de plantas con valor 2 de la escala.

N_3 = No. de plantas con valor 3 de la escala.

N_4 = No. de plantas con valor 4 de la escala.

N_5 = No. de plantas con valor 5 de la escala.

Incidencia: el porcentaje de incidencia corresponde al número de plantas infestada en cada muestreo a los 50,65 y 75 días después de siembra; se realizó el conteo de toda la población para determinar la incidencia del daño (Velásquez, 2012).

$$\%INC = \left[\frac{\text{No. de plantas enfermas}}{\text{No. de plantas total}} \right] \times 100$$

Eficacia según la fórmula de Abbott: Corresponde al porcentaje no infectado del tratamiento tomando como referencia el porcentaje de daño causado al testigo positivo (Orjeda, 1998).

$$\%Eficacia = \left(1 - \frac{\%T}{\%TP} \right) * 100$$

Donde:

%T: Porcentaje presente en el Tratamiento

%TP: Porcentaje presente en Testigo Positivo

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

En esta investigación se utilizaron métodos clásicos o tradicionales de cultivos y se logró obtener aislados de la microbiota cultivable presente en las muestras analizadas, sin embargo, esto no representa a todos los microorganismos que se encuentran en ellas y está limitado por los medios que se utilizaron (Anexo 3a, Figura 1 y 2, pág. viii). Utilizando métodos clásicos o tradicionales de cultivos, se obtuvieron 30 aislados diferentes de colonias de microorganismos en las distintas muestras de bioinsumos entre bacterias y hongos; de estos, 23 fueron bacterianos, 6 de hongos filamentosos y 1 de hongo levaduriforme como los mostrados en la Figura 37 BI-BIII. Los resultados se resumen en el Cuadro 3, en donde se observa el número de cepas bacterianas y de hongos (filamentosos y levaduriformes) que lograron aislarse en cada muestra.

Cuadro 3. Cantidad de microorganismos aislados a partir de las muestras de los 4 bioinsumos, estado del producto (sólido o líquido), zona de procedencia y código de estos.

No.	Estado de la muestra	Zona de procedencia	Código	No. bacterias	No. hongos	
					Filamentosos	Levaduriforme
1	Sólido	Norte	TS	5	3	-
2	Sólido	Norte	LS	6	1	-
3	Líquido	Norte	LL	3	2	-
4	Líquido	Occidente	DCL	9		1
Total				23	6	1

Nota: Tisey sólido (TS), Licoroy sólido (LS), Licoroy líquido (LL), Del campo líquido (DCL).

En el Cuadro 3 se puede observar que el mayor número de aislados se obtuvo en la muestra No. 4 con 10 microorganismos en total, mientras que el menor número de estos se encontró en la muestra No. 3, solamente con 5. Esto podría deberse a que el bioinsumo No. 4 proveniente del occidente se obtiene en un medio de cultivo que contiene como insumos: melaza, extractos de plantas, extractos de semillas, alcohol, vinagre, suero de leche, agua limpia, yogurt y minerales, en el cual se pueden desarrollar con facilidad un mayor número de microorganismos.

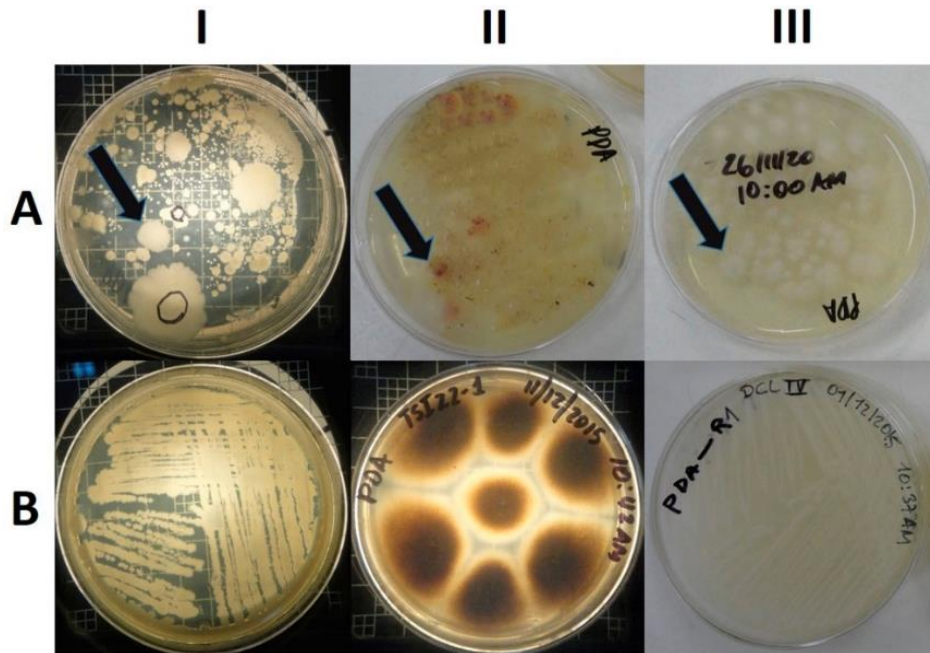


Figura 37. Aislamiento de microorganismos cultivables presentes en las muestras de los bioinsumos. AI-AIII: Placas Petri con cultivo mixto inicial. Las flechas señalan colonias seleccionadas para aislarse de una bacteria, un hongo filamentososo y uno levaduriforme, que se muestran aislados en BI, BII y BIII respectivamente.

Cuervo (2010) aisló microorganismos de dos biofertilizantes comerciales (uno de producción artesanal en medio líquido que especifica que contiene un coctel de microorganismos y el otro en medio sólido en polvo que contiene un *Bacillus sp.*) obteniendo solamente 3 aislados bacterianos que se identificaron mediante pruebas bioquímicas como: *Bacillus subtilis* en medio sólido, *Bacillus firmus* y *Bacillus sphaericus* en medio líquido. Estos resultados difieren con los obtenidos en este trabajo, en el que se obtuvo una gran cantidad de aislados microbianos, lo cual pueda deberse al bajo nivel tecnológico con el que se producen los bioinsumos utilizados actualmente en Nicaragua que no poseen cepas selectas según se indica en el documento “Estado de la Agricultura Orgánica en Nicaragua: Propuesta para su Fomento y Desarrollo” (2009). Por el contrario los bioinsumos utilizados en este estudio, están compuestas por una cantidad de microorganismos de los cuales no se conoce su identidad y su función dentro del producto (si son o no benéficos). No obstante, esto nos permitió obtener un mayor número de microorganismos aumentando la posibilidad de encontrar alguna especie nativa de *Bacillus subtilis*.

7.2. APROXIMACIÓN A LA IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LOS AISLADOS

La identificación morfológica de los microorganismos se realizó mediante observaciones en el microscopio de luz para verificar si se trataba de bacterias, hongos filamentosos u hongos levaduriformes, de acuerdo con la morfología observada. Para conocer la morfología microscópica de las bacterias se observó la forma y tamaño de la célula (para diferenciarlas de las levaduras), además de su coloración en la tinción de Gram. En el caso de los hongos se distinguían en filamentosos o levaduriformes, primero por las características macroscópicas de las colonias, como la apariencia, algodonosa en los primeros y mucosa o cremosa (parecida a la de las bacteria) en los segundos. Posteriormente se realizó la observación de esporas para hongos filamentosos y tinción simple para observar las células de los hongos levaduriformes.

7.2.1. Identificación morfológica de los aislados bacterianos

A los aislados bacterianos puros obtenidos en este trabajo, después de incubarlos por 24 horas en medio LB a 35°C, se les sometió a pruebas de tinción de Gram. Se observó la forma y tamaño de las células, la forma de colonia, así como su clasificación en Gram positivas o Gram Negativas. De acuerdo a la forma de la célula y el resultado de la tinción, 22 de los aislados eran de forma bacilar de distintos tamaños: 12 Gram positivos (entre paréntesis se muestra la ubicación en la Figura 38 del Gram correspondiente a cada bacteria): DCL1-2 (AI b), DCL2-1 (CI b), DCL2-411 (DI b), DCL3-3 (EI b), DCL4-31 (GI b), LS5-11 (FII b), LS5-21 (GII b), LS6-11 (HII b), LS6-211 (AIII b), TS10-111 (CIII b), TS11-3 (DIII b) y TS13-1111; 3 Gram variables: DCL3-4 (FI b), LS5-1 (EII b) y TS11-31 (EIII b); 7 Gram negativos: DCL1-11 (BI b), DCL12-21 (HI b), DCL12-1111 (AII b), LL8-221 (CII b), LL9-21 (DII b), LS7-211 (BIII b) y TS13-2111 (GIII b); y 1 de forma cocal Gram positivo: LL8-111 (BII b).

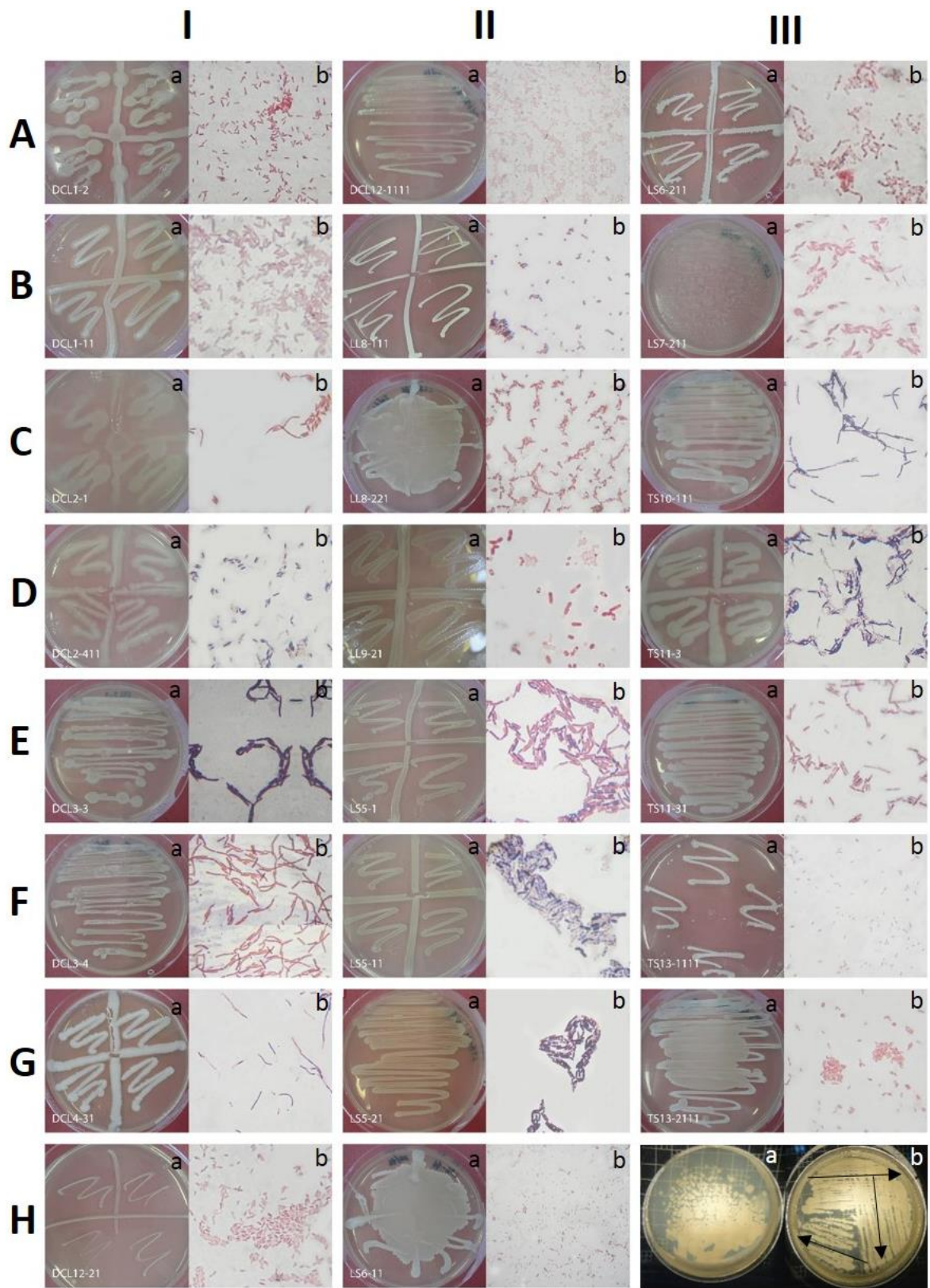


Figura 38. Morfología en placa y tinción de Gram de los aislados bacterianos. AI-HI, AII: Muestra 4; BII-DII: Muestra 3; EII-HII, AIII, BIII: Muestra 2; CIII-GIII: Muestra 1; HIII a: Cultivo mixto obtenido en la primera inoculación y HIII b: agotamiento por estrías.

En la Figura 38 se puede observar que de las 23 bacterias aisladas se obtuvieron 12 bacterias de forma bacilar que resultaron ser Gram positivas (DCL1-2, DCL2-1, DCL2-411, DCL3-3, DCL4-31, LS5-11, LS5-21, LS6-11, LS6-211, TS10-111, TS11-3, TS13-1111), características del género *Bacillus*. Esto concuerda con los resultados de Badía *et al.*, (2011) donde obtuvieron 13 aislados con estas características. De acuerdo con (Tejera-Hernández *et al.*, 2012) la presencia de endosporas bacterianas que constituyen una estructura de resistencia que puede permanecer viable durante una gran cantidad de tiempo hasta que las condiciones se tornen favorables para el desarrollo de la forma vegetativa, justificaría la gran cantidad de especies del género *Bacillus* que se encuentren en una gran variedad de hábitats. Sosa *et al.*, (2005) refuerzan esta afirmación explicando que las especies de *Bacillus* son ubicuas en la naturaleza, encontrándose en mayor proporción en los suelos como microorganismos saprófitos, resultando de gran utilidad usar muestras de suelo como fuente de inóculo. Para el caso de los bioinsumos utilizados, uno de sus componentes son suelos tomados de distintas zonas, lo cual explicaría la cantidad de aislados bacilares Gram positivos obtenidos de las muestras.

Los aislados bacterianos obtenidos se conservaron en medio de cultivo fresco Agar Nutritivo en placas Petri a 10°C, con repiques periódicos mensuales para su posterior identificación vía molecular y pruebas de antagonismo frente a fitopatógenos.

7.2.2. Identificación morfológica de los aislados de hongos filamentosos de los bioinsumos según su tipo de espora

Los aislados puros de hongos filamentosos obtenidos en este trabajo, luego de crecer en medio PDA (Agar Papa Dextrosa), se dejaron en esporulación entre 7 y 14 días a temperatura ambiente del laboratorio (28° C ±1). Se observaron sus características morfológicas al microscopio de luz con objetivo 40x poniendo atención al tipo de esporas y a las características macroscópicas como el color y apariencia que presentaban las conidias (Figura 39), con el fin de compararlos con las referencias utilizadas (Arias & Jerez, 2008; Arias & Piñeros, 2008). En el Cuadro 4 se describen las características de los 6 aislados de hongos filamentosos obtenidos.

Cuadro 4. Características macro y microscópicas de los hongos filamentosos aislados de muestras de bioinsumos.

Código	Color anverso de placa con PDA	Color al reverso de placa con PDA	Apariencia micelio	Forma de la espora	Posible Género
TSI-2222	Marrón rojizo	Marrón oscuro	Algodonosa	Esférica	Pendiente identificación
TSII-211	Blanco verdoso	Crema	Aterciopelada-pulvurolenta	Esférica	Pendiente identificación
TSIII-2111	Blanco verdoso	Crema	Aterciopelada-pulvurolenta	Esférica	Pendiente identificación
LLV-2111	Verde-Blanco-Negro	Verde-Beige	Granulosa-Pulvurolenta	Esférica	Pendiente identificación
LSVI-12	Blanco-Verde	Verde oscuro	Aterciopelada	Esférica	<i>Penicillium sp.</i>
LLVII-12	Blanco-crema	Blanco	Algodonosa	Esférica	Pendiente identificación

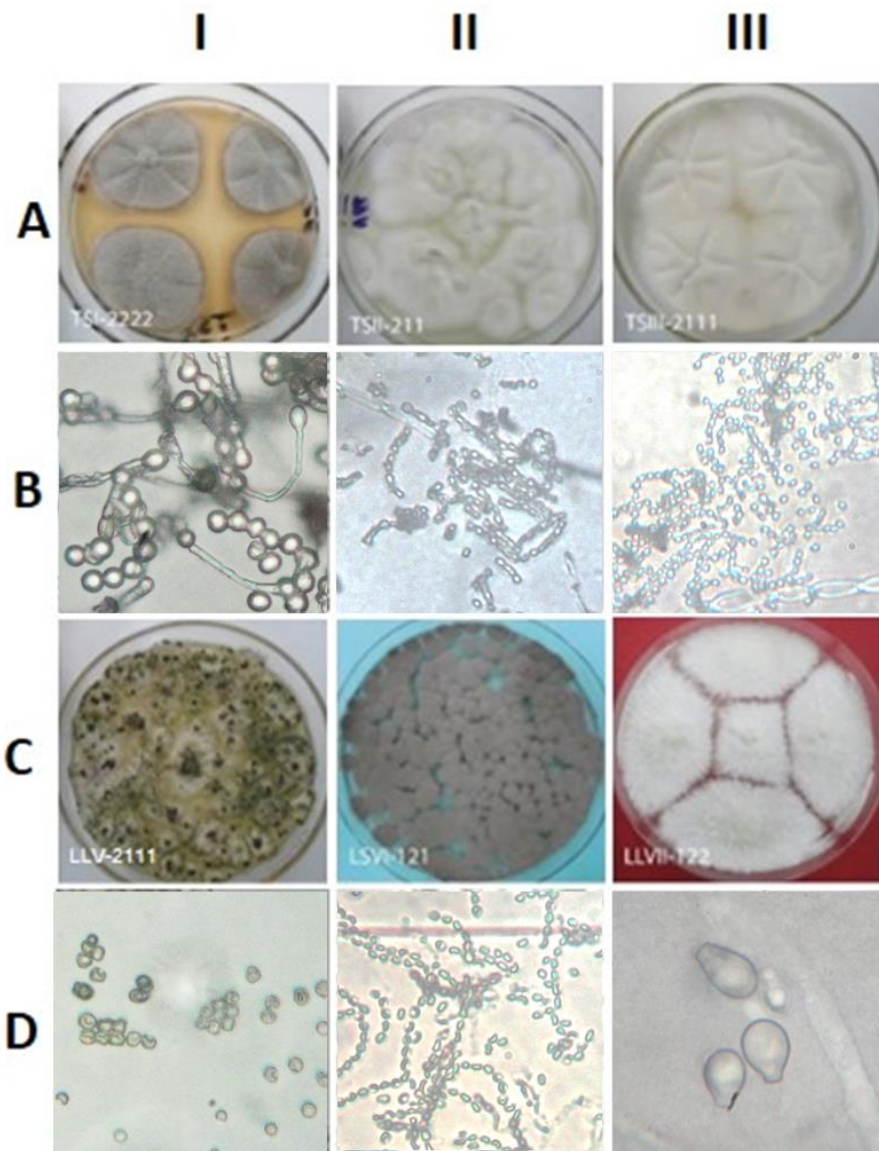


Figura 39. Hongos filamentosos aislados de muestras de bioinsumos. En las filas A y C se muestra la morfología en placa de cada hongo filamentosos, mientras que en B y D, debajo de cada hongo, se muestran las esporas observadas en cada uno.

Los resultados de la observación de las características macroscópicas y microscópicas y su comparación con lo descrito en la literatura (Arias & Jerez, 2008; Arias & Piñeros, 2008) nos condujeron a una aproximación del posible género con el que se estaba tratando solamente para el aislado LSVI-121. Por su morfología en placa (Figura 39 CII) con micelio inicialmente de color blanco que se torna verde cuando el cultivo envejece y sus esporas esféricas (Figura 39 DII) se sugiere que pertenezca al género *Penicillium* sp. Sin embargo, para los demás aislados no se lograron dar aproximaciones debido a que las características observadas no coincidieron con las encontradas en la literatura consultada hasta el momento. Esto podría deberse a la gran diversidad de género y especies existentes de hongos

filamentosos. Por consiguiente, se recomienda hacer uso de otras pruebas morfológicas y/o moleculares para su debida identificación. Los 6 aislados obtenidos se conservaron en medio Agar Papa Dextrosa a 10°C, con repiques mensuales para su posterior uso en investigaciones. En este trabajo, no se caracterizaron a nivel de especie todos los microorganismo aislados, debido a que no eran objeto de estudio de esta investigación, dando prioridad en identificar los microorganismos que si eran de interés y estaban dentro de los objetivos de la investigación.

7.2.3. Identificación morfológica del aislado de hongo levaduriforme de los bioinsumos

Para el aislado de hongo levaduriforme, se siguió un procedimiento similar al seguido previamente para bacterias (véase la sección de métodos). La única levadura que se encontró se aisló de la muestra No.4 correspondiente al bioinsumo de occidente (DCL) en estado líquido (Cuadro 3). Macroscópicamente se observaron colonias de color blanco brillante (Figura 40 AI) que al envejecer presentaban estructuras que asemejaban hifas. Microscópicamente las células eran elipsoides y se observó presencia de pseudohifas luego de siete días de crecimiento (Figura 40 AII y AIII respectivamente).

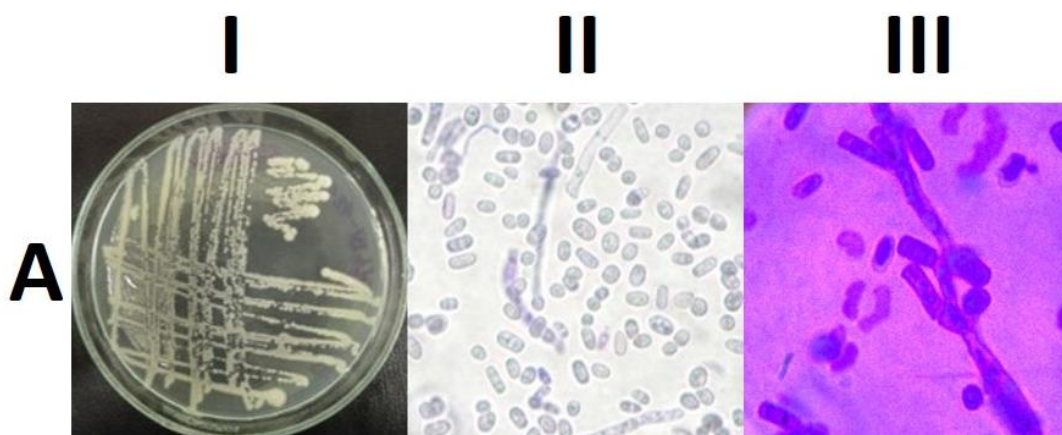


Figura 40. Morfología en placa (AI) y observación de tinción simple al microscopio de luz con objetivo 40x de DCLIV-11 posible *Aerobasidium pullulans* (AII). En AIII puede observarse la presencia de una pseudohifa.

Estas características como el color de placa y formación de pseudohifas (Figura 40) nos llevan a sugerir podría tratarse de la especie *Aerobasidium pullulans* en correspondencia a lo descrito en la literatura (Barnet *et al.*, 2000 citado por Páramo, 2012; Zalar *et al.*, 2008). Sin embargo, se recomienda el uso de pruebas bioquímicas y/o moleculares para corroborar la identificación de este hongo levaduriforme de gran importancia biotecnológica. Este aislado se conservó en medio Agar Papa Dextrosa a una temperatura de 10°C.

7.2.4. Identificación morfológica de los hongos fitopatógenos utilizados en pruebas de antagonismo

Para la identificación de hongos fitopatógenos es necesario la observación de estructuras somáticas y reproductivas (Urbina, 2011). De acuerdo con (Kikot, 2012) la clasificación morfológica en el género *Fusarium* se basa en las características macro y microscópicas del cultivo. El tipo de micelio aéreo que suele ser abundante, pigmentación y tasa de crecimiento de la colonia son características básicas de identificación. El color que desarrollan depende de la especie y puede ser blanco, crema, rojo, púrpura, etc. Además del tipo de macroconidias (esporas) por su forma de grano de arroz, media luna o de canoa. Por otro lado, según (Carrillo, 2003) la clasificación morfológica del género *Alternaria* se basa en características macroscópicas como el micelio aéreo gris verdoso con reverso negro parduzco y microscópicas, sus esporas que tienen septos transversales y longitudinales, de color pardo.

Antes de realizar las pruebas de antagonismo se procedió a verificar el género de los fitopatógenos suministrados como *Fusarium* y el aislado de *Alternaria* (véase la sección de métodos), mediante observación de las características en placa y al microscopio de luz y comparación con la literatura (Carrillo, 2003; Arias & Jerez, 2008; Kikot, 2012). Las formas de las esporas observadas se muestran en la Figura 41, así como su morfología en medio Agar Papa Dextrosa (PDA).

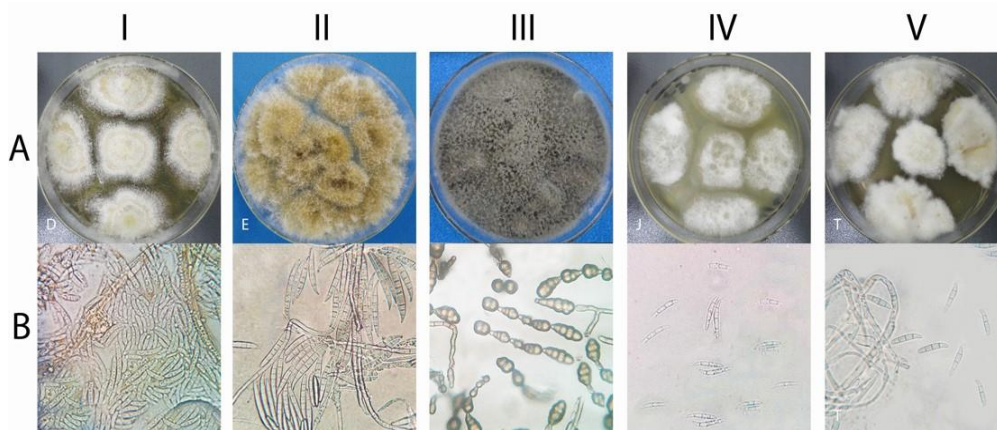


Figura 41. Hongos fitopatógenos utilizados en pruebas de antagonismo. AI, AIV: *Fusarium* M1-2-1 (D) y M3-1-1 (J) aislados de papa; AII, AV: *Fusarium* F15 (E) y F9 (T) aislados de maní; AIII: *Alternaria* M5-62N (I) aislado de papa.

Las esporas de los fitopatógenos observadas (Figura 41: BI-BV) concuerdan con las que se muestran en la literatura consultada (Carrillo, 2003; Arias & Jerez, 2008; Kikot, 2012), correspondiente a los géneros *Alternaria* cepa M5-62N (I) y a *Fusarium* cepas M1-2-1 (D), M3-1-1 (J), F15 (E) y F9 (T). En el caso de *Alternaria* el micelio era de color gris verdoso, tornándose más oscuro al envejecer el cultivo y sus esporas de color pardo con septos transversales, estas características se pueden

observar en la Figura 41 AIII y BIII. Mientras que *Fusarium* mostraba micelio abundante blanco, tornándose amarillento o crema en el hongo ya esporulado; sus esporas con forma de media luna o canoa característica que permite diferenciar este género con facilidad como puede observarse en la Figura 41 BI, BII, BIV y BV. Estas cepas se conservaron en medio de cultivo PDA a 10°C, para su posterior utilización en las pruebas de antagonismo e identificación vía molecular.

7.3. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS MICROORGANISMOS UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

Se seleccionaron 20 microorganismos para ser identificados molecularmente: 15 bacterias y 5 hongos fitopatógenos identificados según su tipo de espora, los cuales fueron utilizados en las pruebas de antagonismo. Dentro de las 15 bacterias seleccionadas: 12 pertenecían a las aisladas de los bioinsumos (9 bacilos Gram positivos entre los que podría encontrarse *Bacillus subtilis*, 2 bacilos Gram negativos y 1 coco Gram positivo), seleccionados para conocer la diversidad de géneros y especies que conviven en estos bioinsumos; las 3 bacterias restantes fueron suministradas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia Animal de la Universidad Nacional Agraria (UNA), aisladas de ciego de pollo (intestino) e identificadas a través de pruebas bioquímicas dentro del género *Bacillus* y que sirvieron como controles positivos en esta investigación. En esta selección de bacterias también se tomó en cuenta el potencial inhibitorio mostrado por estas en el screen grueso (se explica más adelante en el tema de pruebas de antagonismo) que se realizó simultáneamente.

Los resultados del análisis de las secuencias alineadas y corregidas del gen ADNr 16S para bacterias y de la región ITS1 para hongos permitió obtener los árboles filogenéticos que se muestran en las Figuras 42 y 43, respectivamente. El árbol consenso de bacterias y hongos identificados se muestra en el Anexo 1 (página i) donde puede observarse la separación entre los procariotas y los eucariotas.

7.3.1. Identificación molecular de bacterias

El gen ribosomal 16S es frecuentemente empleado para estudios filogenéticos debido a que es una secuencia altamente conservada entre las diferentes especies de bacterias; el gen se encuentra ubicado en la subunidad pequeña del ribosoma (30S), asociado a esto, el gen ribosomal 16S es una región híper variable que prevé especificidad de especie, lo cual resulta muy útil para la identificación de especies bacterianas (Castillo-Reyes *et al.*, 2015). Badía *et al.*, (2011) identificaron mediante secuenciación del gen ADNr 16S bacterias aisladas de la rizósfera del cultivo del arroz obteniendo dos cepas de *Bacillus subtilis*, una de *B. cereus* y una de *Bacillus sp.* En otra investigación Castillo-Reyes *et al.*, (2015) identificaron bacterias aisladas

de la rizósfera de plantas del desierto con efecto antagónico frente a *Rhizoctonia solani*, usando el gen 16s ribosomal obteniendo 7 cepas identificadas a nivel de especie, 5 de ellas como *Bacillus subtilis*, *B. atrophaeus* y *B. pumilus*.

De los 15 aislados de bacterias seleccionados, 10 se lograron identificar a nivel de especie: LS5-11 (B) como *Bacillus megaterium*, DCL4-31 (F) y LS6-11 (G) *Bacillus subtilis*, DCL2-411 (H) *Bacillus flexus*, DCL12-21 (L) *Agrobacterium tumefaciens*, LL8-111 (M) *Staphylococcus succinus*, TS13-1111 (N) *Bacillus pumilus*, X5-9E2 (O), X2-10(2)2 (R) y X5-9CD2 (S) como *Bacillus cereus*; 4 a nivel de género: DCL1-2 (A) como *Lysinibacillus sp.*, TS11-3 (B), LS6-211 (P) *Bacillus sp.* y DCL12-11 (Q) *Rhizobium sp.* (Cuadro 5). Una de las bacterias no se logró secuenciar debido a que presentó contaminación al momento de la extracción de ADN. Los resultados obtenidos con las secuencias analizadas fueron utilizados para elaborar el árbol filogenético que se presenta en la Figura 42. Las secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA, se muestran en el Anexo 2. (págs. ii-vii).

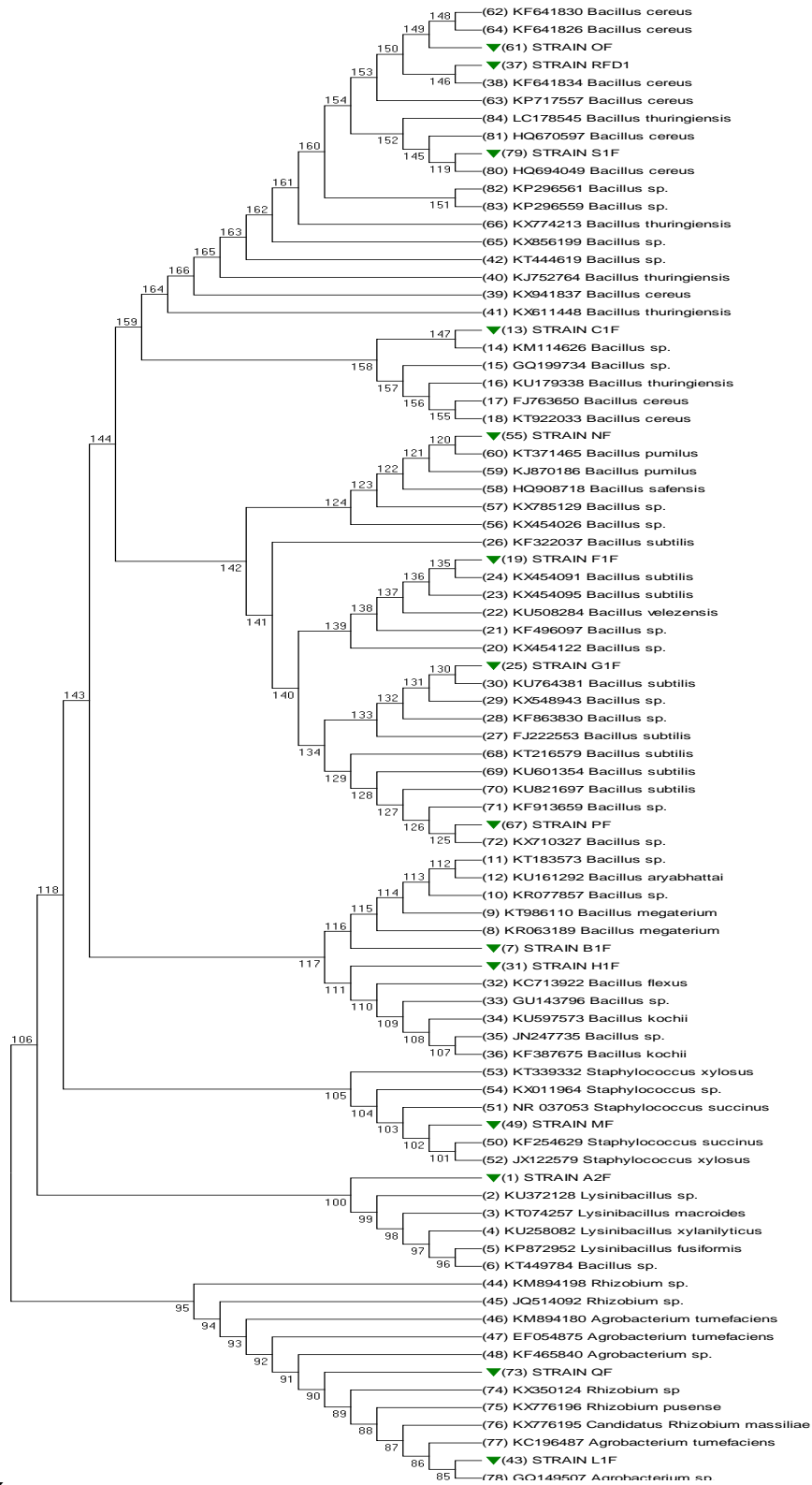


Figura 42. Árbol filogenético de aislados bacterianos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 7.0.14, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.

Cuadro 5. Identificación de bacterias mediante análisis filogenético utilizando el árbol de la figura 42. En la tabla se muestra el código de la secuencia, el código del microorganismo, muestra de donde se aisló, puntuación e identidad máxima con el vecino cercano y la identidad final de la bacteria.

Bacterias						
Código secuencia	Código microorganismo	Procedencia de la muestra	Vecino cercano (Número acceso)	Máx. punt.	Ident. máx. (%)	Identidad final
A	DCL1-2	Bioinsumos	<i>Lysinibacillus</i> sp. (KU372128)	358	100	<i>Lysinibacillus</i> sp. (MF680178)
B	LS5-11	Bioinsumos	<i>Bacillus megaterium</i> (KR063189)	1105	99	<i>Bacillus megaterium</i> (MF680179)
C	TS11-3	Bioinsumos	<i>Bacillus</i> sp. (KM114626)	1478	99	<i>Bacillus</i> sp. (MF680180)
F	DCL4-31	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i> (KX454091)	1022	99	<i>Bacillus subtilis</i> (MF680181)
G	LS6-11	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i> (KU764381)	1057	99	<i>Bacillus subtilis</i> (MF680182)
H	DCL2-411	Bioinsumos	<i>Bacillus flexus</i> (KC713922)	1114	100	<i>Bacillus flexus</i> (MF680183)
L	DCL12-21	Bioinsumos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (KM894180)	2490	99	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (MF680185)
M	LL8-111	Bioinsumos	<i>Staphylococcus succinus</i> (KF254629)	2601	100	<i>Staphylococcus succinus</i> (MF680186)
N	TS13-1111	Bioinsumos	<i>Bacillus pumilus</i> (KT371465)	2362	98	<i>Bacillus pumilus</i> (MF680187)
O	X5-9E2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i> (KF641830)	1083	99	<i>Bacillus cereus</i> (MF680188)
P	LS6-211	Bioinsumos	<i>Bacillus</i> sp. (KX710327)	1014	99	<i>Bacillus</i> sp. (MF680189)
Q	DCL12-11	Bioinsumos	<i>Rhizobium</i> sp. (KX350124)	1051	100	<i>Rhizobium</i> sp. (MF680190)
R	X2-10(2)2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i> (KF641834)	1555	98	<i>Bacillus cereus</i> (MF680184)
S	X5-9CD2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i> (HQ694049)	1194	98	<i>Bacillus cereus</i>

El Cuadro 5 resume los resultados obtenidos en el análisis de las secuencias y la identificación final de las bacterias. Este se obtuvo a partir del análisis del árbol filogenético de la Figura 42 obtenido en el programa MEGA 7.0.14 utilizando el método Neighbor-Joining y la información de las secuencias del GenBank que presentaban mayor homología. En él se enlistan las especies identificadas, citadas anteriormente, de 12 bacterias aisladas de las muestras de bioinsumos y 3 de ciego de pollo (intestino). Cada especie bacteriana (cepa) confirma su identidad en su mayoría en 99% con las secuencias contenidas en el Genbank. El máx. score se refiere a la puntuación de alineación más alta o cantidad de bases (Adenina, Citosina, Timina y Guanina) de la secuencia consultada que coinciden en la misma posición con las bases de las secuencias contenidas en el GenBank. Esto va a depender del largo de la secuencia obtenida.

De un total de 14 bacterias identificadas vía molecular, 10 pertenecen al género *Bacillus*, y de ellas 2 cepas corresponden a *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G). El género *Bacillus* es un grupo heterogéneo y puede ser re-clasificado en varios grupos en base a características bioquímicas, metabólicas, y en homología fenotípica y genotípica de secuencias de ADNr 16S (Castillo-Reyes *et al.*, 2015). Esto concuerda con lo que refiere Raghavendra, (2006), que las especies de este género son microorganismos ampliamente distribuidos en el ambiente que suelen encontrarse en el suelo, agua dulce y salada, materia vegetal en descomposición, desiertos y la Antártida. Asimismo, *Bacillus subtilis* se ha aislado en alimentos, incluidas las especias, cacao, legumbres, semillas, y pan. Se encuentra principalmente en suelos agrícolas, raíces de las plantas y en el tracto gastrointestinal de los animales. En diferentes aislamientos se ha evidenciado la presencia de cepas con actividad biocontroladora sobre patógenos de plantas, además poseen un alto poder de adaptación a diversos ambientes mediante la formación de endosporas; estructuras resistentes a la falta de nutrientes y situaciones adversas.

Aparte de *Bacillus subtilis*, que era la especie que se pretendía encontrar por su potencial en el control biológico, se encontraron otras del género *Bacillus* como *Bacillus megaterium* reportado con capacidad de solubilizar fosfatos (Tejera-Hernández *et al.*, 2011), *Bacillus flexus* usado en tratamiento de aguas residuales alcalinas (Chen *et al.*, 2013), *Bacillus pumilus* conocido por su capacidad de producir fitohormonas (Pérez, 2012) y *Bacillus cereus* reportado como antagonista de *Phytophthora megasperma* por (Handelsman *et al.*, 1990) pero también como patógeno humano. Además, se encontraron otros géneros, tales como: *Lysinibacillus*, *Agrobacterium*, *Staphylococcus* y *Rhizobium*; este último de gran importancia en la agricultura, conocido por los nódulos que forma en simbiosis con plantas para la fijación del nitrógeno.

De manera general el proceso de identificación permitió obtener una amplia gama de especies que van desde *Bacillus subtilis* y *Rhizobium sp.* que poseen potencial en la agricultura, hasta géneros y especies con potencial biotecnológico en otras áreas como *Bacillus megaterium*, *Bacillus flexus*, *Agrobacterium tumefaciens*.

7.3.2. Identificación molecular de hongos fitopatógenos

La identificación preliminar de fitopatógenos basada en estudios taxonómicos de los hongos y su patología sobre el hospedero (Aoki *et al.*, 2005), requiere tiempo y experiencia considerable, sin embargo, los métodos moleculares como PCR agilizan la identificación analizando regiones específicas dentro de genes. Según Fernández-Ortuño *et al.*, (2010), citado por Lafuente-Rincón *et al.*, (2016), las secuencias de transcriptos espaciadores internos (ITS) es una de las más utilizadas en la identificación, como código de barras estándar para hongos. Vásquez-López *et al.*, (2012) aislaron e identificaron molecularmente los agentes patógenos que causaban necrosis de flores, pudrición y caída de frutos del papayo en Guerrero, México obteniendo a *Fusarium equiseti*, *F. chlamyosporum*, *Cladosporium cladosporioides* y *Alternaria alternata* como los causantes.

Los hongos fitopatógenos identificados según su tipo de espora: *Alternaria* la cepa M5-62N (I) y como *Fusarium* las cepas M1-2-1 (D), M3-1-1 (J), F15 (E) y F9 (T) se enviaron a secuenciar para identificarlos a nivel de especie. En Nicaragua de acuerdo a la IV versión de la Lista de Plagas reportadas publicada por el Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA) en 2016, estos géneros afectan a la mayoría de los cultivos de interés (maíz, frijol, sorgo, soya, arroz, café, cacao, caña de azúcar, cítricos, melón, sandía, plátano, entre otros) causando pudrición o marchitez vascular en el caso de *Fusarium* y manchas foliares en el caso de *Alternaria*.

Para verificar los resultados de la identificación morfológica de acuerdo al tipo de espora de los hongos fitopatógenos, se identificaron molecularmente a través de la secuenciación de la región ITS1 (Internal Transcribed Space) del ADNr. De los resultados del análisis de las secuencias se obtuvo el siguiente árbol filogenético.

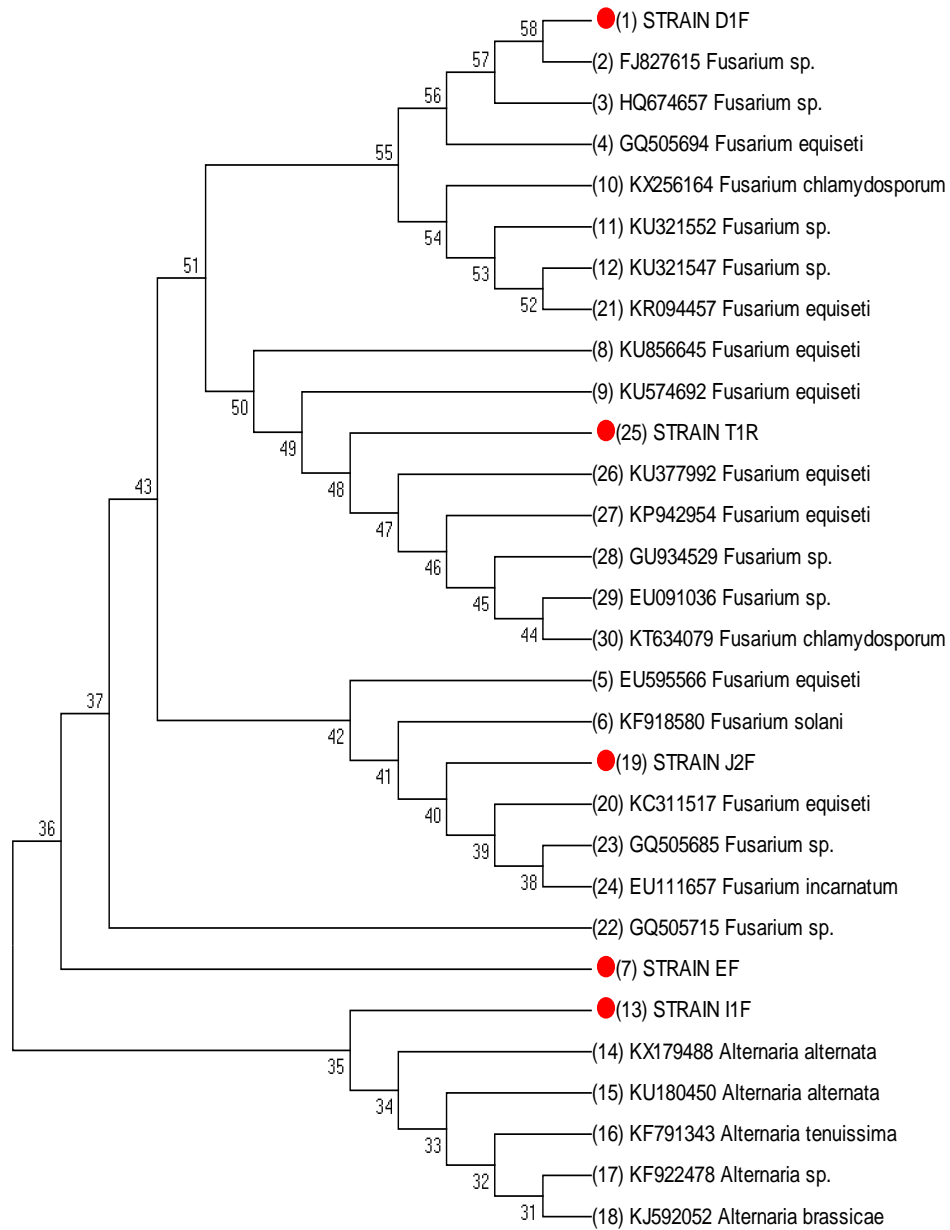


Figura 43. Árbol filogenético de hongos fitopatógenos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 7.0.14, el código de acceso al Gen Bank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.

El Cuadro 6 resume los resultados obtenidos en el análisis de las secuencias por medio del árbol filogenético de la Figura 43 y la identificación de los hongos fitopatógenos.

Cuadro 6. Identificación molecular de hongos fitopatógenos. El cuadro muestra el código de la secuencia y el código del microorganismo, el cultivo a partir del cual se aisló, departamento de procedencia, puntuación e identidad máxima con el vecino más cercano y la identidad final del hongo.

Hongos fitopatógenos							
Código secuencia	Código microorganismo	Cultivo	Procedencia	Vecino cercano (Número acceso)	Máx. punt.	Ident. Máx. (%)	Identidad final
D	M1-2-1	Papa	Jinotega	<i>Fusarium</i> sp. (FJ827615)	974	99	<i>Fusarium</i> sp.
E	F15	Maní	León	<i>Fusarium</i> sp. (KU377496)	900	99	<i>Fusarium</i> sp.
I	M5-62N	Papa	Jinotega	<i>Alternaría alternata</i> (KX179488)	837	99	<i>Alternaría alternata</i>
J	M3-1-1	Papa	Jinotega	<i>Fusarium equiseti</i> (KC311517)	1956	99	<i>Fusarium equiseti</i>
T	F9	Maní	León	<i>Fusarium equiseti</i> (KU377992)	876	100	<i>Fusarium equiseti</i>

Los géneros *Alternaría* y *Fusarium* que se sugirieron a través de la observación de esporas concuerdan con los obtenidos en la identificación vía molecular con porcentajes de identidad entre el 99 y 100% con secuencias contenidas en el GenBank. Del total de 5 hongos fitopatógenos identificados vía molecular, 3 lograron ser identificados a nivel de especie M5-62N (I) como *Alternaría alternata*, M3-1-1 (J) y F9 (T) como *Fusarium equiseti*. Las cepas M1-2-1 (D) y F15 (E) se identificaron como *Fusarium* sp. Esto se debe a que *Fusarium* es un género fúngico amplio y diverso de diferentes complejos de especies y su taxonomía ha sido por mucho tiempo una tarea compleja. Esto es debido principalmente a la aplicación de diferentes sistemas taxonómicos, la gran diversidad de especies y la inherente variabilidad morfológica de algunas de estas (Acevedo, 2013).

La especie *Alternaría alternata* ha sido aislada, identificada mediante análisis molecular y reportada como causante de tizones foliares de hojas de plantas de Avena (*Avena sativa* L) en México, (García-León *et al.*, 2013); Vásquez-López *et*

al., (2012) la reportaron como agente patógeno que causa necrosis de flores y pudrición y caída de frutos del papayo (*Carica papaya L.*) en este mismo país. Mientras que en Nicaragua ha sido reportada afectando los cultivos de algodón, frijol, sorgo y soya (IPSA, 2016). Por otro lado, la especie *Fusarium equiseti* ha sido reportada como fitopatógeno en México donde se aisló de flores y frutos del papayo, identificándose morfológicamente y molecularmente (Vásquez-López *et al.*, 2012). En Nicaragua esta especie se reportó como hongo patogénico que reduce la germinación y provoca pudriciones de raíces, tallos y semillas en el documento de Catálogo de hongos en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) en Nicaragua (2013), donde se muestra que se aisló un grupo de hongos que mostraron 99-100% de identidad a un complejo de especies de *Fusarium spp* (dentro de estas *F. chlamydosporum*, *equiseti* e *incarnatum*). *F. chlamydosporum* (Woollwv), *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. Ssensu Gordon and *F. incarnatum* (R.) Sacc.

Las especies *Alternaria alternata* y *Fusarium equiseti* han sido reportadas como fitopatógenos en Nicaragua en la Lista de Plagas reportadas publicada por el IPSA en el 2016, pero no afectando los cultivos de maní (*Arachis hypogaea*) y papa (*Solanum tuberosum L*) de donde estas cepas fueron aisladas. Esto podría deberse a reducido uso de técnicas moleculares para la identificación de fitopatógenos en nuestro país, y a la dificultad de identificar morfológicamente (que es la forma de identificación comúnmente usada) a nivel de especie estos géneros.

De manera general se lograron identificar las especies *Fusarium equiseti* y *Alternaria alternata*, la primera afectando los cultivos de papa y maní, mientras que la segunda afectando cultivos de papa. Dos de los aislados se identificaron como *Fusarium sp.* lo que pone en evidencia la gran diversidad de especies de este género, por lo cual se recomienda el uso de otras regiones de ITS para una completa identificación.

7.4. PRUEBAS DE ANTAGONISMO

7.4.1. Pruebas de antagonismo in vitro

✓ Preselección de cepas antagonistas (screen grueso)

Una preselección de bacterias antagonistas de *Rhizoctonia solani*, fue realizada por (Castillo-Reyes *et al.*, 2015), seleccionando 14 de 80 cepas aisladas. En la caracterización morfológica, todas las cepas presentaron forma de bacilo, tinción de Gram positiva y formación de endospora en la parte central. En este trabajo, de un total de 26 bacterias evaluadas en la preselección (23 aisladas de bioinsumos y 3 de ciego de pollo que sirvieron como controles positivos del género *Bacillus*) se

seleccionaron 6 cepas con posible efecto inhibitorio frente al menos alguno de los 3 fitopatógenos evaluados: *Alternaría alternata* (I), *Fusarium sp.* (D) aislado de papa y *Fusarium sp.* (E) aislado de maní.

Cuadro 7. Resultados de las cepas seleccionadas en el screen grueso. En el cuadro se muestra el código de la secuencia y código de aislamiento de las bacterias, así como el tipo de muestra de donde se aisló para su identificación final.

Código secuencia	Bacterias		Identificación final	Fitopatógenos		
	Código aislamiento	Tipo Muestra		<i>Alternaría alternata</i> M5-62N (I)	<i>Fusarium sp.</i> M1-2-1 (D)	<i>Fusarium sp.</i> F9 (E)
F	DCL4-31	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+
G	LS6-11	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+
P	LS6-211	Bioinsumos	<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+
Q	DCL12-11	Bioinsumos	<i>Rhizobium sp.</i>	-	+	-
R	X2-10(2)2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-
S	X5-9CD2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-

+ Se observó algún grado de inhibición;
- No se observó ningún grado de inhibición.

En el Cuadro 7 se muestran los resultados de la preselección (screen grueso) de aislados con potenciales efectos antagónicos frente a los hongos fitopatógenos, obteniendo como resultado 6 cepas con posible efecto inhibitorio frente al menos alguno de los 3 fitopatógenos evaluados. Sin embargo, los mejores resultados en este experimento preliminar los obtuvieron las cepas que posteriormente fueron identificadas por vía molecular como *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G) que presentaron los mayores grados de inhibición respecto a las otras cepas seleccionadas como puede observarse en la Figura 44 AI-AIII y BI-BIII. No obstante, las cepas *Bacillus sp.* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y X5-9CD2 (S) también inhibieron a alguno de los fitopatógenos.

A diferencia de lo reportado por Castillo-Reyes *et al.*, (2015) de las cepas seleccionadas en este estudio solamente 5 pertenecen al género *Bacillus* que son bacterias Gram positivas (véase Anexo 3b: Figuras 3-5, 7-8, págs. ix-xi), la sexta cepa antagonista corresponde a *Rhizobium sp.*, bacteria Gram negativa (véase Anexo 3: Figura 6, pág. x). Esta bacteria ha sido reportada como promotora del crecimiento de las plantas y la productividad (efecto primario), pero ahora también muestra un efecto inhibitorio en el crecimiento fúngico (efecto secundario).

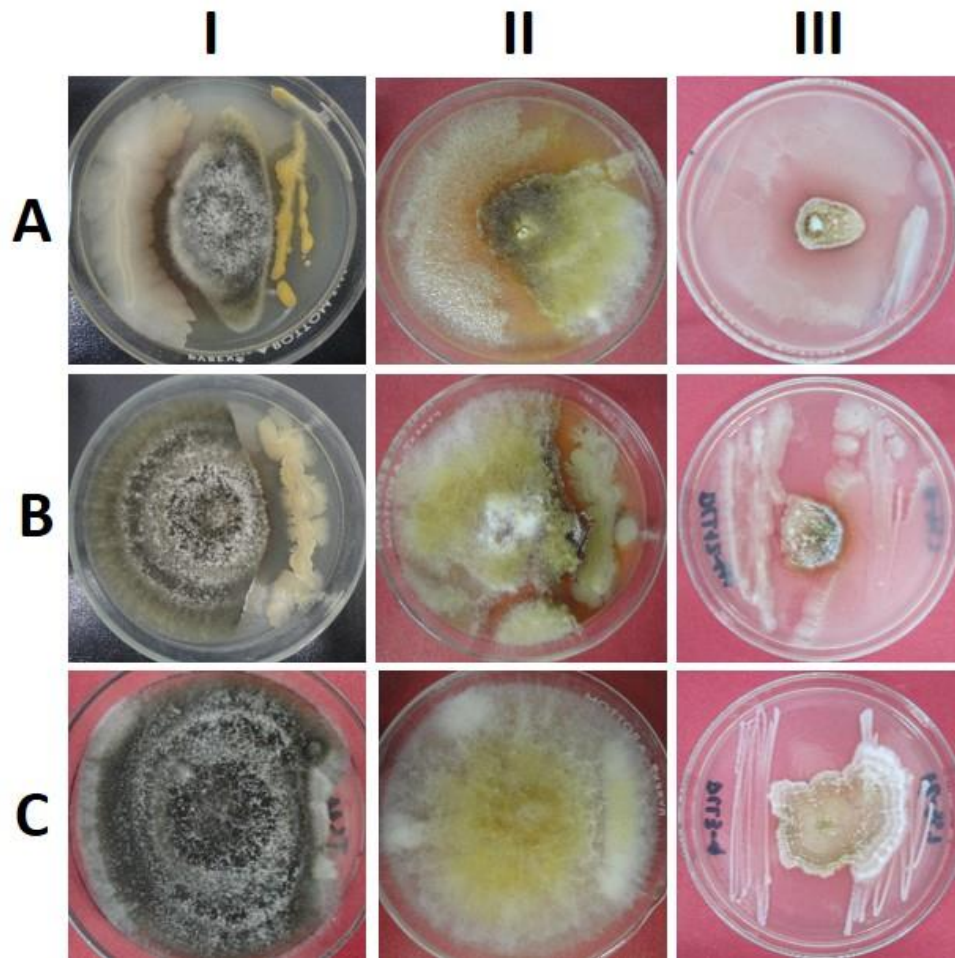


Figura 44. Muestra de la preselección de bacterias con efecto antagónico. AI-AIII: A la izquierda de la placa Petri *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) frente a los fitopatógenos *Alternaria alternata* M5-62N (I), *Fusarium* sp. F15 (E) y *Fusarium* sp. M1-2-1 (D); BI-BIII: A la derecha de la placa *Bacillus subtilis* LS6-11 (G) frente a hongos fitopatógenos; CI-CIII: Aislados que no mostraron ningún grado de inhibición, el hongo pasó por encima de ellos.

✓ **Evaluación del efecto antagónico in vitro haciendo énfasis en la búsqueda de *Bacillus subtilis***

Se evaluó el efecto antagónico de las cepas seleccionadas en el screen grueso, frente a los 5 fitopatógenos *Fusarium sp.* M1-2-1 (D) (véase Anexo 3c: Figura 9, pág. xii), *Fusarium sp.* F15 (E) (véase Anexo 3c: Figura 10, pág. xii), *Alternaría alternata* M5-62N (I) (véase Anexo 3c: Figura 11, pág. xii), *Fusarium equiseti* M3-1-1 (J) (véase Anexo 3c: Figura 12, pág. xiii) y *Fusarium equiseti* F9 (T) (véase Anexo 3c: Figura 13, pág. xiv); obteniendo como resultado que las 6 cepas de bacterias evaluadas presentaron diferentes capacidades para inhibir a distintos fitopatógenos y en algunos casos no se observó efecto inhibitorio. Los resultados del porcentaje de inhibición frente a los fitopatógenos y la tasa de crecimiento micelial de estos se reflejaron en base al promedio de tres repeticiones por tratamiento, estos resultados se muestran en la Figura 45 y el Cuadro 8.

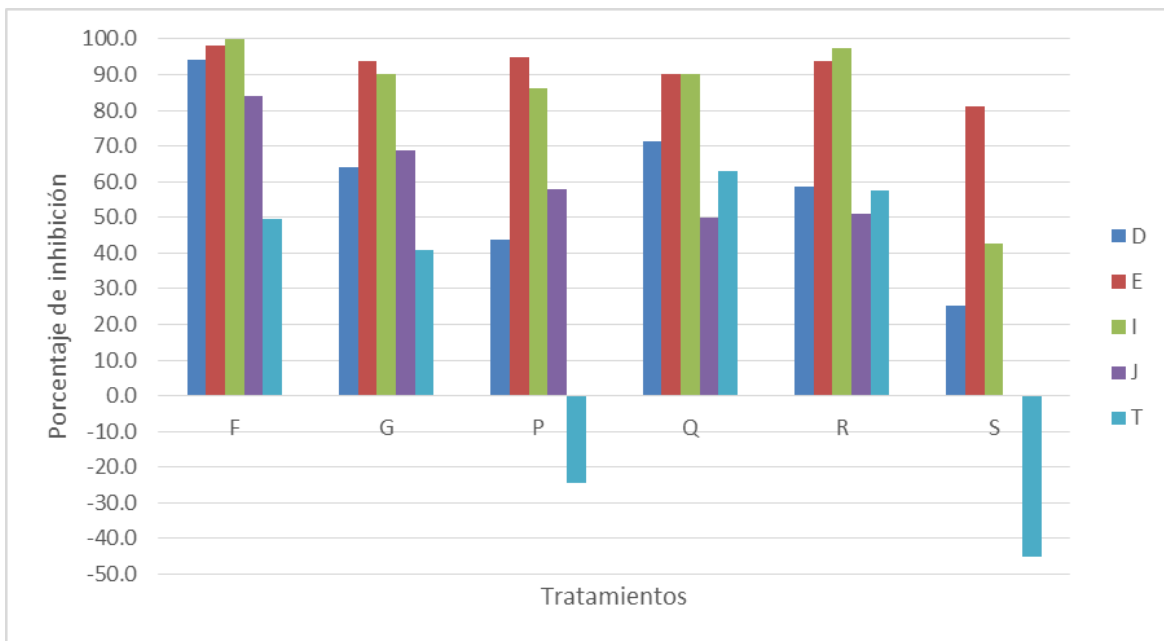


Figura 45. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos: *Fusarium sp.* M 1-2-1 (D), *Fusarium sp.* F15 (E), *Alternaría alternata* M5-62N (I), *Fusarium equiseti* M 3-1-1 (J) y *Fusarium equiseti* F9 (T), frente a las Bacterias previamente seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), *Bacillus sp* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S).

Cuadro 8. Tasa de crecimiento de fitopatógenos: *Fusarium sp.* M 1-2-1 (D), *Fusarium sp.* F15 (E), *Alternaría alternata* M5-62N (I), *Fusarium equiseti* M 3-1-1 (J) y *Fusarium equiseti* F9 (T), en presencia de bacterias seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), *Bacillus sp.* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S). En la parte inferior de la tabla se muestra el crecimiento de los testigos (sin presencia de bacterias).

Bacterias	Tasa de crecimiento de fitopatógenos (cm/día)				
	D	E	I	J	T
F	0.02	0.01	0.00	0.05	0.10
G	0.13	0.03	0.04	0.10	0.12
P	0.13	0.02	0.06	0.14	0.24
Q	0.09	0.04	0.04	0.16	0.07
R	0.11	0.03	0.01	0.16	0.08
S	0.20	0.08	0.24	0.33	0.28
Tasa de crecimiento de los fitopatógenos sin presencia de bacterias (Testigo)					
	Día 13	Día 10	Día 10	Día 13	Día 14
Testigo	0.33	0.43	0.43	0.33	0.19

Al analizar los resultados mostrados en la Figura 46 (en el Anexo 4, pág. xx, se muestra la tabla completa con los resultados obtenidos frente a las distintas cepas) se puede observar que en el caso de *Fusarium sp.* M1-2-1 (D) aislado de papa, el mejor efecto antagónico lo ejerce el aislado *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) con 94,23% de inhibición del crecimiento pero de manera general se obtuvo un valor promedio de 59.5% (Figura 46 AI); para el hongo *Fusarium sp.* F15 (E) aislado de maní, se obtuvo un porcentaje de inhibición promedio de 92%, destacándose los que se verifican en los aislados *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) y *Bacillus sp.* LS6-211 (P) con 98.33 y 95.00% respectivamente (Figura 46 AII); *Alternaría alternata* M5-62N (I) fue inhibido totalmente por *Bacillus subtilis* cepa F (100,00%), y un promedio de 84% por parte de los 6 aislados (Figura 46 AIII); *Fusarium equiseti* M3-1-1 (J) aislado de papa, fue inhibido en promedio en un 51.9 %, destacándose *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) con 83.96% (Figura 46 BI); finalmente en el caso de *Fusarium equiseti* F9 (T) aislado de maní, la mejor inhibición la ejerció Q (*Rhizobium sp.*) con un porcentaje 62.90%, obteniéndose promedio de 23.5% de inhibición en las 6 bacterias (Figura 46 BII).

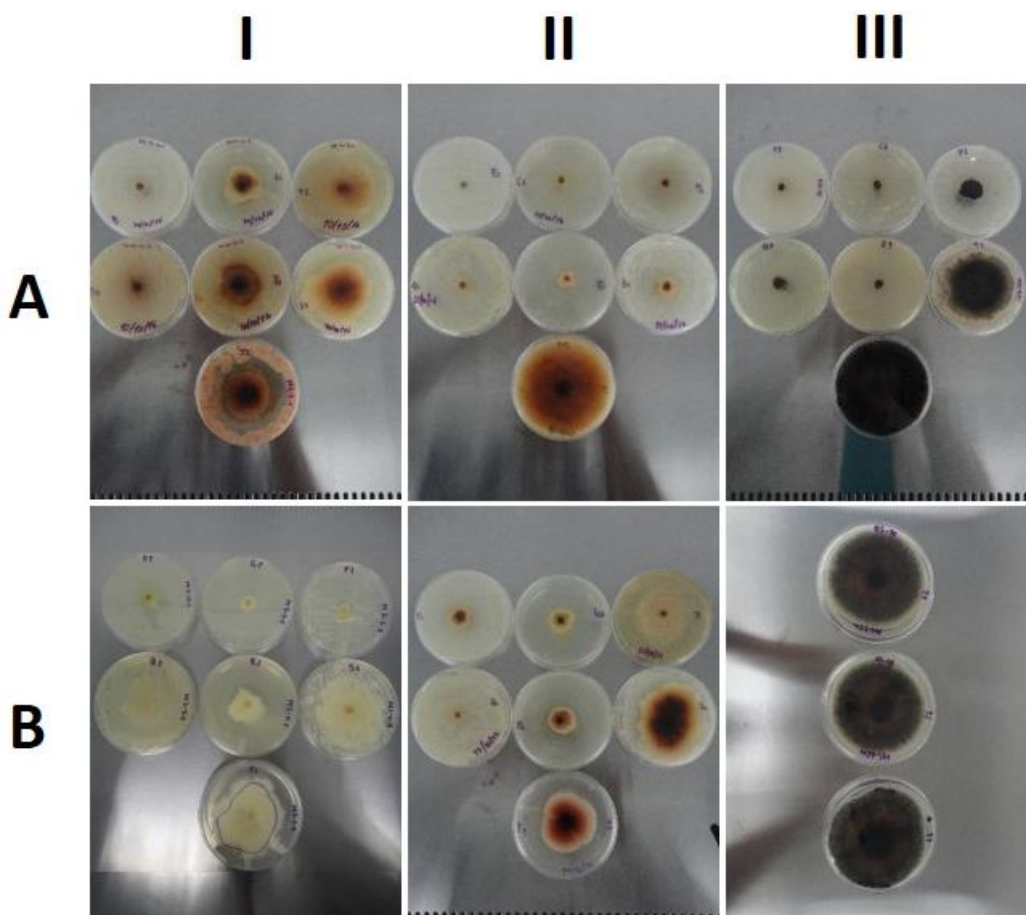


Figura 46. Efecto antagónico in vitro de *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), *Bacillus sp* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) frente a AI: *Fusarium sp.* M 1-2-1 (D); All: *Fusarium sp.* F15 (E); AllI: *Alternaria alternata*M5-62N (I). Abajo en cada fotografía testigo sin presencia de bacterias. BI: *Fusarium equiseti* M 3-1-1 (J); BII: *Fusarium equiseti* F9 (T). En BIII se observa las tres repeticiones del tratamiento testigo de *Alternaria alternata*M5-62N (I).

De manera general, los mejores resultados corresponden al aislado DCL4-31 (F) identificado como *Bacillus subtilis* (Ver Figura 46), el cual inhibe el crecimiento entre el 83 y el 100% en cuatro de los cinco hongos fitopatógenos (Ver Anexo 4, pág. xxi). A pesar de que la cepa LS6-11 (G) también se identificó como *Bacillus subtilis* no obtuvo los mismos resultados; esto concuerda con lo que refiere (Lagunas-Lagunas *et al.*, 2001) que cepas de una misma especie, pueden exhibir diferentes capacidades para inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos. No obstante, las demás cepas evaluadas también inhibieron en cierto grado a alguno de los fitopatógenos. Las cepas LS6-211 P y X5-9CD2 S, *Bacillus sp.* y *Bacillus cereus* respectivamente, frente al fitopatógeno T (*Fusarium equiseti*) obtuvieron porcentajes negativos de inhibición -24.52 y -45.16% (Ver Anexo 4, pág. xxi), debido a que el hongo creció más rápido en presencia de estas bacterias en comparación a su crecimiento como testigo (Estimulación). Esto se puede evidenciar con el

aumento de la tasa de crecimiento presentado en la Cuadro 8, de 0.24 y 0.28 cm/día, siendo mayor que en el testigo que crecía 0.19 cm/día.

El efecto protector de los miembros del género *Bacillus* utilizados en el control de enfermedades fúngicas, puede deberse a la presencia de diferentes mecanismos para antagonizar de forma directa o indirecta el crecimiento de patógenos (Tejera *et al.*, 2012). Varios autores han informado la actividad antagónica del género *Bacillus* contra diferentes hongos fitopatógenos (Reinoso Pozo *et al.*, 2007), lo que se atribuye a la producción de compuestos de naturaleza peptídica y lipopeptídica como las micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, fungistatinas y micosubtilinas (Souto *et al.*, 2004); compuestos que han demostrado ser efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos *in vitro* o *in situ* (Badía *et al.*, 2011; Sosa *et al.*, 2005; Corrales *et al.*, 2011). Entre los mecanismos de acción implicados en el control biológico están el parasitismo directo y muerte del patógeno, competencia por nutrientes, inducción de resistencia sistémica en la planta, disminuyendo el efecto dañino de los fitopatógenos (Orietta & Larrea, 2001). Este efecto inhibitorio de las especies de *Bacillus* sobre hongos que causan enfermedades en las plantas puede estar asociado a la producción de enzimas que actúan en la degradación de la pared celular como las quitinasas y proteasas (Rodas *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos evidencian una vez más lo reportado por (Sosa, *et al.* 2005) sobre el elevado potencial que presentan las bacterias del género *Bacillus* para el control biológico en condiciones *in vitro*, ya que está demostrado por numerosos autores que los microorganismos pertenecientes a este género se caracterizan por tener la capacidad de producir sustancias, tales como, metabolitos, antibióticos, enzimas líticas, entre otras que aisladas, purificadas y producidas a gran escala son una valiosa alternativa del control químico, que tanto se ha encarecido a nivel Internacional y del cual existe una tendencia cada vez más generalizada a disminuir su uso, debido precisamente a los daños que ha causado al hombre y al medio ambiente.

Un resultado muy interesante que deberá seguirse profundizando en investigaciones futuras, fue el mostrado por la cepa DCL12-11 (Q) identificada como *Rhizobium sp.*, la cual ha sido ampliamente reportada como estimulante cuando se aplica a cultivos de leguminosas (frijol, arveja, garbanzo, lentejas, entre otras) (Hernández *et al.*, 2012), no obstante como se puede apreciar en la Figura 5, también inhibe entre 50-90% (72.8% en promedio) a determinados fitopatógenos (*Alternaría alternata*, *Fusarium sp.* y *Fusarium equiseti*). Estos resultados coinciden con los reportados por Santillana *et al.*, (2012) en el que cepas de *Rhizobium* evaluadas mostraron potencial antagónico con *Alternaría solani* y *Fusarium sp.*, con

porcentajes de inhibición hasta de 49% y de 43% respectivamente (Ver Anexo 4, pág. xxi).

Los resultados de estos ensayos indican que es posible considerar que las cepas evaluadas podrían utilizarse como una alternativa en el control biológico de estos hongos fitopatógenos, mediante la aplicación individual o en mezcla para obtener una mayor eficiencia en el control de estos.

7.4.2. Pruebas de antagonismo en invernadero

✓ Selección de la cepa microbiana

Para la fase de invernadero se trabajó con la cepa de *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), la cual expresó los mejores resultados en las pruebas de antagonismo in vitro (Véase Anexo 5, Artículo científico), presentando un porcentaje de inhibición de: 100% contra *Alternaría alternata* M5-62N (I) (Figura 47 BI), 49.68% contra *Fusarium equiseti* F9 (T) (Figura 47 BII), 98.33 % contra *Fusarium sp.* F15 (E) (Figura 47 BIII), 83.96 % contra *Fusarium equiseti* M3-1-1 (J) (Figura 47 BIV) y 94.23% contra *Fusarium sp.* M1-2-1 (D) (Figura 47 BV) (Méndez-Úbeda *et al.*, 2017).

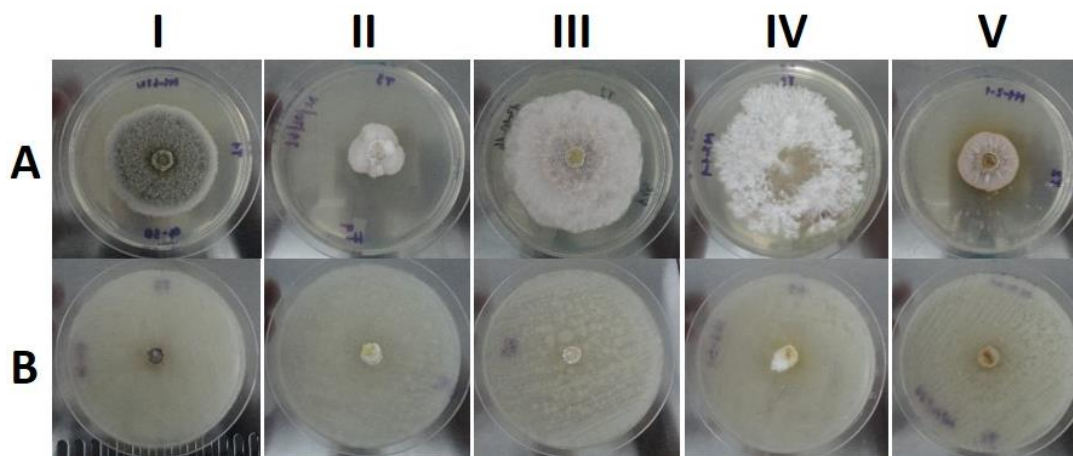


Figura 47. Efecto antagonístico de la cepa DCL4-31 F identificada como *Bacillus subtilis* frente a los diferentes fitopatógenos. En la fila A, de AI-AV tratamientos testigos de los fitopatógenos; en la fila B, de BI-BV tratamientos de F contra fitopatógenos. De izquierda a derecha de I a V: *Alternaría alternata* M5-62N (I), *Fusarium equiseti* F9 (T), ambos con 6 días de crecimiento; *Fusarium sp.* F15 (E) con 7 días; *Fusarium equiseti* M3-1-1 (J) y *Fusarium sp.* M1-2-1 (D) con 9 días.

✓ **Cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* DCL4-31 cepa F (Curva de crecimiento por determinación turbidimétrica)**

Las células necesitan condiciones favorables que beneficien su proceso de reproducción. Cuando las condiciones son óptimas, las células pasan por diferentes fases que son características de todas las formas de vida microbiana. El conocimiento de la cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis*, permite identificar las fases características del crecimiento de la bacteria.

Páramo (2012), realizó un ensayo de cinética de crecimiento microbiano a dos cepas de *Bacillus subtilis* (IS16 y IIS10), para lo cual utilizó un medio de cultivo LB esteril; la corrida cinética inicio agitando la muestra a 150 rpm y leyendo absorbancia a 540 nm cada 2 horas; se empleó el método de recuento en placa, para determinar la concentración de células, obteniendo resultados similares en ambas cepas. Como resultados obtuvo que la fase de adaptación fue cercana a las 6 horas, a partir de la cual entran en fase exponencial permaneciendo así hasta 20 horas, entrando posteriormente en la fase estacionaria en la cual se detuvo el experimento. Las concentraciones obtenidas al final del experimento para la cepa IS16 fueron de $8.13E+08$ UFC/mL y la cepa IIS10 de $9.56E+08$ UFC/mL y una absorbancia final de 2.44 y 2.87 respectivamente.

En este estudio, la etapa de latencia (fase lag) de la bacteria *Bacillus subtilis*, se encontró en los primeros 75 minutos del experimento (1.25 h), durante ese tiempo la bacteria solo tuvo un incremento en absorbancia de 0.16; la etapa exponencial inicio a los 75 minutos y finalizó a los 285 minutos (de 1.25 hasta 4.75 h), observándose un mayor crecimiento bacteriano al aumentar la lectura de absorbancia de 0.16 a 2.95; posteriormente la bacteria entra a la etapa estacionaria donde deja de crecer, ya sea por agotamiento de nutrientes o por concentración celular.

CURVA DE CRECIMIENTO

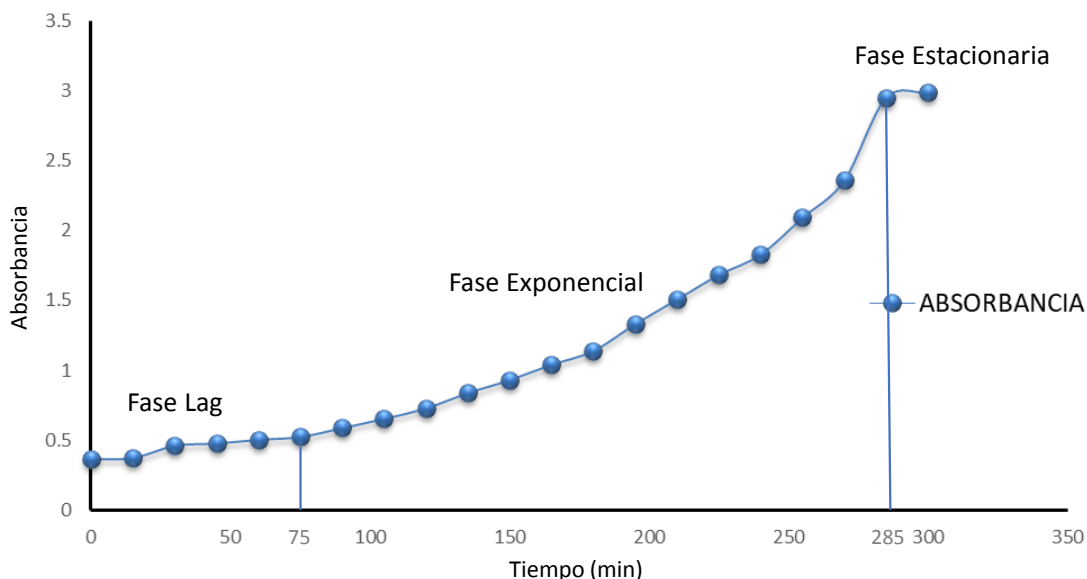


Figura 48. Curva de crecimiento bacteriano (Absorbancia Vs Tiempo)

En la Figura 48 se pueden observar 3 de las 4 fases del crecimiento microbiano de *Bacillus subtilis*; el cual, a partir de un inoculo inicial alto y en condiciones metabólicas ideales, la fase de adaptación se reduce a 1.25 h. Los valores obtenidos en esta investigación para la cepa de *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), son similares a los reportados por Páramo (2012); el cual, obtuvo concentraciones del mismo orden para ambas cepas de *Bacillus subtilis* evaluadas y valores de absorbancias de la cepa IIS-10, similares a los obtenidos por la cepa DCL4-31 (F) en este estudio. La diferencia está el tiempo de crecimiento obtenido por Páramo (2012), el cual para obtener las concentraciones reportadas, las cepas bacterianas demoraron un periodo de crecimiento de alrededor de 20 horas, mientras que en este estudio el periodo en fase exponencial fue de solo 4.75 horas; esto pudo deberse a las condiciones metabólicas en la que se encontraba la bacteria y a concentración del pre-inoculo, el cual fue alrededor de 5 veces mayor en esta investigación que el pre-inoculo utilizado por Páramo (2012).

La alta velocidad de crecimiento de *Bacillus subtilis*, le permite alcanzar rápidamente el estado estacionario y comenzar a producir metabolitos secundarios con actividad antifúngica y finalmente colonizar el ambiente donde se inocula, ejerciendo un fuerte efecto antagónico sobre los hongos fitopatógenos (Tejera *et al.*, 2012).

✓ **Curva de concentración (UFC/mL), por el método de diluciones seriadas y vaciado en placa**

Ramos (2004), realizó un ensayo de cinética de crecimiento de *Bacillus subtilis* con el fin de comparar la efectividad de dos medios de cultivo (LB-Sigma y Soya) en la producción de bacterias y esporas; obteniendo como resultados un crecimiento máximo de $75.3 \times 10^6 \pm 3.47 \times 10^6$ UFC mL⁻¹ para el medio LB alcanzándose a las 7 h, partiendo de un inóculo inicial de 8.5×10^3 UFC mL⁻¹.

En este experimento, una vez hecho el conteo de UFC en placas Petri, se graficó la curva de concentración de bioplaguicida UFC mL⁻¹ vs Tiempo (min) como se presenta en la Figura 49.

CURVA DE CONCENTRACIÓN

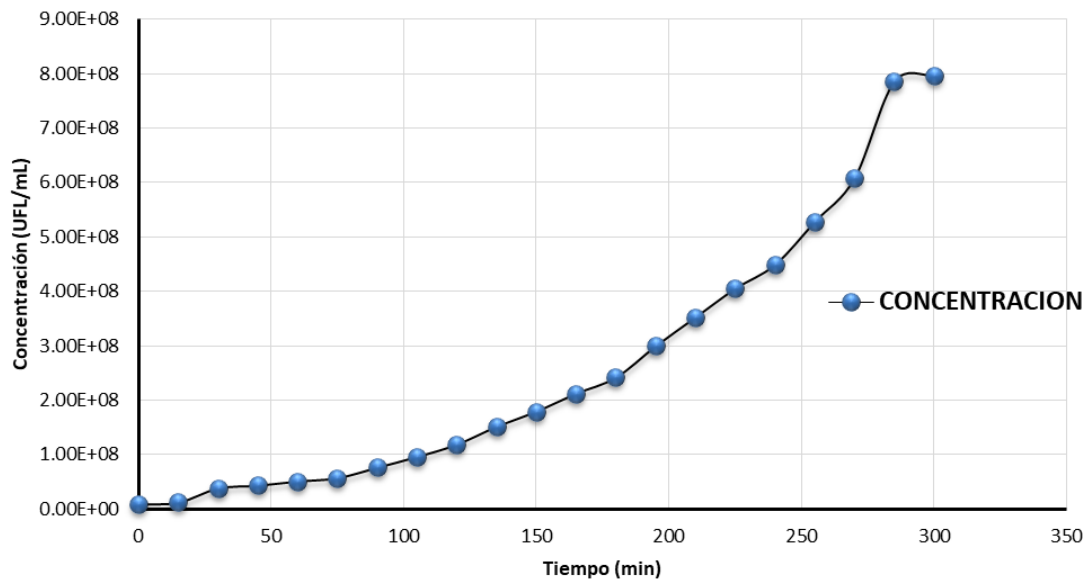


Figura 49. Curva de Concentración del bioplaguicida UFL mL⁻¹ vs Tiempo (min)

Para la determinación de la concentración final del bioplaguicida, se partió de un inóculo inicial de 9.20×10^6 UFC mL⁻¹, el cual se elevó hasta 7.97×10^8 UFC mL⁻¹ en un tiempo de 5 h; este resultado es similar a lo reportado por Ramos (2004), en el que el tiempo en el cual se alcanzó la máxima concentración celular fue a las 7 h utilizando el medio LB; a pesar de que en ambos estudios, la bacteria presentó las mismas condiciones, la diferencia de horas para alcanzar la máxima concentración celular pudo estar influenciada por la concentración del inóculo inicial, el cual fue mucho mayor en este experimento.

✓ **Concentración del bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* aplicado en los tratamientos**

Ruiz-Sánchez et al., (2014), determinaron la actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, inoculando una suspensión bacteriana de 1×10^8 UFC mL⁻¹. En este estudio, las concentraciones del bioplaguicida aplicado en el ensayo en invernadero, fueron determinadas a través de la interpolación de los valores de absorbancia, en la curva de concentración UFC mL⁻¹ vs Absorbancia (Figura 50), la cual fue determinada en el ensayo de cinética de crecimiento microbiano en Laboratorio.

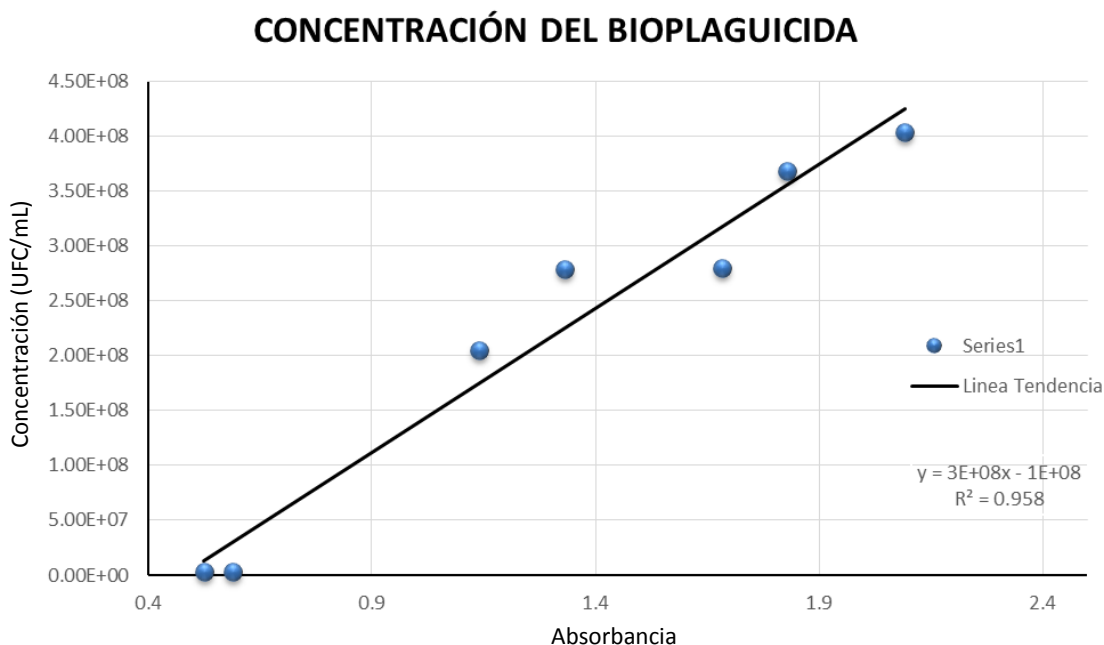


Figura 50. Curva de Concentración del bioplaguicida UFC/mL vs Absorbancia

Para los tratamientos que contemplaron la aplicación del bioplaguicida, las semillas a utilizar fueron cubiertas por una lámina de una solución de bioplaguicida que contenía una concentración de 5.32×10^8 UFC mL⁻¹ de la bacteria *Bacillus subtilis*; posteriormente se realizaron aplicaciones al sustrato a los 25 DDS y aplicaciones al follaje de la planta (tallos y hojas) a los 50 y 75 DDS. En el cuadro que se presenta a continuación, se detallan las concentraciones y periodos de aplicación del bioplaguicida.

Cuadro 9. Concentración de bioplaguicida aplicado

Tiempo de aplicación (DDS)	Siembra	25	50	75
Lectura de Absorbancia	2.106	2.106	2.315	2.404
Concentración (UFC mL ⁻¹)	5.32×10^8	5.32×10^8	5.95×10^8	6.21×10^8

Como se observa en el Cuadro 9, los valores de concentración del bioplaguicida utilizadas en las pruebas de antagonismo en invernadero oscilan en el rango de 5.32×10^8 y 6.21×10^8 ; siendo estos valores similares al reportado por Ruiz-Sánchez *et al.*, (2014).

✓ **Concentración de esporas del Inoculo de los hongos fitopatógenos**

Para la preparación del inóculo de los hongos fitopatógenos, se utilizaron cultivos de una semana de crecimiento en medio PDA, realizando una suspensión de esporas y diluyendo a un volumen de 100 mL de agua destilada estéril. La concentración de esporas (esporas/mL), se determinó a través del recuento en cámara de Neubauer, considerando en el cálculo, el factor de dilución. La concentración de los fitopatógenos inoculados y los periodos de inoculación de los mismos en el experimento, se detallan en el siguiente cuadro:

Cuadro 10. Concentración de hongos Fitopatógeno

Tiempo aplicación (DDS)	Siembra	25	50	75
<i>Alternaria alternata</i>	2.00×10^5	NSC	2.50×10^5	NSC
<i>Fusarium sp</i>	5.45×10^6	3.25×10^6	6.65×10^6	-----
<i>Fusarium equiseti</i>	2.00×10^5	2.50×10^5	3.50×10^5	-----

NSC: No se pudo contabilizar.

Como se observa en el Cuadro 10, la concentración de esporas de los fitopatógenos inoculados en el ensayo en invernadero, se encuentra en el rango de 1×10^5 y 1×10^6 esporas/mL. Corrales *et al.*, (2012), determinaron el efecto biocontrolador de *Bacillus spp.* frente a *Fusarium sp.* bajo condiciones de invernadero, inoculando una concentración ajustada de esporas del fitopatógeno en 1×10^4 esporas/mL. De igual manera Corrales *et al.*, (2011), después de realizar un recuento de conidios de *Fusarium sp.* en cámara de Neubauer, obtuvieron una concentración de 1×10^6 conidios/mL, los cuales fueron posteriormente inoculados en plantas de *Rosmarinus officinalis L* en un ensayo realizado bajo condiciones de invernadero. Las concentraciones de los fitopatógenos aplicadas en este estudio, se encuentran dentro de los rangos aplicados en estudios similares de antagonismo, siendo suficientemente altas para que al ser inoculadas en las plantas de papa (*Solanum tuberosum L*) pudieran causar la manifestación de síntomas de enfermedades en los tratamientos que contemplaron la aplicación de los fitopatógenos.

Una de las reglas básicas del control biológico, está en que el antagonista deberá guardar una proporción de por lo menos 1000:1, para ser eficiente (Falconí & Yáñez, 2007). En este ensayo, se aplicaron concentraciones del bioplaguicida superiores a 1×10^8 UFC mL⁻¹ y como se describió anteriormente, las concentraciones de los

fitopatógenos rondaron en 1×10^5 esporas/mL (*Alternaria alternata* y *Fusarium equiseti*) y 1×10^6 esporas/mL (*Fusarium sp*), cumpliendo con la proporción 1000:1 como requisito de control biológico para los primeros y una proporción de 100:1 en el segundo, con lo cual no se cumplió con el requisito sugerido para el control biológico.

Los casos en los que no se pudo contabilizar fue producto de la alta concentración de esporas, los cuales formaron grumos dificultado la observación individual de las esporas en las cuadrículas de la cámara de Neubauer.

✓ **Resultados de la medición de variables de sanidad**

El **porcentaje de severidad** corresponde al grado de la enfermedad en aquellas plantas que resultaron infestadas en cada muestreo; para esta variable se tomó en cuenta el porcentaje de daño del área total de la planta, después de la siembra (Orjeda, 1998).

En cuanto al **porcentaje de incidencia**, este corresponde al número de plantas infestadas en cada muestreo, después de la siembra; para lo cual, se realizaron conteos entre la población para determinar la incidencia del daño (Orjeda, 1998).

El **porcentaje de eficacia** según la fórmula de Abbot, es el porcentaje que no afectó el hongo patógeno en los tratamientos negativos con respecto al porcentaje afectado en los tratamientos que solo contienen al patógeno.

Corrales *et al.*, (2011), evaluaron el efecto biocontrolador de 4 cepas de *Bacillus spp.*, frente a *Fusarium spp.* bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis L.* siendo una de las cepas utilizadas *Bacillus subtilis cepa B2*, obteniendo resultados significativos de inhibición contra el hongo fitopatógeno evaluado, el cual presentó una severidad de 13.3% y su testigo positivo 50%, lo que da una eficacia del producto aplicado de 73.4 %.

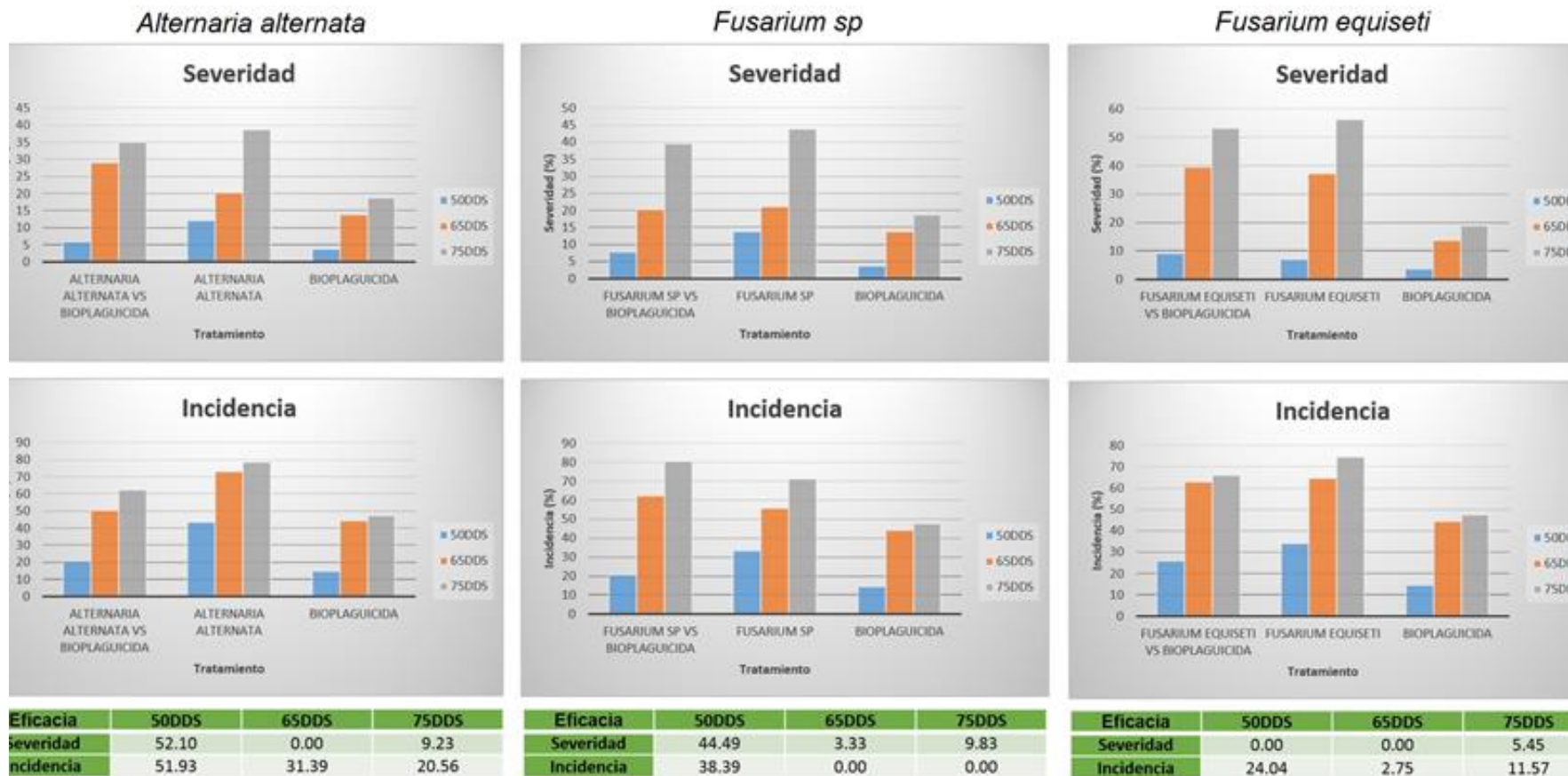


Figura 51. Resultados de variables de sanidad (severidad e incidencia de daños) en ensayo de antagonismo en invernadero.

Al evaluar el efecto biocontrolador de *Bacillus subtilis* contra *Alternaría alternata*, *Fusarium sp* y *Fusarium equiseti* en el cultivo de papa variedad Monte Carlo en condiciones de invernadero, se obtuvieron resultados de inhibición a los 50 DDS contra los hongo fitopatógenos *Alternaría alternata* y *Fusarium sp*. (Figura 51), los cuales presentaron una severidad de 5.83% y 7.71% y sus testigos positivos 12.17% y 13.89%, lo que da una eficacia del bioplaguicida aplicado de 52.10% y 44.49% respectivamente; contra el hongo fitopatógeno *Fusarium equiseti* los resultados obtenidos indican que no hubo inhibición, ya que el hongo presentó una severidad de 9.19% y su testigo positivo 6.91%, lo que da una eficacia del bioplaguicida de 0.00%. Los resultados obtenidos a los 65 DDS, indican que el bioplaguicida no inhibió el desarrollo de los hongos fitopatogenos *Alternaría alternata* y *Fusarium equiseti*, los cuales presentaron una severidad de 29.11% y 39.52% y sus testigos positivos 20.29% y 37.13%, lo que da una eficacia del bioplaguicida de 0.00% para ambos hongos evaluados; en cambio para el hongo fitopatógeno *Fusarium sp*, los resultados indican que hubo inhibición, presentando una severidad de 20.3% y su testigo positivo 21%, lo que da una eficacia del bioplaguicida de 3.33%. A los 75 DDS, se puede observar que el bioplaguicida presenta resultados de inhibición contra los hongos fitopatógenos evaluados *Alternaría alternata*, *Fusarium sp*. y *Fusarium equiseti*, los cuales presentaron una severidad de 35%, 39.52% y 53.13% y sus testigos positivos 38.56%, 43.83% y 56.19%, lo que da una eficacia del bioplaguicida de 9.23%, 9.83% y 5.45% respectivamente (Ver Anexo 3d, Figuras 14-19, pág.xv-xx).

Los resultados obtenidos en este trabajo son similares a los reportados por Corrales *et al.*, (2011), quienes obtuvieron una eficacia del producto aplicado de 73.4%. De igual manera en esta investigación, se obtuvieron resultados de inhibición contra *Alternaría alternata* y *Fusarium sp*. a los 50 DDS, obteniendo eficacias del bioplaguicida aplicado de 52.10% y 44.49%; contra *Fusarium equiseti* el bioplaguicida no inhibió el crecimiento del hongo, siendo la eficacia del producto de 0.00%. Los resultados de inhibición de los hongos fitopatógenos en condiciones de invernadero, concuerdan con los resultados de antagonismo obtenidos en condiciones in vitro, en los cuales se observó que la bacteria inhibió en un menor porcentaje al hongo fitopatógeno *Fusarium equiseti*.

En cuanto a los resultados de Incidencia de daño, se obtuvieron resultados de inhibición contra los hongos fitopatógenos *Alternaría alternata*, *Fusarium sp*. y *Fusarium equiseti* a los 50 DDS, los cuales presentaron una incidencia de daños de 20.83%, 20.54% y 25.88% y sus testigos positivos 43.33%, 33.34% y 34.07%, lo que da una eficacia del bioplaguicida aplicado de 51.93%, 38.39% y 24.04% respectivamente. A los 65 DDS, se obtuvieron resultados de inhibición contra los hongos fitopatógenos *Alternaría alternata* y *Fusarium equiseti*, presentando una

incidencia de daños de 50.11% y 63.02% y sus testigos positivos 73.04% y 64.8%, lo que da una eficacia del bioplaguicida de 31.39% y 2.75% respectivamente; contra *Fusarium sp.* no se observó efecto inhibitorio, presentando el hongo fitopatógeno una incidencia de daños de 62.28% y su testigo positivo 55.77%, lo que da una eficacia del bioplaguicida de 0.00%. De igual manera a los 75 DDS, se obtuvieron resultados de inhibición contra *Alternaría alternata* y *Fusarium equiseti*, presentando una incidencia de daños de 62.5% y 66.04% y sus testigos positivos 78.68% y 74.68%, lo que da una eficacia del bioplaguicida de 20.56% y 11.57% respectivamente; contra *Fusarium sp.* no se observó efecto inhibitorio, presentando el hongo fitopatógeno una incidencia de daños de 80.36% y su testigo positivo 71.25%, lo que da una eficacia del bioplaguicida de 0.00%.

La re inoculación de los hongos fitopatógenos al follaje de la planta a los 65 y 75 DDS y la alta concentración de esporas de los hongos fitopatógenos aplicados, no considerando la proporción 1000:1 que debe guardar el antagonista para ser eficiente en el control biológico del fitopatógeno, pudieron ser las causas de la baja eficacia del bioplaguicida en estos periodos evaluados.

En este experimento se utilizó un diseño de bloques completos al azar con 8 tratamientos y 4 repeticiones. Al realizar el análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparación de medias de Tukey a variables de tanto en el desarrollo vegetativo del cultivo de papa (Diámetro de tallo, Altura de tallo, Número de tallos y Número de hojas), variables de Cosecha (Número de tubérculos, Diámetro polar, Diámetro ecuatorial, Peso de tubérculo y Rendimiento) y variables de sanidad (Severidad e Incidencia de Daño), no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados. Estos resultados coinciden con lo reportado por Corrales *et al.*, (2012), el cual realizó una investigación en invernadero utilizando cepas de *Bacillus subtilis*, al analizar el número de ramas y parte aérea de las plantas al inicio y al final, el análisis estadístico de los datos mostró que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los tratamientos evaluados, pero si en la raíz, se puede deber a que las bacterias del genero *Bacillus spp.*, han sido reportadas en la literatura como promotoras de crecimiento vegetal al estimular el desarrollo de las raíces de las plantas; cabe destacar que aunque en esta investigación no se evaluó el peso ni longitud radicular, se pudo observar que los tratamiento en los que se inoculo la bacteria *Bacillus subtilis*, presentaron un mayor sistema radicular (Ver Anexo 3d, Figuras 17-19, pág.xviii-xx).

VIII. CONCLUSIONES

La realización del presente trabajo y el análisis de los resultados alcanzados, permiten plantear las siguientes conclusiones considerando los objetivos que se propusieron al inicio del mismo:

- ✓ A partir de las muestras de cuatro bioinsumos artesanales se logró obtener 30 aislados, entre ellos 23 bacterias, 6 hongos filamentosos y 1 hongo levaduriforme, mediante la utilización tres medios de cultivos enriquecidos (PDA, AN y PCA).
- ✓ Morfológicamente en los aislados bacterianos se identificaron 22 bacilos: 12 Gram positivos que se ubicaron dentro del género *Bacillus*, 7 Gram negativos y 3 Gram variables, además de 1 coco Gram positivo. En cuanto a los hongos aislados, se observaron diferentes características macroscópicas como color y forma en placa y microscópicas como la forma y color de la conidia, sin embargo, estas observaciones solo nos permitieron sugerir el género del aislado LSVI-12 como *Penicillium sp.* El hongo levaduriforme se identificó como un posible *Aerobasidium pullulans* por sus características en placa y al microscopio de luz. Con respecto a los hongos fitopatógenos, se corroboró el género mediante observación de esporas al microscopio de luz obteniéndose: 1 *Alternaría* y 2 *Fusarium* aislados de papa (*Solanum tuberosum*), además de 2 *Fusarium* aislados de maní (*Arachis hypogaea*).
- ✓ Mediante técnicas moleculares, se identificaron 14 bacterias (11 aisladas de los bioinsumos y 3 aisladas de ciego de pollo) destacándose el género *Bacillus*. Dentro de estas a nivel de especie se identificaron 2 aislados de *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G), 3 de *B. cereus* X5-9E2 (O), X2-10(2)2 (R) y X5-9CD2 (S); *B. megaterium* LS5-11 (B), *B. flexus* DCL2-411 (H) y *B. pumilus* TS13-1111 (N) cada uno con un aislado. Además, un aislado de *Agrobacterium tumefaciens* DCL12-21 (L) y un *Staphylococcus succinus* LL8-111 (M). A nivel de género se obtuvieron *Lysinibacillus sp.* DCL1-2 (A), *Bacillus sp.* TS11-3 (C) y LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q). De la misma forma se identificaron 5 hongos fitopatógenos, 3 a nivel de especie: *Alternaría alternata* M5-62N (I) y *Fusarium equiseti* M3-1-1 (J) y F9 (T), y 2 a nivel de género: *Fusarium sp.* M1-2-1 (D) y F15 (E). *Alternaría alternata* y *Fusarium equiseti* han sido reportados en nuestro país como patógenos de diferentes cultivos, sin embargo no se han reportado hasta donde se conoce en Nicaragua, afectando al maní y a la papa, cultivos a partir del cual se aislaron los patógenos aquí identificados.
- ✓ Como producto de la preselección (Screen grueso) de cepas bacterianas antagonistas, se obtuvo 6 cepas con potencial antagónico de 26 evaluadas, estas fueron identificadas como: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G), *Bacillus sp.* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-

10(2)2 (R) y X5-9CD2 (S). El aislado DCL4-31 (F) correspondiente a *Bacillus subtilis*, fue el que presentó el mejor porcentaje de inhibición con un rango de 50-100%, pudiéndose considerar como una alternativa en el control biológico de hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Alternaría*. Los demás aislados presentaron distintas capacidades de inhibir a los fitopatógenos. Un resultado muy interesante fue el mostrado por la cepa DCL12-11 (Q) identificada como *Rhizobium sp.*, la cual inhibió entre 50-90% el crecimiento de los fitopatógenos *Alternaría alternata*, *Fusarium sp.* y *Fusarium equiseti*; estos resultados sugieren considerar su aplicación no solo como bioestimulante, sino también como bioprotector al inhibir de crecimiento de ciertos fitopatógenos.

- ✓ La cepa aislada de *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), demostró tener un crecimiento acelerado en el ensayo de cinética a nivel de laboratorio, pasando a concentraciones elevadas en un periodo de tiempo de 5 horas. La alta velocidad de crecimiento, le permite alcanzar rápidamente el estado estacionario y comenzar a producir metabolitos secundarios con actividad antifúngica y finalmente colonizar el ambiente donde se inocula, ejerciendo un fuerte efecto antagónico sobre los hongos fitopatógenos.
- ✓ Finalmente, en las pruebas de confrontación a nivel de invernadero, para determinar el efecto antagonista del bioplaguicida a base de *Bacillus subtilis* contra los hongos fitopatógeno *Alternaría alternata*, *Fusarium sp.*, *Fusarium equiseti*, el bioplaguicida presentó resultados de inhibición a los 50 DDS contra los hongos fitopatógenos *Alternaría alternata* y *Fusarium sp.*, obteniendo una eficacia del bioplaguicida aplicado de 52.10% y 44.49% respectivamente; contra el hongo fitopatógeno *Fusarium equiseti* los resultados obtenidos indican que no hubo inhibición.

IX. RECOMENDACIONES

Al presentar los resultados de esta investigación, se abren nuevas puertas y nuevas interrogantes continúan por resolver, por ello se sugieren considerar las siguientes recomendaciones:

- ✓ Especial interés deberá prestarse a la cepa identificada como *Rhizobium sp*, estudiando su actividad como antagonista de patógenos ya que esto podría incrementar su aplicación no solo desde el punto de vista de la bioestimulación, sino debido a su efecto antagónico de patógenos.
- ✓ Identificar molecularmente las cepas de bacterias, hongos filamentosos y levaduriforme aisladas de los bioinsumos que no se secuenciaron en este trabajo, por no ser de interés en la búsqueda de *Bacillus subtilis*, para obtener conclusiones definitivas acerca de las especies y tipos de microorganismos presentes en los bioinsumos actualmente elaborados de manera artesanal en Nicaragua.
- ✓ En la realización de futuros ensayos de antagonismo en invernadero y/o campo, considerar la proporción 1000:1 que debe guardar el antagonista para ser eficiente en el control biológico del fitopatógeno.
- ✓ Realizar otras evaluaciones en condiciones semi controladas (invernadero) y no controladas (campo abierto), considerando los resultados obtenidos en esta investigación, con el fin de corroborar su efecto biocontrolador de *Bacillus subtilis* cepa DCL4-31 (F) contra hongos fitopatógenos en cultivos de interés agrícola. Esto debido a que los controladores biológicos deben utilizarse después de su respectiva validación en campo (in vivo) aportando a una de las políticas actuales en Nicaragua, que es la búsqueda de soluciones efectivas más inocuas y económicas para sustituir los plaguicidas y agroquímicos.
- ✓ Determinar la producción de sustancias promotoras de crecimiento vegetal así como la capacidad de solubilizar fosfatos de los aislados del género *Bacillus* (*Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, entre otros) ya que estas características han sido reportadas por diversos autores, con el fin aprovechar al máximo sus capacidades.

X. BIBLIOGRAFIA

- Acevedo, Y. (2013). Taxonomía molecular de aislamientos de *Fusarium* obtenidos a partir de muestras clínicas. Tesis inedita para optar al título de Magíster en Ciencias - Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, sede Medellín.
- Acuña, I., & Tejeda, P. (29 de 12 de 2015). Manual Interactivo de la papa INIA. Obtenido de Enfermedades causadas por hongos:
<http://manualinia.papachile.cl/?page=manejo&ctn=214>
- Agrios, G. (1995). Fitopatología (Segunda ed.). México D.F.: Editorial Limusa. Cap. 9. Pág. 192-195.
- Alejos, L., Aragón, M., & Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha, Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos (págs. 1-26). México, D.F.
- Álvarez, C., Osorio, N., & Montoya, M. (2013). Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 293-305.
- Álvarez, E. (15 de octubre de 2015). Doc slide. Obtenido de Doc slide:
<http://myslide.es/documents/aislamiento-de-microorganismos-del-medio-ambiente.html>
- Aoki, T., O'Donnell, K., & Scandiani, M. (2005). Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. Nov., *F. cuneirostrum* sp. Nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience*, (46), 162-183.
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Trabajo de Grado para optar al título de Microbiólogas Industriales, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Arias, J., & Jeréz, A. (2008). Elaboración de un atlas para la descripción macroscópicas y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la sabana de Bogotá. Trabajo de Grado para optar al título de Microbiólogas Industriales, Pontificia Universidad Javeriana.
- Badía, M., Hernández, B., Murrel, J., Mahillon, J., & Pérez, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L). *Revista Brasileña de Agroecología*, 90-99.
- Barnet, J., Payne, R., & Yarrow, D. (2000). YEAST: Characteristics and identificación. Cambridge, England: Cambridge University Press.

- Barquero, I., Campos, S., Tobar, M., Guerrero, A., Sánchez, J., & Landinez, L. (2007). Informe de vigilancia tecnológica. Bioinsumos. Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (COLCIENCIAS). Bogotá, Colombia: Cargraphics.
- Baudalf, S. (2003). Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics*, 19(6), 345-351.
- Bautista, S. (2006). El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: Uso de microorganismos antagonicos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 8(001).
- Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, C., & Corrales, L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *NOVA*, 147-153.
- Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, C., & Corrales, L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *NOVA*, 147-153.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., & Valdezate, S. (2011). Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infecc Microbiol Clín*, 29(8), 601-608.
- Bravo, L. (2014). Microorganismos. Trabajo de fin de Master. Master de Profesor de ESO y Bachillerato, Formación Profesional y Enseñanzas de Idiomas. Universidad de Valladolid.
- Broca Perez, B. (22 de junio de 2009). Repositorio Dspace. Obtenido de Repositorio de Tesis del Instituto Politécnico Nacional:
<http://tesis.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/3767/1/EVALUACIONEXPERIMENTAL.pdf>
- Cabeza, E. (2013). Desarrollo de un modelo de relación entre densidad optica (método turbidimétrico) vs recuento en placa. Universidad de Pamplona, Facultad de Ciencias Básicas, Departamento de Microbiología. Colombia.
- Camejo, L., Duarte, L., Companioni, J., & Paneque, P. (2010). Tecnología de riego y fertirrigación en ambientes controlados. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* vol. 19, no. 1, 95-97.
- Cañedo, R., & Arencibia, R. (2004). Bioinformática: en busca de los secretos moleculares de la vida. *ACIMED*, 12(6).

- Carrillo, L. (2003). Alternaria. En Los Hongos de los Alimentos y forrajes (págs. 70-86). Universidad Nacional de Salta, Argentina.
- Carrillo, L., & Audisio, M. (2007). Levaduras. En L. Carrillo, & M. Audisio, Manual de microbiología de los alimentos (págs. 40-46). UNJU.
- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F., Gallegos-Morales, G., Flores-Olivas, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. (2015). Efectividad in vitro de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia solani*. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas, 549-562.
- Chen, K., Yang, J., & Zhao, H. (2013). Isolation and characterization of a *Bacillus* strain for alkaline wastewater treatment. African Journal of Microbiology Research. 7 (44), 5119-5125.
- Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. Appl Environ Microbiol. Vol. 71, núm. 9, 4951-4959.
- Corrales, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Bautista, D., González, L., & Guevara, M. (2011). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus spp.*, frente a *Fusarium sp.*, bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis L.* NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas vol. 8 no. 13, 63-75.
- Corrales, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Joya, J., & Marquez, K. (2012). Efecto biocontrolador de *Bacillus spp.*, frente a *Fusarium sp.*, bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris L.*). NOVA. Publicación científica en ciencias biomédicas , 64-82.
- Crueger, W., & Crueger, A. (1989). Biotecnología: Manual de microbiología industrial. 1ra Edición. Zaragoza, España: Acribia S.A.
- Cuervo, J. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus spp* como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Trabajo de Grado para optar al título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Elhayes, J. (7 de marzo de 2017). Easy harvest potato planter. Obtenido de youtube.com: <https://www.youtube.com/watch?v=zszmMPTg4wY>
- Fernández, O., & Vega, L. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)(62), 96-100.
- Fernández-Ortuño, D., Loza-Reyes, E. A., & Fraaije, B. (2010). The CYP51C gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the

Fusarium species complex and a novel target for species-specific PCR. .
International Journal of Food Microbiology, (144), 301-309.

- Flores, M., & Roque, E. (2017). Aislamiento y caracterización microbiana (microbiológica y molecular) en la búsqueda de *Bacillus subtilis* a partir de bioinsumos comerciales y pruebas de antagonismo frente a hongos fitopatógenos. Trabajo Monográfico para optar al Título de Ingeniero Agrícola. Universidad Nacional de Ingeniería. Managua, Nicaragua.
- Froni, L. (2005). Los microorganismos: Estructuras y funciones. Introducción a la Microbiología. En Microbiología: básica, ambiental y agrícola (págs. 13-15). Montevideo, Uruguay: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República Oriental de Uruguay.
- García-Gutiérrez, & González-Maldonado. (2013). Síntesis sobre el uso de Bioinsecticidas y otros agentes de control biológico de plagas en México. ResearchGate, 35-42.
- Handelsman, J., Raffel, S., Mester, E., Wunderlich, L., & Grau, C. (1990). Biological Control of Damping-Off of Alfalfa Seedlings with *Bacillus cereus* UW85. Applied and Environmental Microbiology, vol. 56, núm. 3, 713-718.
- Hernández, D., & Loaiza, S. (2014). Selección de un método para la conservación y preservación de Actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira. Anteproyecto de Trabajo de Grado para optar al título de tecnóloga Química, Universidad Tecnológica de Pereira.
- Hernández, J., Cubillos-Hinojosa, J., & Milian, P. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium spp.*, asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. Revista Colombiana de Microbiología Tropical. 2(2), 51-62.
- Hernández-Castillo, F., Lira-Saldidar, R., Cruz-Chávez, L., Gallegos-Morales, G., Galindo-Cepeda, M., Padrón-Corral, E., & Hernández-Suárez, M. (2008). Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus spp.* y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de papa (*Solanum tuberosum* L.). Revista Internacional de BOTANICA EXPERIMENTAL, 241-252.
- IICA & MAG. (1992). Componente de fortalecimiento de la dirección general de protección y sanidad agropecuaria. Sub-componente de sanidad vegetal (Vol. V). (B. V. IICA, Ed.). Managua, Nicaragua.
- IICA; MAGFOR; Cooperación Austriaca;. (2009). Estado de la Agricultura Orgánica en Nicaragua: Propuesta para su Desarrollo y Fomento. Managua, Nicaragua: IICA, 2009.

- INTA Estación Experimental Agropecuaria La Consulta. (2016). Producción Integrada de Tomate para Industria. INTA Estación Experimental Agropecuaria. Argentina.
- INTA. 2004, 9.-1. 3.-4. (s.f.). Guía manejo integrado de plagas en el cultivo de la papa.
- IPSA. (2016). Lista de plagas reportadas en Nicaragua IV versión. Managua: Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA).
- Jiménez, D. (2007). Caracterización molecular de cepas nativas Colombianas de *Azotobacter spp.* mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. Trabajo de Grado para optar al título de Microbiólogo Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Kikot, G. (2012). Caracterización bioquímica, fenotípica y molecular de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de la region pampeana en relación a la patogenicidad. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.
- Kim, P., & Chung, K. (2004). Production of an Antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. FEMS Microbiology Letters(234), 177-183.
- Knaak, N., Rohr, A., & Fiuza, L. (2007). In vitro effect of *Bacillus thuringiensis* strains and cry proteins in Phitopathogenic fungi of Paddy Rice-Field. Brazilian Journal of Microbiology(38), 526-530.
- Kokalis, N., Kloepper, J., & Reddy, M. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indogenous rhizosphere microorganism. . Applied Soil Ecology(31)., 91-100.
- Lafuente-Rincón, D., Barboza-Corona, J., Salcedo-Hernández, R., Abraham-Juárez, R., & Quistián-Martínez, D. (2016). Identificación molecular de hongos fitopatógenos de fresa por PCR (ITS y EF-1 α) y susceptibilidad a bacteriocinas de *Bacillus thuringiensis*. Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos, 1(1), 417-422.
- Lagunas-Lagunas, J., Zavaleta-Mejía, E., Osada-Kawasoe, S., & Aranda-Ocampo, S. (2001). *Bacillus firmus* como Agente de Control Biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Revista Mexicana de Fitopatología. 19 (1), 57-65.
- Lastres, L., & Soza, F. (febrero de 2009). En Manual de sanidad vegetal. Programa para la agricultura sostenible en laderas de América Central. Carrera de ciencia y producción agropecuaria (págs. 30-53). Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras.

- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L., & Sánchez, L. (2011). *Bacillus spp.*; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Publicación científica en ciencias Biomédicas*, 9(15), 177-187.
- Madigan, M., Martinko, J., & Thomas, B. (2006). *Brock biology of microorganisms*. New Jersey: Upper Saddle River.
- MAGFOR, INTA, IICA, COSUD, & EMBAJADA DE AUSTRIA/COOPERACION PARA EL DESARROLLO. (2005). *Estrategia Nacional para el fomento de la producción orgánica de Nicaragua*. Managua, Nicaragua.
- Maldonado, E., Ochoa, L., & Tlapal, B. (2008). Efecto del ácido acetil salicílico y *Bacillus subtilis* en la infección causada por Cucumber mosaic virus en calabacita. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14(1), 55-59.
- Marlow, D. (1 de mayo de 2011). Elementos fundamentales de un invernadero hidropónico. Obtenido de *Hortalizas* : <http://www.hortalizas.com/horticultura-protegida/invernadero/elementos-fundamentales-de-un-invernadero-hidroponico/>
- Márquez, L., Serrato, A., & Cerritos, R. (2013). Secuenciación de fragmentos de ADN. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* (págs. 231-249).
- Melentev, A., Helisto, P., Kuzmina, L., Galimzyanova, N., Aktuganov, & Korpela, T. (2006). Use of antagonistic *Bacilli* for biocontrol fungi degrading fresh wood. *Applied Biochemistry Microbiology* (42), 70-75.
- Méndez-Úbeda, J., Flores, M., & Páramo-Aguilera, L. (2017). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente a hongos fitopatógenos. *NEXO. Revista Científica*. Vol. 30, No. 2, 96-110.
- Meneses, C., Rozo, L., & Franco, J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et Technica*, XVI(49), 116-121.
- Montesinos, E. (2013). Los bioplaguicidas: expectativas y nuevos retos. *Phytoma España*, 245: 14. Obtenido de <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4257020>
- Moreno, J., & Albarracín, V. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)*. Serie Microbiología, 79-93.
- NETAFIM. (18 de 07 de 2017). Instalación y operación de goteros PCJ de Netafim con manifold de distribución y goteros flecha para macetas. Obtenido de YouTube: <https://www.youtube.com/watch?v=-MNpZfonTEg>

- Orberá, T., Serrat, M., & Ortega, E. (2014). Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola. *Biotecnología Aplicada* 2014; Vol.31, 7-12.
- Orietta, F., & Larrea, V. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo integrado de plagas (Costa Rica)*. 62, 96-100.
- Orjeda, G. (1998). Evaluation of Musa germplasm for resistance to Sigatoka. Wageningen, Holanda.
- Páramo, L. (2012). Caracterización de comunidades microbianas con potencial biotecnológico para la prevención del deterioro estructural. Tesis doctoral para obtener el Título de Doctor en Ciencias de la Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica. Reynosa, México.
- Páramo, L. (2014). Práctica de laboratorio. Temas I y II: Cinética enzimática y cinética microbiana. Modulo IV: Ingeniería de los bioprocesos. Maestría Interinstitucional en Biotecnología. Managua, Nicaragua.
- Pedrique, M., & De Castro, N. (2008). Reproducción y Crecimiento Microbiano. Catedra de Microbiología - Facultad de Farmacia (págs. 1-23). UCV.
- Peréz, R. (2006). Unidad II Técnicas de Aplicación en Microbiología. En Guía de estudio para la asignatura de microbiología general (págs. 23-43).
- Pérez, R. (2012). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en pepino (*Cucumis sativus L.*). Tesis de maestría, para obtener el grado de Maestra en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. México.
- Pérez, R., Gonzalez, T., & Muñoz, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3), 53-60.
- Pérez, M., & Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. En U.D. Medicina; Temas de bacteriología y virología médica (2da Edición).
- Raghavendra, J. (2006). Identification and Characterization of Novel Genetic Markers Associated with Biological Control Activities in *Bacillus subtilis*. *APS Journal*, 92(2), 145-154.
- Ramírez, J. (2011). Producción y evaluación de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma harzianum* para el control de la sarna de la papa "*Streptomyces spp.*". Tesis para obtener el grado de Maestría en Recursos Naturales y Medio Ambiente. Instituto Politécnico Nacional. Sinaloa, México.

- Ramos, F. (2004). Cultivo de *Bacillus subtilis* cepa 105 en biorreactor y su actividad antagonista contra *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias de Desarrollo de productos Bióticos. Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México.
- Reinoso Pozo, Y., Vaillant Flores, D., Casadesús Romero, L., García Pérez, E., & Pazos Álvarez-Rivera, V. (2007). Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, 11(1), 35-40.
- Reinoso, Y., Casadesús, L., García, A., Gutiérrez, J., & Pazos, V. (2006). Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*, Vol. 10, No. 3, 187-191.
- Rodas, B., Quero, M., Magaña, H., & Reyes, A. (2009). Selección de cepas nativas con actividad Quitino-Proteolítica de *Bacillus* sp. aisladas de suelos tropicales. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 107-113.
- Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *ELSEVIER*, Vol. 22, No. 4, 238-245.
- Rodríguez, C. (2013). Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en Tomate (*Solanum lycopersicum*) variedad Santa Clara, aislados de residuos Ligno Celulósicos de Higuierilla (*Ricinus communis*). Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de: Especialista en Microbiología Industrial, Universidad Católica de Manizalez.
- Rojas, A. (2011). Práctica 3. Preparación de medios de cultivo, medios selectivos y diferenciales. En *Conceptos y práctica de microbiología general* (págs. 32-38). Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M., Cristóbal-Alejo, J., Valencia-Botín, A., & Reyes-Ramírez, A. (2014). Actividad antagonica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* vol. 5 no. 7, 1325-1332.
- Sandoval Villa, M. (2010). Desifeción de sustratos. Primer curso Nacional de Sustratos. Colegio de Postgraduados. Texcoco, Estado de México.
- Sandria, J. (2003). Aplicaciones de la Inteligencia Artificial al análisis de Biosecuencias. Universidad Veracruzana. Veracruz, México: Tesis para obtener el grado de Maestro en Inteligencia Artificial. Universidad Veracruzana.

- Santambrosio, E., & Ortega, M. (2009). Siembra y recuento de microorganismos. Cátedra de Biotecnología, Universidad Tecnológica Nacional.
- Santillana, N., Zúñiga, D., & Arellano, C. (2012). Capacidad promotora del crecimiento en cebada (*Hordeum vulgare*) y potencial antagónico de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli*. *Agrociencia Uruguay*. 16 (2), 11-17.
- Scragg, A. (1996). *Biotecnología para Ingenieros: Sistemas biológicos en procesos tecnológicos*. 1ra. Edición. México: Limusa.
- Sela, G. (23 de 08 de 2017). Los sistemas de riego por goteo. Obtenido de Smart Fertilizer Management : www.smart-fertilizer.com/es/articles/drip-irrigation
- Shoda, M. (2000). Bacterial Control of Plant Diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*(89), 515-521.
- Solano, C. (2006). *Microbiología General (Guión de Prácticas)*. Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales. UPNA/CSIC.
- Sosa, A., Pazos, V., & Torres, D. (2005). Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. *Centro Agrícola*, 25-29.
- Souto, G., Correa, O., Montecchia, M., Kerber, N., Pucheu, N., Bachur, M., & García, A. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 1247-1256.
- Strange, N., & Scott, P. (2005). Plant disease: A threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol*, 43, 83-116.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. (2012). Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo de arroz (*Oriza sativa* L). *Revista de Protección Vegetal* vol.27 no.2, 117-122.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M., & Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, vol. 42, núm. 3, 131-138.

- Tendulkar, S., Saikumari, Y., Patel, V., Raghotama, S., Balaram, T., & Chatto, B. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* and its effect on Phitopathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal applied microbiology* (103), 2331-2339.
- Todar. (2001). *The Genus Bacillus*. University of Wisconsin.
- Toledo, Y., Hernández, A., Alvarez, M., Martín, G., & Márquez, R. (2002). Determinación del efecto antagónico de un biopreparado a partir de una cepa de *Burkholderia cepacia* ante *Fusarium sp* en el cultivo del Gladiolo (*Gladiolus sp*). *Culitvos Tropicales*, vol. 23, no. 4, 11-15.
- Urbina, M. (Agosto de 2011). Enfermedades causadas por hongos. Universidad Católica Agropecuaria del Trópico Seco Pbro. "Francisco Luis Espinoza Pineda", Estelí.
- Velásquez, E. (2012). Evaluación del potasio peroxomonosulfato (Virkon s) en el control químico de dos patógenos del suelo (*Ralstonia solanacearum* y *Fusarium oxysporum*) en el cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). Tesis de grado para optar el Título de Ingeniero Agrónomo con énfasis en Gerencia Agrícola. Facultad de Ciencias ambientales y agrícolas. Universidad Rafael Landívar. Guatemala.
- Whipps, J. (2001). Microbial Interaction and Biocontrol in the Rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*(52), 487-511.
- Zalar, P., Gostincar, C., De Hoog, G., Ursic, V., Sudhadham, M., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aureobasidium pullulans* and its varieties. *Studies in Mycology* 61, 21-38.

ANEXOS

Anexo 1. Árbol filogenético de bacterias y hongos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 5.0, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.



Anexo 2. Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de microorganismos identificados vía molecular.

>STRAIN A2F

```
GGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
CCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGAATAATCTCTTTT
GCTTCATGGTAAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCG
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTTT
CGGATCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAAGTGGCTGTACCTTG
ACGGTACCTTATTAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTG
ATGTGAAAAGCCACGGCTCAACC-GTGGAGGGTCAATTGGAAACTGGGGG-ACTTGAGTGC
AGAAGAGGAAAAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
```

Secuencia 1. Cepa DCL1-2 (A) (*Lysinibacillus sp.*)

>STRAIN B1F

```
ATACATGCA-GTCGGGCGAACTGATTAGAAGCT
TGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGG-TGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGA
CTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGA
TGATTGAAAGATGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA
TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAAC
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAAGTGTGACCTTGACGGTACCTAACC
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTAT
CCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA
CGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGAAACT
```

Secuencia 2. Cepa LS5-11 (B) (*Bacillus megaterium*)

>STRAIN C1F

```
TGCTATAAAA-TGCAGTC--GAGCGAATGG-ATTGAGAAGCTT-GCTCTC
AAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGT-AGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGA
TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAATATTTGAACTGCATGGTTTCGAAATTG
AAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACG
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAACCTCTGTT
GTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCT
CAACCGTGGAGGGG-CATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGAATT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT
CTGGTCTGTAAGTACTGACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACCGCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTAGAGGGTTTCCG
```

Secuencia 3. Cepa TS11-3 (C) (*Bacillus sp.*)

>STRAIN F1F

```
GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA
CCTGCCTGTAAGACTGGGATAACT-CCG-GGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTT
GAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGG
CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTT
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAATAGGGCGGCACC
TTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT-AACTACGTGCCAGCAG-CCGCGGTAATAC
GTAGGTGCGAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGCGTCCGAGGCGGTTTCTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCAATTGGAAAAT
```

Secuencia 4. Cepa DCL4-31 (F) (*Bacillus subtilis*)

>STRAIN G1F

TGGGGCCTTGCCCTAATA-CTGGCAAGTTCGAGCCG-ACA
GAATGGGAG---CTTGCTCCCTG-ATGTTAGCGGCCGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA
CCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGTAATACCGGATGGTTGTTTGA
ACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCG
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTT
CGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTCAATAGGGCGGTACCTT
GACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG-CCGCGGTAATACGTA
GGTGCAAGCGTTGCCGAATTATTGGG-CGTAAGGGCTCGCAGGCG-GTTTCTTAAG
TCTGATGTG-AAAGCCCCGGGCTCAACCCGGGGAG

Secuencia 5. Cepa LS6-11 (G) (*Bacillus subtilis*)

>STRAIN H1F

ATGCA-GTCGAGCGAATCTGAGGGAGCT
TGCTCCCAAAGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA-CACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGAC
TGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAATATCTATTTATACATATAATTA
GATTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTTACAGATGGGCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCCGATCGTAAACTC
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACG
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACTGGGGA

Secuencia 6. Cepa DCL2-411 (H) (*Bacillus flexus*)

>STRAIN L1F

CGCCCCTTTTGGGAAGTGGCAGACGGGTG
AGTAACTGCGTGGG---AACATACCCTTTCTGCGGAATAGCTCCGGGAAACTGGAATTA
ATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTTATCGGGGAAGGATTGGCCCGGTTGGATT
AGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGG
TTGTAAGCTCTTTACCCGATGAAGATAATGACGGTAGTCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAA
CTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGCG
TAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGAGCTCAACTGCGGAA
CTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAA-GAGGTAAGTGGAAAT-CCGAGTGTAG
AGG-TGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGTCCAT
TACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCGAGT-ATACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACG
CATTAAACATTCCGCC-TGGGGAGTACGGTGCAGATTAATAA-CTCAA-GGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTAC
CAGCTCTTGACATTCGGGGTATGGGCATTGGAGACGATGTCTTCAGTTAGGCTGGCCCC
AGAACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGC
CCGTGATAAGCCGAGGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCCTCATGGCCCTTACGGGCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGGAGTGGGCGAGCAGACAGCGATGTCGAGCTAA
TCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCGGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAAT
CGTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTACACCATGGGAAGTTGGGTTTACCCGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGGCA
GCTAACCCAGGTAGGGTCAAGGACTGGGG-GAAGTC

Secuencia 7. Cepa DCL12-21 (L) (*Agrobacterium tumefaciens*)

>STRAIN MF

GAAAT

CGAGCGAACGGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGAAGTTAGCGGCGGACGGG-TGAGTAACAC
GTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATGCCGGATAA
CATATAGAACCGCATGGTTCTATAGTAAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACC
CGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGA
AGGTTTTTCGGATCGTAAAACCTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGCGTAAAGTAACTGTGCG
CATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGGCGGTTTCTT
AAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGTCATTGAAAACCTGGGAAAACCTG
AGTGCAGAAGAGGAAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGG
GGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTT
AGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTAC
GACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAAATCTTGACATCCTTTGAAAACCTAG
AGATAGAGCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGCAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTAGTTGCCAT
CATTAAAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAA
GGGCAGCTAAACCGCGAGGTCATGCAAATCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAG
TCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGT
GAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTACACCACGAGAGTTTGTAAACCCCG
AAGCCGGTGGAGTAACCATTTTATGGAGCTAGCCGTCAAGT

Secuencia 8. Cepa LL8-111 (M) (*Staphylococcus succinus*)

>STRAIN NF

CGCCCGGGTGAGTA

ACAC-GTAGGGT-AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATAC
CGGATAGTTCCCTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACA
GATGGACCCGCGCGCATTATCTAGTTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATGCG
TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGATACACGGCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTG
AGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTA
ACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGTTCGCAGGC
-GGTTTTCTAAGTCTG-ATGTGAAAGCCCCCGGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAAC
TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAG
CGAAAGCGTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTTGGGTAGTCCACGCCGTAACGAT
GAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGAGTACGGTTCGACGACTGAAACTCAAAGGAAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGGAGCAATGTGGTTTTAATTCGAGCAAACCGCAAGAACCTTTACCCAGGTCTT
GACATCCTCTGACAACCCCTAGAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGT
GGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGCTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCATAAT
CTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA
TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACA
CCACGAGAGTTTGCAACACCCGAAGTC

Secuencia 9. Cepa TS13-1111 (N) (*Bacillus pumilus*)

>STRAIN OF

AGTCGAGCGAATGGATTAAG
AGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGCTGTGTAACACGTGGGTAACCTGCCATA
AGACTGGGATAAECTCCGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGT
TCGAAATTGAAAAGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGTATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG
CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCTGTA
AACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCG
TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAG
CCCACGGCTCAACC-GTGGAGGGTCATTGG

Secuencia 10. Cepa X5-9E2 (O) (*Bacillus cereus*)

>STRAIN PF

TTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGT
GAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCG
CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGT
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATCGTTTCAATAGGGCGGTACC
TTGACGGTACCTAACCAAAAAGCCACGGCTAACTACGTG-CCAGCAGCCGCGTAATACC
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCCGTAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCC-CCGGCTCAA----CCGGGGAGGGTCAATTGAAAACCTGGGG

Secuencia 11. Cepa LS6-211 (P) (*Bacillus sp.*)

>STRAIN QF

GTGG---CAGACG
GGTGAGTAACGCGTGGGAACATACCCTTTCCTGCGGAATAGCTCCGGGAAACTGGAATTA
ATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTTATCGGGGAAGGATTGGCCCGCGTTGGATT
AGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCCTTAGGG
TTGTAAAGCTCTTTCACCGATGAAGATAATGACGGTAGTCCGAGAAGAAGCCCCGGCTAA
CTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGG-CTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGC
GTAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCAGCTCAACTGCGGA
ACTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGTAAGTGGAAATCCGAGTGTAGA
GGTGAATTCGTAGATATTC

Secuencia 12. Cepa DCL12-11 (Q) (*Rhizobium sp.*)

>STRAIN RFD1

GGGGGGGGGGGGGAGGAGGGGTTTTTCTTTCTTATTGGGAGCAAGTAAGGGGGGCTAC
A--GTCGAGCGA-TGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGTTTTTGT
ACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG
ATAACATTTTGAACCGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGAT
GGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAG
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATA
AGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGG
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGAAAACCTGGGA
GACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGAAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATA
TGG-AGGAACCCAGTGGCGAAGGCCGACTTTCTGGTCTGT-AACTGACACTGGAGGCCGCG
AAA---GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG--ATACCT--GGTAGTCCC-GCCGTAAAC
GAAGAAGTGGC--AAGGGTTAAAAGGGTTTTCC-GCCCTTT---TGCTGAAGTTAACGCAT
TAAGCCACTCCG--CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCCACAAGCGGGG

Secuencia 13. CepaX2-10(2)2 (R) (*Bacillus cereus*)

>STRAIN S1F

GGGGGGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCCGGATATCGGGAAATCTACCGGGGGGGG
GGTTTTTTTTTTTGTCTTCACTTTT
TCGGGGGGGGCGGTACCTCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGATGAGGGTCTCACCGCC
CCTATGACAGCTTAGGAGCAATACGTAAAAACTTCCAGGCGAACGAGGGGATTAATATAA
ATTTGCTCTTATGAAATTAGCGCCGA---CCCCGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG-
-CCCATAAGACTGGGATAA-----CTCCGGAAAAACGGGGCTAATACCGGATAACATTT
TGAACCGCATGGTTGCAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCG
TCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGC
TTTTGGGTTCGTAATACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCAC
CTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCTAGCATTATCC-GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCCGGTGGTTTCTTAA
GTCTGATGTAAAGCCCACGGCTCAACCC-TGGAGGG-TCAT-TGGAAACTGGGAGACTT
GTGTACAGAAAGAGGAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAA
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGGCCCC--
----CCCCCGGGTTTGCACCCCCCCCCAGTTGTACGTTTCGACAAGAGCCGAATGAAT
ACAGTGA

Secuencia 14. Cepa X5-9CD2 (S) (*Bacillus cereus*)

>STRAIN D1F

GGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATAC
GTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAAAGGGACGGCCCGCCGAGGACCCCTA
AACTCTGTTTTTGTGGAACCTCTGAGTAAAAACAACAATAAATCAAAACTTTCAACAA
CGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGC
GGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCG
GTAACCCGCGTTCCCAAATCGATTGGCGGTCACGTGAGCTTCCATAGCGTAGTAATCA
TACACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTG
ACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTAAGCATATCAATAGGCGGGAGGAAAAA
AAACCAACCGC

Secuencia 15. Cepa M1-2-1 (D) (*Fusarium sp.*)

>STRAIN EF

GGTTTTTTTTTTTTGGGGGGTGGGGCCGCGACGAATACCCCCCTTTTTAAGGAGTATGAT
TACTACCCTATGGAAGCTCGACGTCCCCCTCCAATCAATTTGGGGAACGCGGGTTACCGC
GAGTCCCAACCCCATCTTGAGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTG
GGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCAAATCGATTGGCGGTCACGTGAGCTTCCATAGC
GTAGTAATCATACACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTT
CTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTATGAATACCTGATGAACTCTCCCAATCAGTCGGAG
GAAAAA

Secuencia 16. Cepa F15 (E) (*Fusarium sp.*)

>STRAIN I1F

TTGGTGGGTTGCCCC
ACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTGTAAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAA
TTACAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC
CCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTT
GGTGTGGGCGTCTTGTCTTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCG
GCCTACTGGTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCC
ATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA-CTTAA
GCATATCAATAAGCCGAAGGAA

Secuencia 17. Cepa M5-62N (I) (*Alternaria alternata*)

>STRAIN J2F

GGATCATTACC

GAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATACGTTGCCTCGGCCGATCAGCCC
GCGCCCCGTAAAACGGGACGGCCCCGCCGAGGACCTAAACTCTGTTTTAGTGGAACCT
CTGAGTAAAACAAACAAATAAATCAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGC
GATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCG
AATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCA
TTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCAAATCG
ATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCG
TCGCGGCCACGCCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTAGGAATAC
CCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCTAGT
AACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGCTCAAATTTGAAATCTGGCTCTCGGGCCCGAGTTGTA
ATTTGTAGAGGATGCTTTTGATGCGGTGCCTTCCGAGTTCCTGGAACGGGACGCCATAG
AGGGTGAGAGCCCCGTCTGGTTGGATGCCAAATCTCTGTAAAGCTCCTTCGACGAGTCGA
GTAGTTTGGGAATGCTGCTCTAAATGGGGAGGTATATGTCTTCTAAAGCTAAATACCGGC
CAGAGACCGATAGCGCACAAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAG
TTAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGCGTTTATGACCAGACTTGGGCTTGATA
ATCATCTGGGGTTCTCCCAAGTGCATTTTCCAATCCAGGCCAGCATCAGTTTTCGCCGG
GGATAAAGGCTTCGGGAATGTGGCTCCCTCCGGGGAGTGTTATAGCCCGTTGCGTAATA
CCCTGGCGGGGACTGAGGTTGCGGCATCTGCAAGGATGCTG

Secuencia 18. Cepa M3-1-1 (J) (*Fusarium equiseti*)

>STRAIN T1R

G

AACATACCTATACGTTGCCTCGGCCGATCAGCCCCGCGCCCTGTAAAAAGGGACGGCCCCG
CCGAGGACCCTAAACTCTGTTTTAGTGGAACCTTCT-GAGTAAAACAAACAAATAAATCA
AAACTTTCAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGAT
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCG
CCAGTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCCTCAAGCTCAGCTTGGT
GTTGGGACTCGCGGTAACCCGCGTTCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCAT
AGCGTAGTAATCATAACCT-CGTTACTGGTAATCGT-CGCGGCCACGCCGTAAAACCC
AACTTCTG-AATGTTGAC—CTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATAT

Secuencia 19. Cepa F9 (T) (*Fusarium equiseti*)

Anexo 3. Ampliación a los principales resultados obtenidos en el trabajo.

3a. Fotografías de cultivo mixto inicial.

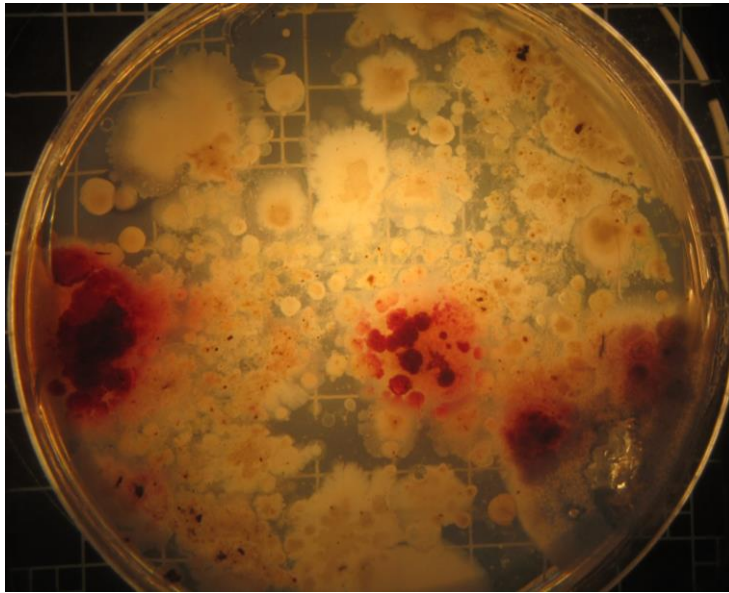


Figura 1. Cultivo mixto obtenido en la primera inoculación (primera siembra) de la muestra No 1 correspondiente al bioinsumo TS, donde se puede observar la diversidad de morfología de las colonias obtenidas.

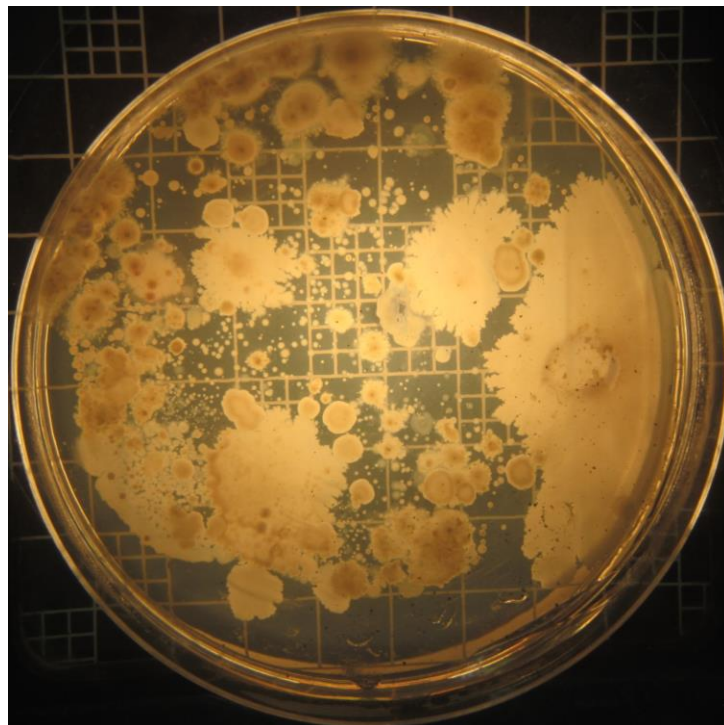


Figura 2. Cultivo mixto obtenido en la primera inoculación (primera siembra) de la muestra No 4 correspondiente al bioinsumo DCL, donde se puede observar la diversidad de morfología de las colonias obtenidas.

3b. Fotografías de morfología en placa y tinción de Gram.

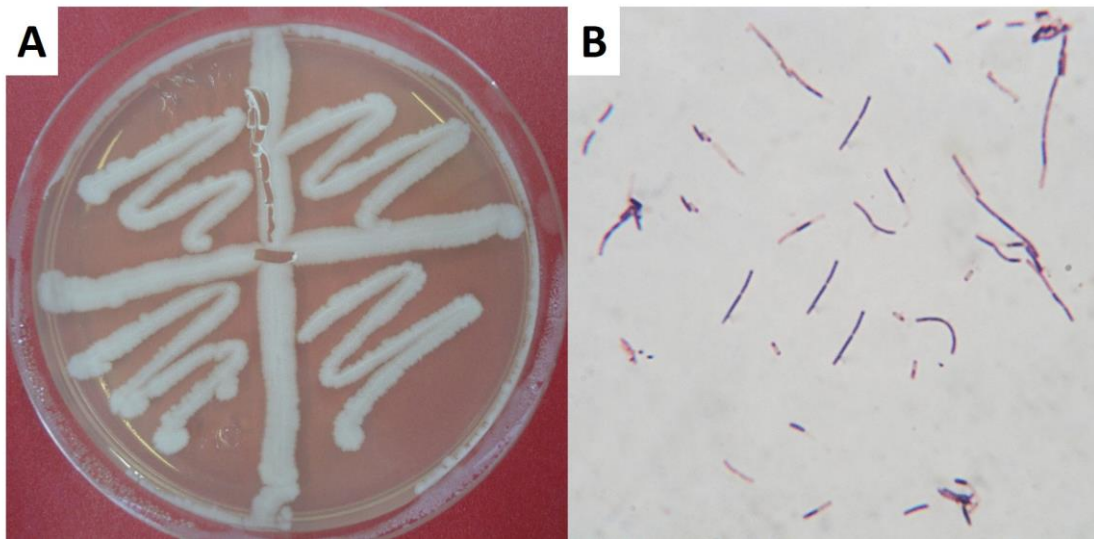


Figura 3. Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F).

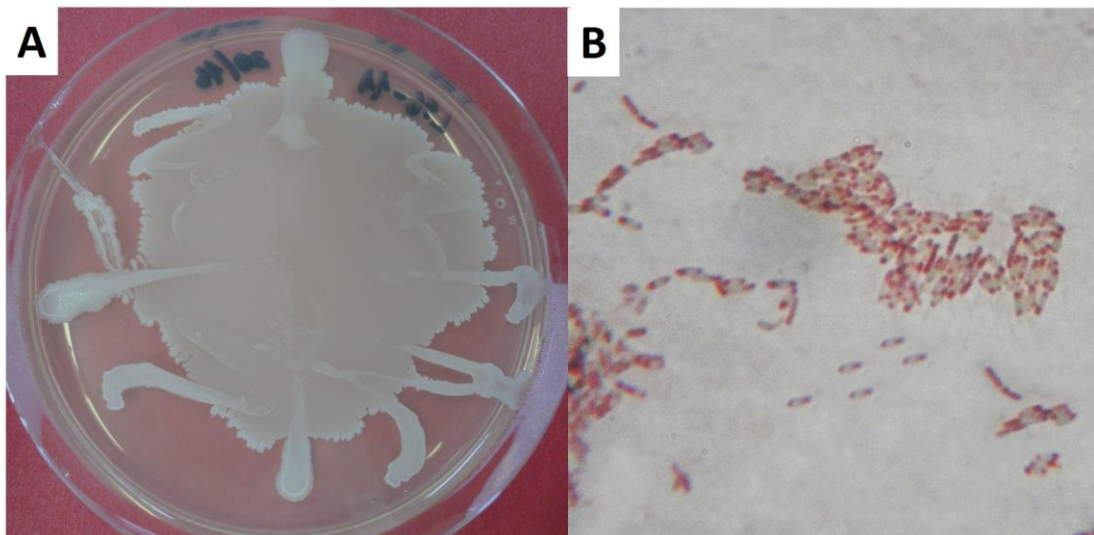


Figura 4. Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Bacillus subtilis* LS6-11 (G).

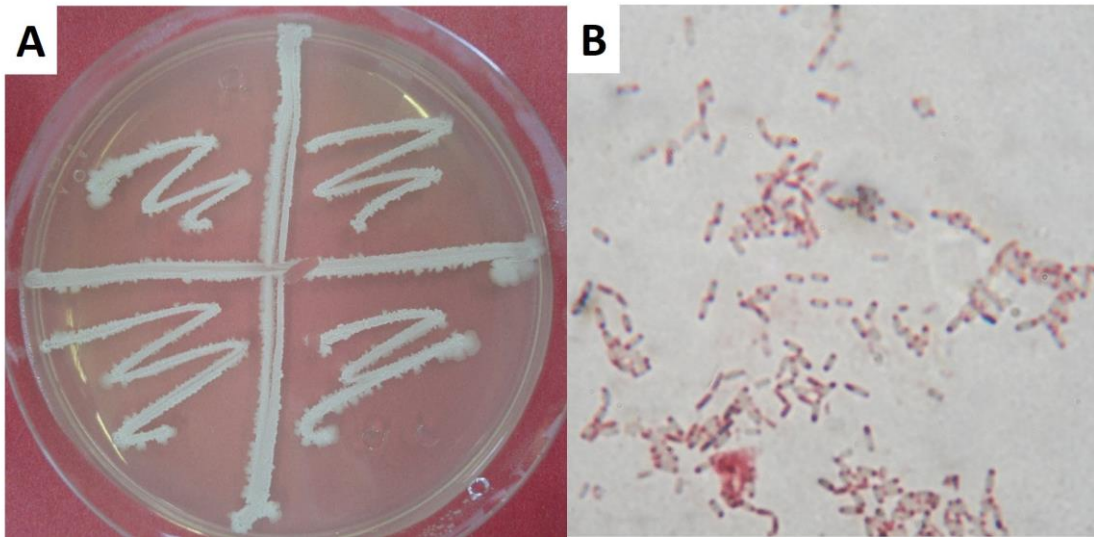


Figura 5. Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Bacillus sp.* LS6-211 (P).

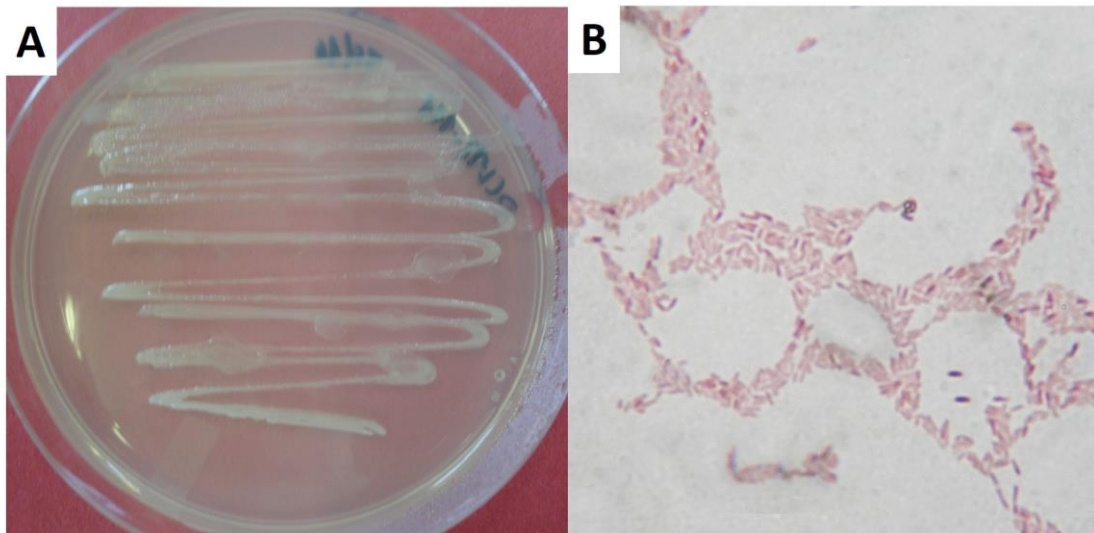


Figura 6. Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q).

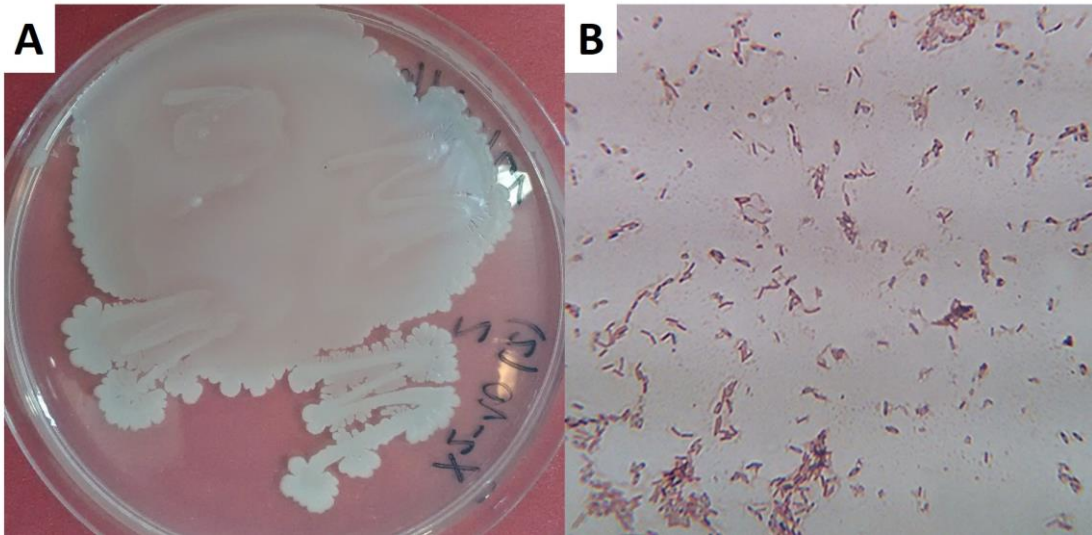


Figura 7. Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R).

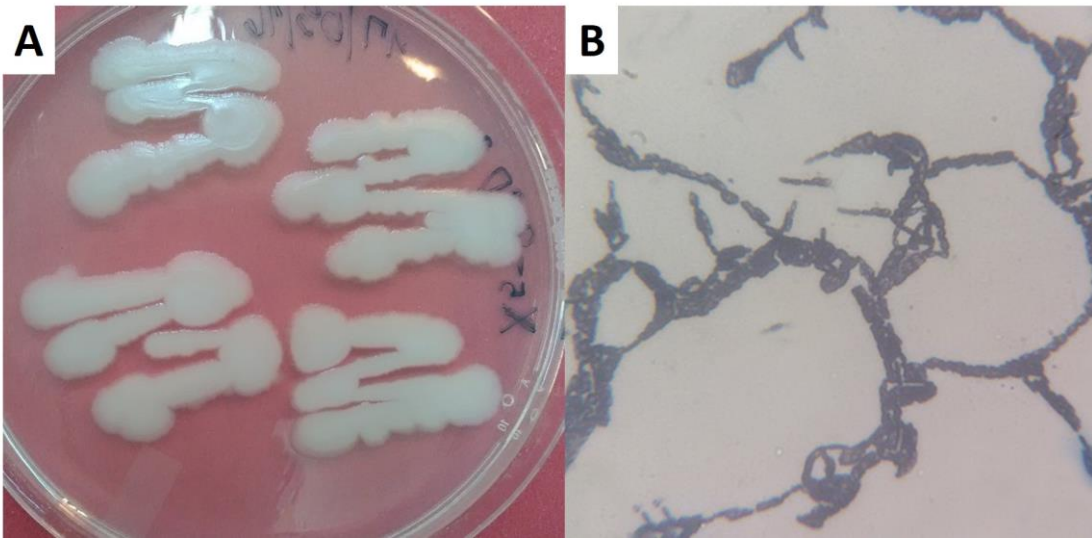


Figura 8. Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S).

3c. Fotografías de antagonismo in vitro a bacterias seleccionadas.

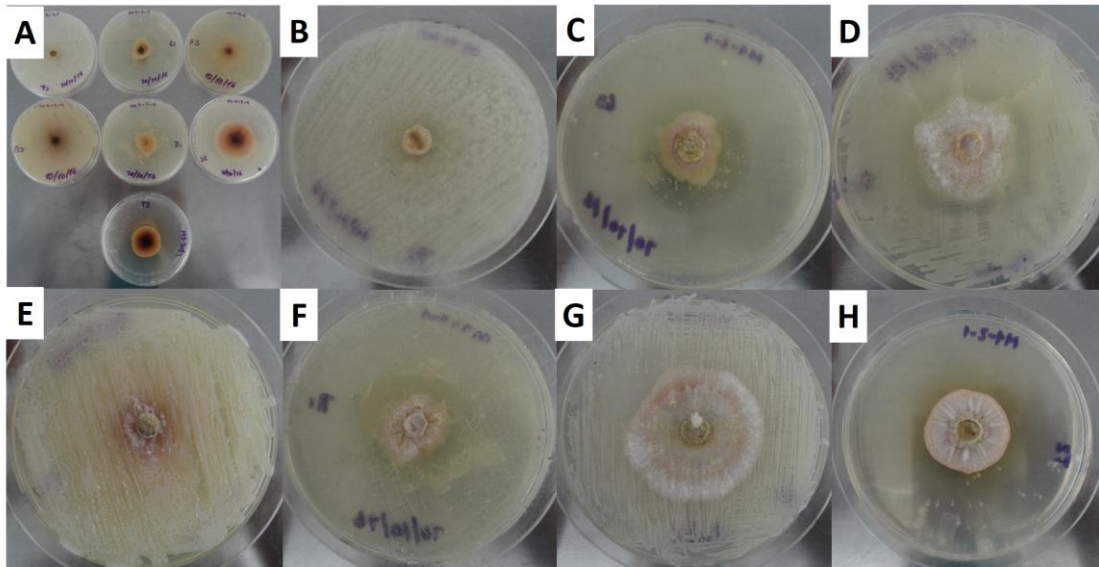


Figura 9. Evaluación del efecto antagonístico al noveno día de las bacterias seleccionadas: B: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), C: *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), D: *Bacillus* sp. LS6-211 (P), E: *Rhizobium* sp. DCL12-11 (Q), F: *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R), G: *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) frente a *Fusarium* sp. M1-2-1 (D). En A se muestran los 7 tratamientos y en H el testigo sin bacterias.

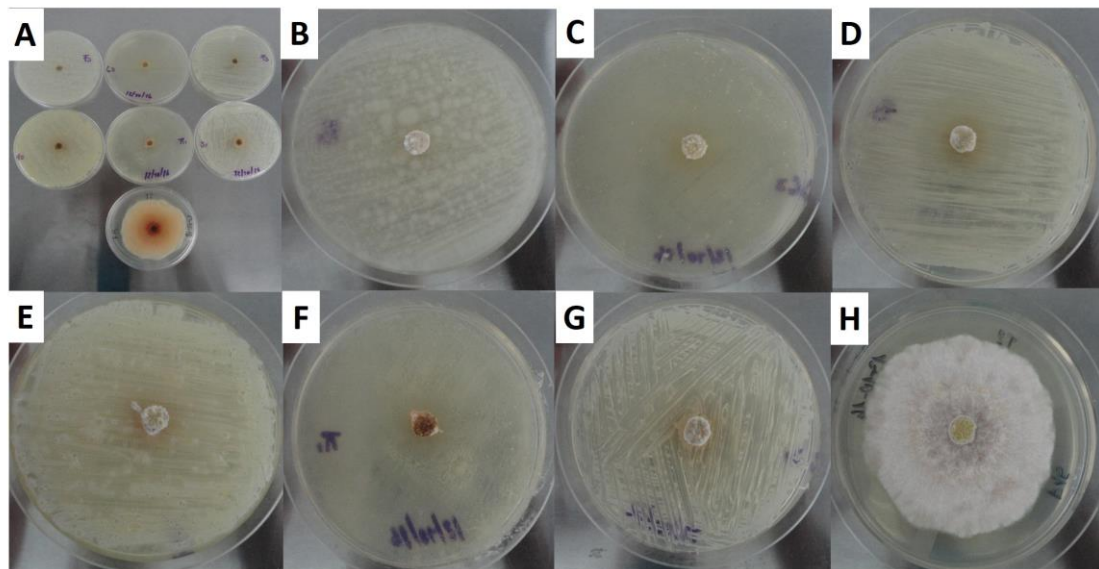


Figura 10. Evaluación del efecto antagonístico al séptimo día de las bacterias seleccionadas: B: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), C: *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), D: *Bacillus* sp. LS6-211 (P), E: *Rhizobium* sp. DCL12-11 (Q), F: *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R), G: *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) frente a *Fusarium* sp. F15 (E). En A se muestran los 7 tratamientos y en H el testigo sin bacterias.

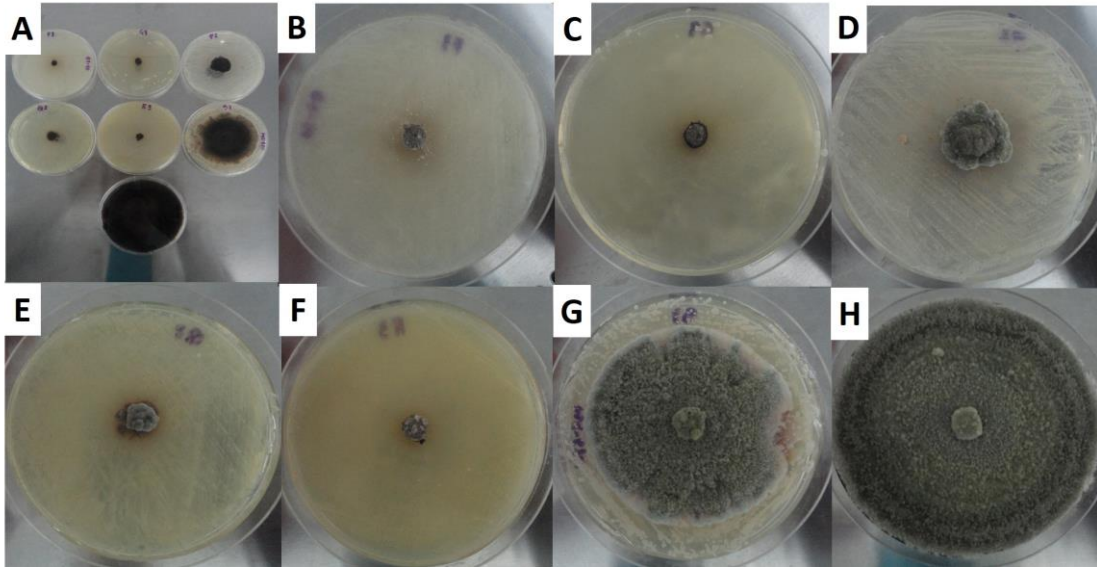


Figura 11. Evaluación del efecto antagonístico al décimo quinto día de las bacterias seleccionadas: B: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), C: *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), D: *Bacillus sp.* LS6-211 (P), E: *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), F: *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R), G: *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) frente a *Alternaria alternata*. M5-62N (I). En A se muestran los 7 tratamiento y en H el testigo sin bacterias.

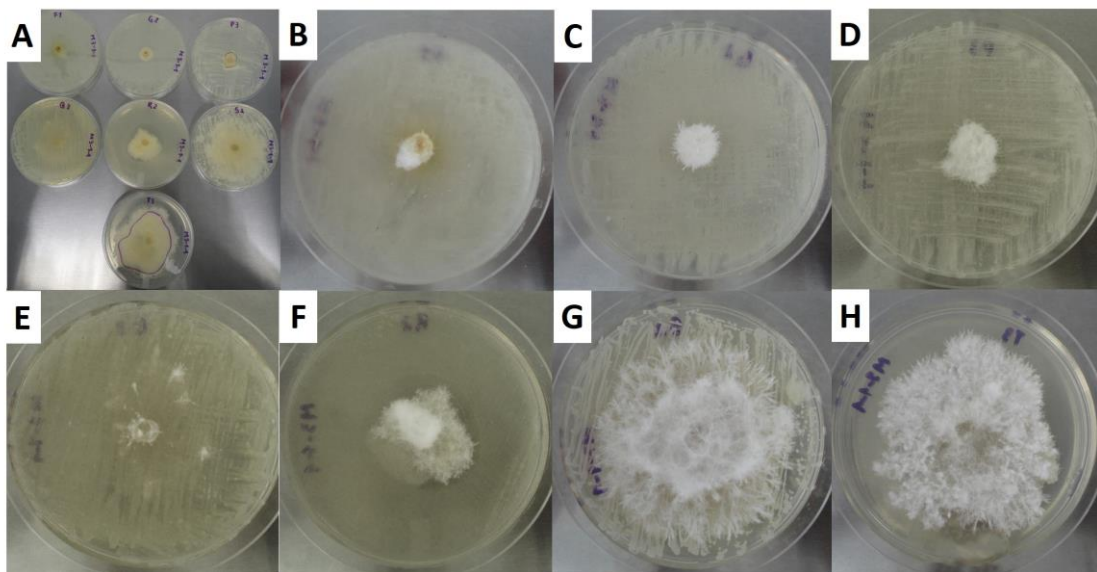


Figura 12. Evaluación del efecto antagonístico al noveno día de las bacterias seleccionadas: B: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), C: *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), D: *Bacillus sp.* LS6-211 (P), E: *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), F: *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R), G: *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) frente a *Fusarium equiseti* M3-1-1 (J). En A se muestran los 7 tratamiento y en H el testigo sin bacterias.

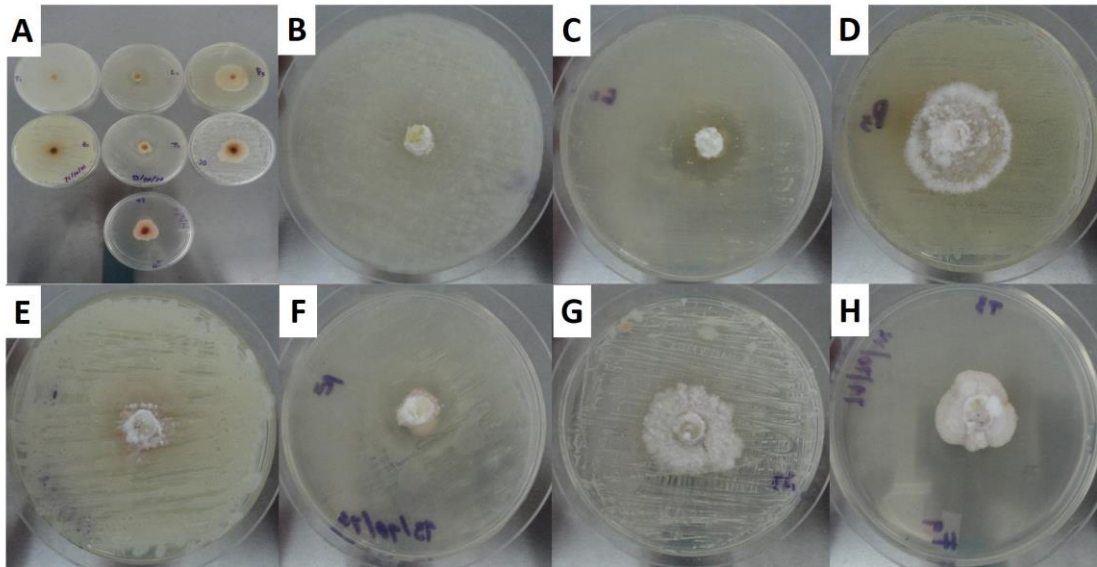


Figura 13. Evaluación del efecto antagónico al sexto día de las bacterias seleccionadas: B: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), C: *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), D: *Bacillus sp.* LS6-211 (P), E: *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), F: *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R), G: *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) frente a *Fusarium equiseti* F9 (T). En A se muestran los 7 tratamiento y en H el testigo sin bacterias.

3d. Fotografías de Severidad e Incidencia de daños en pruebas de antagonismo en invernadero en el cultivo de papa variedad Monte Carlo.



Figura 14. Severidad e incidencia de daños del hongo fitopatógeno *Alternaria alternata* a los 75 DDS



Figura 15. Severidad e incidencia de daños del hongo fitopatígeno *Fusarium sp* a los 75 DDS

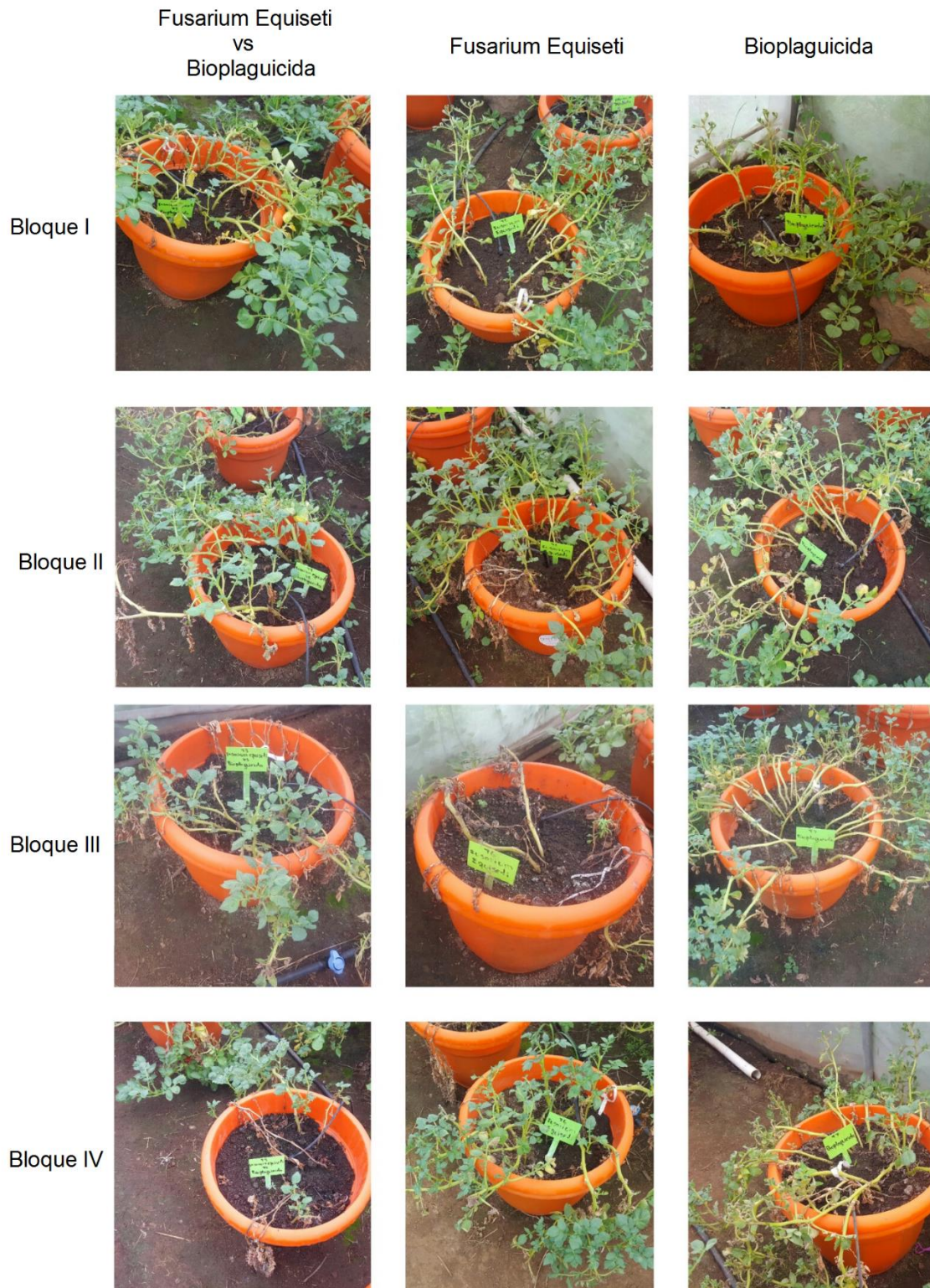


Figura 16. Severidad e incidencia de daños del hongo fitopatígeno *Fusarium equiseti* a los 75 DDS



Figura 17. Cantidad de tubérculos del cultivo de papa variedad Monte Carlo cosechados después de la inoculación del hongo fitopatogéno *Alternaria alternata* vs Bioplaguicida



Figura 18. Cantidad de tubérculos del cultivo de papa variedad Monte Carlo cosechados después de la inoculación del hongo fitopatógeno *Fusarium sp* vs Bioplaguicida



Figura 19. Cantidad de tubérculos del cultivo de papa variedad Monte Carlo cosechados después de la inoculación del hongo fitopatógeno *Fusarium equiseti* vs Bioplaguicida

Anexo 4. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos: *Fusarium sp.* M 1-2-1 (D), *Fusarium sp.* F15 (E), *Alternaría alternata* M5-62N (I), *Fusarium equiseti* M 3-1-1 (J) y *Fusarium equiseti* F9 (T), frente a las Bacterias previamente seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), *Bacillus sp.* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S).

Bacterias	% Inhibición frente a fitopatógenos				
	D	E	I	J	T
F	94.23	98.33	100.00	83.96	49.68
G	63.92	93.75	90.00	68.75	40.97
P	43.78	95.00	86.25	57.81	-24.52
Q	71.14	90.00	90.00	50.00	62.90
R	58.79	93.75	97.50	51.04	57.42
S	25.25	81.25	42.50	0.00	-45.16

GLOSARIO

ADN: Ácido Desoxirribonucleico. Ácido nucleico formado por nucleótidos en que el azúcar es desoxirribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina. Excepto en los retrovirus que tienen ARN, el ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células y para la replicación de la propia molécula de ADN. Representa la copia de seguridad o depósito de la información genética primaria, que en las células eucariotas esta confinada en la caja fuerte del núcleo.

Aeróbico: proceso en el que se transforma residuos orgánicos de origen animal o vegetal, en presencia de oxígeno.

Aerobio: microorganismos que requieren de la presencia de oxígeno para vivir.

Anaerobio: se le dice al organismo que no necesita oxígeno libre para vivir.

Antibiosis: fenómeno biológico en el que existe una detención o destrucción del crecimiento microbiano debido a sustancias producidas por otro ser vivo.

Antibióticos: sustancias producidas por un ser vivo que se oponen al desarrollo de otro ser vivo.

Anamorfo: estado asexual o imperfecto de un hongo.

Antimicrobianos: sustancias que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos (antibacterianos, antifungosos, etc.).

Antisepsia: operaciones o técnicas encaminadas a crear un ambiente que impida el desarrollo de los microorganismos e incluso pueda matarlos.

Antisépticos: son aquellas sustancias químicas que previenen el crecimiento o acción de los microorganismos ya sea destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento y actividad.

Asepsia: técnicas empleadas para impedir el acceso de microorganismos al ambiente de trabajo.

Bioedit: Es un programa informático de secuencias el cual permite la manipulación y análisis de múltiples secuencias y contiene aplicaciones que facilitan su alineamiento.

Biocontrol: El control biológico es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

Biofertilizante: Es un fertilizante orgánico natural que ayuda a proporcionar a las plantas todos los nutrientes que necesitan y a mejorar la calidad del suelo creando un entorno microbiológico natural.

BLAST: Es un programa informático que emplea un algoritmo heurístico que lleva a cabo un alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia query) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

Clados: En biología, se llama clado a cada una de las ramas del árbol filogenético propuesto para agrupar a los seres vivos. Por consiguiente, un clado se interpreta como un conjunto de especies emparentadas (con un antepasado común).

Conidias: estructuras propagativas de los hongos producidas al extremo de un conidióforo.

Conidióforo: hifa especializada, en cuyo extremo apical se insertan los conidios.

Desinfección: proceso de destrucción de los agentes infecciosos.

Desinfectantes: aquellas sustancias químicas que matan las formas vegetativas y no necesariamente las formas de resistencia de los microorganismos patógenos.

Esporangio: estructura en forma de bolsa que contiene esporas.

Esporas: unidad reproductiva de los hongos, que se forma dentro de un esporangio.

Esporulación: proceso que ocurre en los hongos y está relacionado con la producción de esporas, conidias, etc.

Endospora: Células especializadas, no reproductivas, producidas por algunas bacterias para asegurar la supervivencia en tiempos de tensión ambiental.

Eucariota: Célula que tiene el núcleo diferenciado mediante una membrana

Filogenia: La filogenia es la relación de parentesco entre especies o taxones en general

Fitopatógeno: Se denomina fitopatógeno a un microorganismo, que genera enfermedades en las plantas a través de disturbios en el metabolismo celular, al secretar enzimas, toxinas, fitoreguladores y otras sustancias y, además, absorbiendo nutrientes de la célula para su propio crecimiento.

Fluorocromo: Los fluorocromos son sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando son excitados por un fotón incidente de una longitud de onda característica.

Hifa: cada uno de los filamentos tubulares que constituyen el micelio en todo su espesor, lo cual confiere un aspecto no estratificado.

Incidencia: Incidencia corresponde al número de plantas infestada por hongos fitopatógenos.

MEGA: Es una herramienta para trabajar con el alineamiento de secuencias manual y automáticamente para la realización de árboles filogenéticos empleando secuencias de bases de datos, también estima rangos de evolución molecular y examina hipótesis evolutivas.

Metabolismo: actividad bioquímica que ocurre en los seres vivos para llevar a cabo los procesos esenciales para su supervivencia.

Micelio: estructura vegetativa de los hongos, constituida por filamentos llamados hifas.

Microbicidas: sustancias que matan las formas vegetativas, pero no necesariamente las esporas de un microorganismo (bactericida, fungicida, etc.).

Monofilético: En filogenia, un grupo es monofilético (del griego: de una rama) si todos los organismos incluidos en él han evolucionado a partir de un ancestro común, y todos los descendientes de ese ancestro están incluidos en el grupo.

Morfología: estudio de la forma y estructura externa de los seres vivos.

Parafilético: En filogenia un grupo es parafilético cuando incluye al ancestro común de sus miembros, pero no a todos los descendientes de este.

Patógeno: término que se aplica a cualquier elemento que causa enfermedades. Organismo que causan una enfermedad.

Plaga: población de organismos vivos que al crecer en forma descontrolada, causa daños económicos o transmiten enfermedades a las plantas, los animales o al hombre.

Procariota: organismo que no tiene el núcleo celular diferenciado mediante una membrana.

Saprófito: organismo que vive de materia orgánica muerta o en descomposición.

Severidad: Severidad corresponde al grado de la enfermedad en aquellas plantas que resultaron infectadas por los hongos fitopatógenos.

Screen: screen es un vocablo anglosajón, como verbo se puede utilizar para indicar acciones como filtrar, cernir, separar, dividir, etc.

Teleomorfo: estado sexual o perfecto de un hongo.

Tinción: efecto de teñir o dar color.

Traslocar: acción de ser transportado de un lugar a otro.

ABREVIATURAS

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal.

AN: Agar Nutritivo o nutriente.

ARNr: Ácido ribonucleico ribosómico o ribosomal.

ATP: trifosfato de adenosina (ATP), es la principal fuente de energía de los seres vivos.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico).

DCL: Del Campo líquido.

DDS: Días después de la siembra.

ITS: Internal Transcribed Space (Espacio Interno Transcrito).

LB Broth: Caldo Luria Bertani.

LL: Licoroy líquido.

LS: Licoroy sólido.

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Análisis de Genética Evolutiva Molecular).

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información de Biotecnología).

nm: nanómetros.

pb: Pares de bases.

PIENSA: Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales.

pH: Potencial hidrógeno.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PCA: Plate Count Agar.

PDA: Papa Dextrosa Agar.

RSI: Resistencia sistémica inducida.

TS: Tisey sólido.



AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *BACILLUS subtilis* Y EVALUACIÓN DEL ANTAGONISMO IN VITRO FRENTE HONGOS FITOPATÓGENOS

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *BACILLUS subtilis* AND EVALUATION OF ANTAGONISM IN VITRO AGAINST PHYTOPATHOGENIC FUNGI

J.M. Méndez-Úbeda¹, M.S. Flores Hernández², L.A Páramo-Aguilera^{3,*}

¹ Universidad Nacional de Ingeniería. Facultad de Tecnología de la Construcción (FTC), Departamento de Ingeniería Agrícola. Managua, Nicaragua.

² Universidad Nacional de Ingeniería. Facultad de Tecnología de la Construcción (FTC). Managua, Nicaragua.

³ Universidad Nacional de Ingeniería. Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA). Managua, Nicaragua.

*leandro.paramo@piensa.uni.edu.ni; lparamo2014@gmail.com

(recibido/received: 05-Noviembre-2017; aceptado/accepted: 27-Noviembre-2017)

RESUMEN

Los microorganismos fitopatógenos son una amenaza importante para la producción de alimentos y su control mediante el uso de microorganismos antagonistas es una práctica mundial, lo que ha llevado a la investigación y búsqueda de nuevos aislamientos que sean efectivos en el control biológico. En esta investigación se llevó a cabo el aislamiento e identificación de bacterias a partir de bioinsumos producido artesanalmente en Nicaragua y se evaluó in vitro su antagonismo frente a hongos fitopatógenos de interés agrícola. Se realizó la caracterización morfológica de 14 aislados bacterianos y confirmación por secuenciación del gen ADN_r 16S; posteriormente se evaluó el potencial antagónico mediante confrontación dual frente a los hongos identificados como *Fusarium equiseti*, *Fusarium sp.* y *Alternaria alternata*. Como resultado se encontraron 6 cepas con efecto inhibitorio, sobresaliendo *Bacillus subtilis* cepa F con los mejores porcentajes de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos evaluados en un rango de 50-100%. Otros resultados de interés fueron obtenidos mediante la identificación de *Bacillus megaterium* y la utilización de *Rhizobium sp.*, este último inhibió entre 50-90% el crecimiento de los hongos, lo cual sugiere considerar su aplicación no solo como bioestimulante, sino también como bioprotector al inhibir el crecimiento de ciertos fitopatógenos.

Palabras clave: Bacteria, control biológico, microorganismo, bioinsumo, antagonismo.

ABSTRACT

Plant pathogens microorganisms are an important threat to food production and their control through the use of antagonistic microorganisms is a world practice, which has led to research and search for new isolates that are effective in biological control. In this investigation the isolation and identification of bacterium from

bioinsumos produced in Nicaragua was carried out and its antagonism against phytopathogenic fungi of agricultural interest was evaluated *in vitro*. Morphological characterization of 14 bacterial isolated and confirmation by sequencing of the 16S rDNA gene; later the antagonistic potential was evaluated by dual confrontation against the fungi identified as *Fusarium equiseti*, *Fusarium sp.* and *Alternaria alternata*. As a result, 6 inhibitory strains were found, with *Bacillus subtilis* strain F showing the best percentages of inhibition of the growth of phytopathogens evaluated in a range of 50-100%. Other interesting results were obtained by the identification of *Bacillus megaterium* and the use of *Rhizobium sp.*, the latter inhibited between 50-90% the growth of fungi, which suggests to consider its application not only as a biostimulant, but also as a bioprotector when inhibiting of growth of certain phytopathogens.

Keywords: Bacterium, biological control, microorganism, bioinsumo, antagonism.

1. INTRODUCCIÓN

La agricultura bajo el modelo de producción convencional resulta cada día menos sostenible, afectando la parte ambiental, económica y social de las zonas y regiones donde se practica. El uso indiscriminado de plaguicidas y fertilizantes químicos, sumado a la labranza inadecuada y la expansión de la frontera agrícola, ha generado desgaste en los ecosistemas (Barquero *et al.* 2007). En el caso de la aplicación sistemática de productos químicos en la agricultura implica algunas dificultades como el resurgimiento de plagas primarias y secundarias, el desarrollo de resistencia genética, la contaminación del medio ambiente y afectaciones a la salud humana. Muchos de estos productos provocan daños irreparables sobre el sistema nervioso central, y otros están clasificados como carcinogénicos (Reinoso *et al.*, 2006).

La utilización de microorganismos en el control biológico de patógenos causantes de enfermedades en los cultivos, constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y productos químicos (Ruiz-Sánchez *et al.*, 2014). Algunas investigaciones se han enfocado en la búsqueda de microorganismos nativos que actúen bajo las condiciones ambientales de cada región y puedan usarse para restablecer las interacciones de la microbiota del suelo, al punto que sean empleados como biofertilizantes y/o biocontroladores (bioinsumos), que mitiguen el impacto ambiental de los agroquímicos y reduzcan los costos de producción (Orberá *et al.*, 2014). De acuerdo con (Compant *et al.*, 2005) el desarrollo de estos bioproductos para el control de enfermedades en las plantas, se encaminan a aspectos como la preservación ecológica de la interacción planta-microorganismo, las estrategias de aplicación de los inoculantes, el aislamiento de cepas nuevas y el descubrimiento de mecanismos de acción novedosos. Se enfatiza, además, en el uso de los agentes de biocontrol como parte de los programas de tratamiento integral de enfermedades y de la calidad de los suelos.

Se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* presentan un gran potencial como antagonistas, principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida, que son capaces de producir efectos de control sobre varias especies de organismos fitopatógenos (Sosa *et al.*, 2005; Castillo-Reyes *et al.*, 2015). El efecto biocontrolador de *Bacillus spp.* frente a *Fusarium spp.* bajo condiciones de invernadero en el cultivo de Romero (*Rosmarinus officinalis* L) fue evaluado por (Corrales *et al.*, 2011), obteniendo que todos los aislamientos de *Bacillus spp.*, presentaron efecto biocontrolador sobre *Fusarium spp.* en romero al disminuir la severidad de la marchitez vascular en las plántulas por debajo del 50%, lo que valida los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* y lo señalado en la literatura acerca de estas bacterias.

Esta investigación estuvo orientada al aislamiento e identificación morfológica y molecular de microorganismos nativos de Nicaragua partiendo de bioinsumos artesanales (4 muestras), en la búsqueda de bacterias (*B. subtilis*) antagonistas de hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Fusarium* y

Alternaria; para lo cual se realizaron ensayos de antagonismo in vitro, a través de la confrontación dual de las bacterias con potencial antagonístico de los hongos fitopatógenos evaluados.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Aislamiento de microorganismos a partir de bioinsumos artesanales

El aislamiento se llevó a cabo por medio de la suspensión aséptica de 1 g de muestra de bioinsumos en 5 mL de agua destilada estéril, con agitación vigorosa en vortex por 20 s (Solución madre). A partir de la solución madre antes preparada, se tomó 0.1 mL que se inoculó y esparció con espátula de Drigalsky en placas Petri con medios Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Plate Count (PCA) y Agar Nutritivo (AN) e incubadas a 35°C durante 24 h para bacterias y 5 días para hongos, con el propósito de aislar la mayor cantidad posible de microorganismos cultivables (Benítez *et al.*, 2007; Badía *et al.*, 2011; Cuervo, 2010; Reinoso *et al.*, 2006). Transcurridos los tiempos antes indicados, las placas fueron observadas al contador de colonias con lupa de aumento y se diferenciaron por color y forma las diferentes colonias bacterianas y de hongos filamentosos. Las colonias bacterianas fueron llevadas a placas Petri con medio AN, por agotamiento para su purificación y las correspondientes a hongos filamentosos fueron llevadas a placas con medio PDA. Finalmente se observaron las placas al estereomicroscopio para definir la uniformidad visual a un mismo tipo de colonia (Badía *et al.*, 2011; Cuervo, 2010).

2.2 Aproximación a la identificación morfológica de los aislados

Se tomó una muestra representativa de cada aislado bacteriano para realizarles tinción Gram siguiendo el procedimiento descrito por (Moreno & Albarracín 2012) y observarlas al microscopio (OLYMPUS) con el objetivo 100X y aceite de inmersión; esto para determinar si las bacterias aisladas eran Gram positivas o Gram negativas, así como la forma de las colonias si eran cocales, bacilares, esféricas, etc. En el caso de los hongos filamentosos se realizó la observación de esporas al microscopio con objetivo de 50X, utilizando la técnica de impresión con cinta adhesiva transparente; para los hongos levaduriformes se realizó tinción simple con cristal violeta y observación con objetivo 40X (Moreno & Albarracín, 2012).

2.3 Identificación molecular de los microorganismos

Se llevó a cabo a través de la secuenciación parcial del gen ADN ribosomal 16S para bacterias e ITS 1 (Internal Transcribed Space) para hongos (Álvarez *et al.*, 2013). El servicio de secuenciación de ADN se realizó en el Centro de Biología Molecular (CBM) de la Universidad Centroamericana (UCA). Una vez obtenidas las secuencias, se corrigieron utilizando el software Bioedit v7.0.9, posteriormente se obtuvieron del GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) secuencias de las regiones estudiadas de hongos y bacterias relacionadas taxonómicamente con los microorganismos, usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparar secuencias altamente similares (Castillo-Reyes *et al.*, 2015). Se realizó un alineamiento múltiple con cinco secuencias elegidas para cada secuencia en estudio, utilizando la aplicación Clustal W Multiple alignment versión 1.4 incluida en el menú Accessory Application del programa Bioedit v7.0.9 y se utilizaron los parámetros por defecto. Los árboles filogenéticos se construyeron usando el programa MEGA 7.0.14 usando el método Neighbor-Joining Tree, evaluando la confiabilidad haciendo bootstrapping de 1000 repeticiones (Castillo-Reyes *et al.*, 2015; Tamura *et al.*, 2011 citado por Rodríguez C., 2013 y Álvarez *et al.*, 2013).

Como material biológico para la confrontación in vitro, se utilizaron las cepas X5-9E2, X2-10(2)2 y X5-9CD2 suministradas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia Animal de la Universidad Nacional Agraria (UNA), aisladas de ciego de pollo (intestino) e identificadas a través de pruebas bioquímicas dentro del género *Bacillus*, utilizadas como controles positivos en esta investigación; las cepas F9 y F15 aisladas de maní (*Arachis hypogaea*) pertenecientes a la colección de aislados del

Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Agroecología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN-León); M121 y M311 aisladas de papa (*Solanum tuberosum* L) suministradas por el Programa Institucional Agropecuario y Agroindustrial de la Universidad Nacional de Ingeniería (UNI). Como material de trabajo se utilizaron muestras de bioinsumos artesanales (disponibles comercialmente a nivel local) colectados en dos zonas del país (norte y occidente).

2.4 Preselección de aislados como potenciales antagonistas

La metodología utilizada para este ensayo fue la empleada por (Benítez *et al.*, 2007), con algunas modificaciones. Se inocularon dos aislados bacterianos distintos (Previo a su identificación) en placas Petri con PDA haciendo dos líneas paralelas, cada una a 1 cm de distancia del borde de la placa Petri (Figura 1). Seguidamente, se colocó un explante del hongo fitopatógeno en el centro de la placa y se incubó a temperatura ambiente (28°C) hasta observar algún efecto sobre el crecimiento del fitopatógeno. Esto permitió realizar un screen grueso de todos los aislados bacterianos con algún potencial antagonístico contra los patógenos de interés.

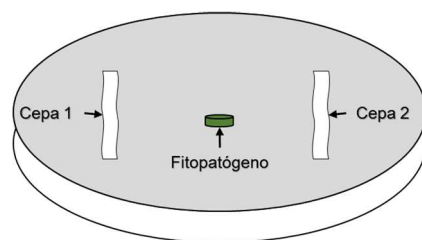


Figura 1. Colocación de los microorganismos a utilizarse en la preselección.

2.5 Evaluación del efecto antagonístico haciendo énfasis en la búsqueda de *B. subtilis*

Se determinó por medio de la técnica de confrontación dual entre los antagonistas y los fitopatógenos (Tejera *et al.*, 2012; Badía *et al.*, 2011; Corrales *et al.*, 2011). En placa Petri con medio PDA, las bacterias seleccionadas (en la etapa anterior) se sembraron por estrías en toda la superficie del medio, se incubaron por 24 horas a 35°C. Posteriormente se colocó en el centro un disco de 0.5 cm de diámetro del fitopatógeno con 7 días de crecimiento previo y se incubó a 28°C, hasta que el testigo con el hongo y sin bacteria llenara la placa Petri. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. La variable medida fue el diámetro de crecimiento radial del hongo fitopatógeno en presencia del antagonista bacteriano. Como control negativo o testigo se utilizaron placas donde se encontraban únicamente los hongos evaluados; con las mediciones obtenidas se determinó el porcentaje de inhibición, utilizando la Ecuación de (Badía *et al.*, 2011).

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{D.C.C - D.C.P}{D.C.C} \right) * 100$$

Dónde:

D.C.C: Diámetro de la colonia control (cm).

D.C.P: Diámetro de la colonia problema (hongo en presencia de los antagonistas) (cm).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Aislamiento de microorganismos

En esta investigación se utilizaron métodos clásicos o tradicionales de cultivos y se logró obtener aislados de la microbiota cultivable presente en las muestras analizadas, sin embargo, esto no representa a todos los microorganismos que se encuentran en ellas y está limitado por los medios que se utilizaron. Utilizando métodos clásicos o tradicionales de cultivos, se obtuvieron 30 aislados diferentes de colonias de

microorganismos en las distintas muestras de bioinsumos entre bacterias y hongos; de estos, 23 fueron bacterianos, 6 de hongos filamentosos y 1 de hongo levaduriforme como los mostrados en la Figura 2 BI-BIII.

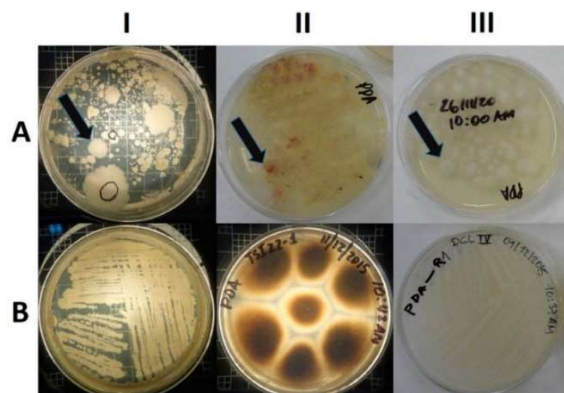


Figura 2. Aislamiento de microorganismos cultivables presentes en las muestras de los bioinsumos. AI-AIII: Placas Petri con cultivo mixto inicial. Las flechas señalan colonias seleccionadas para aislarse de una bacteria, un hongo filamentosos y uno levaduriforme, que se muestran aislados en BI, BII y BIII respectivamente.

(Cuervo 2010) aisló microorganismos de dos biofertilizantes comerciales (uno de producción artesanal en medio líquido que especifica que contiene un coctel de microorganismos y el otro en medio sólido en polvo que contiene un *Bacillus sp.*) obteniendo solamente 3 aislados bacterianos que se identificaron mediante pruebas bioquímicas como: *Bacillus subtilis* en medio sólido, *Bacillus firmus* y *Bacillus sphaericus* en medio líquido. Estos resultados difieren con los obtenidos en este trabajo, en el que se obtuvo una gran cantidad de aislados microbianos, lo cual pueda deberse al bajo nivel tecnológico con el que se producen los bioinsumos utilizados actualmente en Nicaragua que no poseen cepas selectas según se indica en el documento (Estado de la Agricultura Orgánica en Nicaragua: Propuesta para su Fomento y Desarrollo, 2009). Por el contrario los bioinsumos utilizados en este estudio, están compuestas por una cantidad de microorganismos de los cuales no se conoce su identidad y su función dentro del producto (si son o no benéficos). No obstante, esto nos permitió obtener un mayor número de microorganismos aumentando la posibilidad de encontrar alguna especie nativa de *Bacillus subtilis*.

3.2 Identificación morfológica de los aislados bacterianos

A los aislados bacterianos puros obtenidos en este trabajo, después de incubarlos por 24 horas en medio AN a 35°C, se les sometió a pruebas de tinción de Gram. Se observó la forma y tamaño de las células, la forma de colonia, así como su clasificación en Gram positivas o Gram Negativas. De acuerdo a la forma de la célula y el resultado de la tinción, 22 de los aislados eran de forma bacilar de distintos tamaños: 12 Gram positivos (entre paréntesis se muestra la ubicación en la Figura 3 del Gram correspondiente a cada bacteria): DCL1-2 (AI b), DCL2-1 (CI b), DCL2-411 (DI b), DCL3-3 (EI b), DCL4-31 (GI b), LS5-11 (FII b), LS5-21 (GII b), LS6-11 (HII b), LS6-211 (AIII b), TS10-111 (CIII b), TS11-3 (DIII b) y TS13-1111; 3 Gram variables: DCL3-4 (FI b), LS5-1 (EII b) y TS11-31 (EIII b); 7 Gram negativos: DCL1-11 (BI b), DCL12-21 (HI b), DCL12-1111 (AII b), LL8-221 (CII b), LL9-21 (DII b), LS7-211 (BIII b) y TS13-2111 (GIII b); y 1 de forma coccal Gram positivo: LL8-111 (BII b).

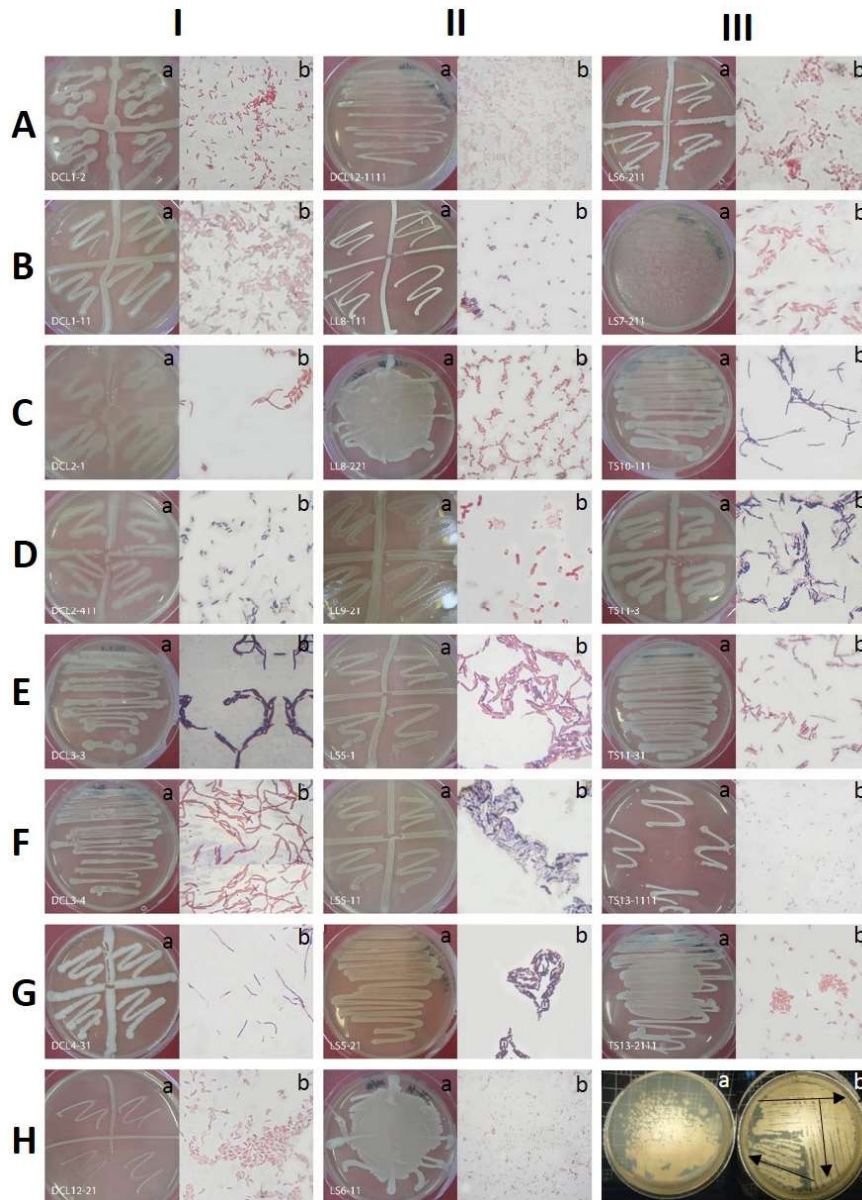


Figura 3. Morfología en placa y tinción de Gram de los aislados bacterianos. AI-HI, AII: Muestra 4; BII-DII: Muestra 3; EII-HII, AIII, BIII: Muestra 2; CIII-GIII: Muestra 1; HIII a: Cultivo mixto obtenido en la primera inoculación y HIII b: agotamiento por estrías.

En la Figura 3 se puede observar que de las 23 bacterias aisladas se obtuvieron 12 bacterias de forma bacilar que resultaron ser Gram positivas (DCL1-2, DCL2-1, DCL2-411, DCL3-3, DCL4-31, LS5-11, LS5-21, LS6-11, LS6-211, TS10-111, TS11-3, TS13-1111), características del género *Bacillus*. Esto concuerda con los resultados de Badía *et al.* (2011) donde obtuvieron 13 aislados con estas características. De acuerdo con (Tejera-Hernández *et al.*, 2011) la presencia de endosporas bacterianas que constituyen una estructura de resistencia que puede permanecer viable durante una gran cantidad de tiempo hasta que las condiciones se tornen favorables para el desarrollo de la forma vegetativa, justificaría la gran cantidad de especies del género *Bacillus* que se encuentren en una gran variedad de hábitats. (Sosa *et al.*, 2005) refuerzan esta afirmación explicando que las especies de *Bacillus* son ubicuas en la naturaleza, encontrándose en mayor proporción en los suelos como microorganismos saprófitos, resultando de gran utilidad usar muestras de suelo como fuente de inóculo. Para el caso de los bioinsumos utilizados, uno de sus componentes son suelos

tomados de distintas zonas, lo cual explicaría la cantidad de aislados bacilares Gram positivos obtenidos de las muestras.

3.3 Identificación morfológica de los fitopatógenos utilizados en pruebas de antagonismo

En cuanto a los fitopatógenos suministrados como *Fusarium* y el aislado de *Alternaria*, su identificación morfológica se llevó a cabo mediante la observación de las características en placa y al microscopio de luz y comparación con la literatura. Las formas de las esporas observadas se muestran en la Figura 4, así como su morfología en medio PDA.

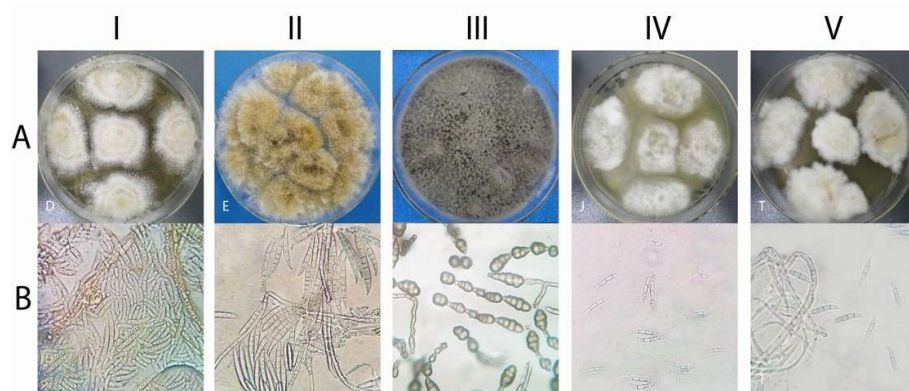


Figura 4. Hongos fitopatógenos utilizados en pruebas de antagonismo. AI, AIV: *Fusarium* M1-2-1 (D) y M3-1-1 (J) aislados de papa; AII, AV: *Fusarium* F15 (E) y F9 (T) aislados de maní; AIII: *Alternaria* M5-62N (I) aislado de papa.

Las esporas de los fitopatógenos observadas (Figura 4: BI-BV) concuerdan con las que se muestran en la literatura consultada (Carrillo, 2003; Kikot, 2012), correspondiente a los géneros *Alternaria* cepa M5-62N (I) y a *Fusarium* cepas M1-2-1 (D), M3-1-1 (J), F15 (E) y F9 (T). En el caso de *Alternaria* el micelio era de color gris verdoso, tornándose más oscuro al envejecer el cultivo y sus esporas de color pardo con septos transversales, estas características se pueden observar en la Figura 4 AIII y BIII. Mientras que *Fusarium* mostraba micelio abundante blanco, tornándose amarillento o crema en el hongo ya esporulado; sus esporas con forma de media luna o canoa característica que permite diferenciar este género con facilidad como puede observarse en la Figura 4 BI, BII, BIV y BV.

3.4 Identificación molecular de los microorganismos utilizados en este estudio

Se escogieron 15 bacterias para la identificación molecular, de las cuales 12 pertenecían a las aisladas de las muestras de bioinsumos (9 bacilos Gram positivos entre los que podría encontrarse *Bacillus subtilis*, 2 bacilos Gram negativos y 1 coco Gram positivo), seleccionados para conocer la diversidad de géneros y especies que conviven en estos bioinsumos; las 3 bacterias restantes fueron suministradas por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencia Animal de la Universidad Nacional Agraria (UNA), aisladas de ciego de pollo (intestino) e identificadas a través de pruebas bioquímicas dentro del género *Bacillus* y que sirvieron como controles positivos en esta investigación. De los 15 aislados de bacterias seleccionados, 10 se lograron identificar a nivel de especie; 4 a nivel de género y una de las bacterias no se obtuvieron buenos resultados en la secuenciación. De un total de 14 bacterias identificadas vía molecular, 10 pertenecen al género *Bacillus*, y de ellas 2 cepas corresponden a *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G) (Tabla 1).

Tabla 1. Identificación de bacterias mediante análisis filogenético (árbol filogenético no incluido). En la tabla se muestra el código de la secuencia y el código del microorganismo, además de la muestra de donde se aisló, puntuación e identidad máxima con el vecino cercano y la identidad final de la bacteria.

Bacterias							
Código secuencia	Código microorganismo	Procedencia de la muestra	Vecino cercano (Número acceso)	Máx punt.	Ident. máx. (%)	Identidad final	
A	DCL1-2	Bioinsumos	<i>Lysinibacillus</i> sp. (KU372128)	358	100	<i>Lysinibacillus</i> sp. (MF680178)	
B	LS5-11	Bioinsumos	<i>Bacillus megaterium</i> (KR063189)	1105	99	<i>Bacillus megaterium</i> (MF680179)	
C	TS11-3	Bioinsumos	<i>Bacillus</i> sp. (KM114626)	1478	99	<i>Bacillus</i> sp. (MF680180)	
F	DCL4-31	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i> (KX454091)	1022	99	<i>Bacillus subtilis</i> (MF680181)	
G	LS6-11	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i> (KU764381)	1057	99	<i>Bacillus subtilis</i> (MF680182)	
H	DCL2-411	Bioinsumos	<i>Bacillus flexus</i> (KC713922)	1114	100	<i>Bacillus flexus</i> (MF680183)	
L	DCL12-21	Bioinsumos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (KM894180)	2490	99	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (MF680185)	
M	LL8-111	Bioinsumos	<i>Staphylococcus succinus</i> (KF254629)	2601	100	<i>Staphylococcus succinus</i> (MF680186)	
N	TS13-1111	Bioinsumos	<i>Bacillus pumilus</i> (KT371465)	2362	98	<i>Bacillus pumilus</i> (MF680187)	
O	X5-9E2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i> (KF641830)	1083	99	<i>Bacillus cereus</i> (MF680188)	
P	LS6-211	Bioinsumos	<i>Bacillus</i> sp. (KX710327)	1014	99	<i>Bacillus</i> sp. (MF680189)	
Q	DCL12-11	Bioinsumos	<i>Rhizobium</i> sp. (KX350124)	1051	100	<i>Rhizobium</i> sp. (MF680190)	
R	X2-10(2)2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i> (KF641834)	1555	98	<i>Bacillus cereus</i> (MF680184)	
S	X5-9CD2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i> (HQ694049)	1194	98	<i>Bacillus cereus</i>	

Aparte de *B. subtilis*, que era la especie que se pretendía encontrar por su potencial en el control biológico, se encontraron otras del género *Bacillus* como *B. megaterium* reportado con capacidad de solubilizar fosfatos (Tejera-Hernández *et al.*, 2011), *B. flexus* usado en tratamiento de aguas residuales alcalinas (Chen *et al.*, 2013), *B. pumilus* conocido por su capacidad de producir fitohormonas (Pérez, 2012) y *B. cereus* reportado como antagonista de *Phytophthora megasperma* por (Handelsman *et al.* 1990) pero también como patógeno humano. Además, se encontraron otros géneros, tales como: *Lysinibacillus*, *Agrobacterium*, *Staphylococcus* y *Rhizobium*; este último de gran importancia en la agricultura, conocido por los nódulos que forma en simbiosis con plantas para la fijación del nitrógeno.

Los hongos fitopatógenos identificados según su tipo de espora: *Alternaria* M5-62N (I) y como *Fusarium* M1-2-1 (D), M3-1-1 (J), F15 (E) y F9 (T) se enviaron a secuenciar para identificarlos a nivel de especie. En Nicaragua de acuerdo a la IV versión de la Lista de Plagas reportadas publicada por el Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA) en 2016, estos géneros afectan a la mayoría de los cultivos de interés (maíz, frijol, sorgo, soya, arroz, café, cacao, caña de azúcar, cítricos, melón, sandía, plátano, entre otros) causando pudrición o marchitez vascular en el caso de *Fusarium* y manchas foliares en el caso de *Alternaria*. Para verificar los resultados de la identificación morfológica de acuerdo al tipo de espora de los hongos

fitopatógenos, se identificaron molecularmente a través de la secuenciación de la región ITS1 (Internal Transcribed Space) del ADNr. La Tabla 2 resume los resultados obtenidos en el análisis filogenético y la identificación de los hongos fitopatógenos.

Tabla 2. Identificación vía molecular de hongos fitopatógenos (árbol filogenético no incluido). En la tabla se muestra el código de la secuencia y el código del microorganismo, el cultivo a partir del cual se aisló, departamento de procedencia, puntuación e identidad máxima con el vecino más cercano y la identidad final del hongo.

Hongos fitopatógenos							
Código secuencia	Código microorganismo	Aislado/cultivo	Procedencia	Vecino cercano (Número acceso)	Máx. punt.	Ident. Máx. (%)	Identidad final
D	M1-2-1	Papa	Jinotega	<i>Fusarium sp.</i> (FJ827615)	974	99	<i>Fusarium sp.</i> (MF817196)
E	F15	Maní	León	<i>Fusarium sp.</i> (KU377496)	900	99	<i>Fusarium sp.</i> (MF817197)
I	M5-62N	Papa	Jinotega	<i>Alternaria alternata</i> (KX179488)	837	99	<i>Alternaria alternata</i> (MF817198)
J	M3-1-1	Papa	Jinotega	<i>Fusarium equiseti</i> (KC311517)	1956	99	<i>Fusarium equiseti</i> (MF817199)
T	F9	Maní	León	<i>Fusarium equiseti</i> (KU377992)	876	100	<i>Fusarium equiseti</i> (MF817200)

Los géneros *Alternaria* y *Fusarium* que se sugirieron a través de la observación de esporas concuerdan con los obtenidos en la identificación vía molecular con porcentajes de identidad entre el 99 y 100% con secuencias contenidas en el GenBank. Del total de 5 hongos fitopatógenos identificados vía molecular, 3 lograron ser identificados a nivel de especie M5-62N (I) como *Alternaria alternata*, M3-1-1 (J) y F9 (T) como *Fusarium equiseti*. Las cepas M1-2-1 (D) y F15 (E) se identificaron como *Fusarium sp.*

3.5 Preselección de aislados como potenciales antagonistas

Una preselección de bacterias antagonistas de *Rhizoctonia solani*, fue realizada por (Castillo-Reyes *et al.*, 2015), seleccionando 14 de 80 cepas aisladas. En la caracterización morfológica, todas las cepas presentaron forma de bacilo, tinción de Gram positiva y formación de endospora en la parte central. En este trabajo, de un total de 26 bacterias evaluadas en la preselección (23 aisladas de bioinsumos y 3 de ciego de pollo que sirvieron como controles positivos del género *Bacillus*) se seleccionaron 6 cepas con posible efecto inhibitorio frente al menos alguno de los 3 fitopatógenos evaluados: *Alternaria alternata* (I), *Fusarium sp.* (D) aislado de papa y *Fusarium sp.* (E) aislado de maní.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de la preselección (screen grueso) de aislados con potenciales efectos antagonísticos frente a los hongos fitopatógenos, obteniendo como resultado 6 cepas con posible efecto inhibitorio frente al menos alguno de los 3 fitopatógenos evaluados.

Tabla 3. Resultados de las cepas seleccionadas en el ensayo de antagonismo (screen grueso). En el cuadro se muestra el código de la secuencia y código de aislamiento de las bacterias, tipo de muestra del que fueron aislados y su identificación final.

Código secuencia	Bacterias			Fitopatógenos		
	Código aislamiento	Tipo Muestra	Identificación final	<i>Alternaria alternata</i> M5-62N (I)	<i>Fusarium sp.</i> M1-2-1 (D)	<i>Fusarium sp.</i> F9 (E)
F	DCL4-31	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+
G	LS6-11	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+
P	LS6-211	Bioinsumos	<i>Bacillus sp.</i>	+	+	+
Q	DCL12-11	Bioinsumos	<i>Rhizobium sp.</i>	-	+	-
R	X2-10(2)2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-
S	X5-9CD2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-

+ Se observó grado de inhibición;

- No se observó ningún grado de inhibición.

3.6 Evaluación del efecto antagonístico haciendo énfasis en la búsqueda de *B. subtilis*

Se evaluó el efecto antagonístico de las cepas seleccionadas en el screen grueso, frente a los 5 fitopatógenos *Fusarium sp.* M1-2-1 (D), *Fusarium sp.* F15 (E), *Alternaria alternata* M5-62N (I), *Fusarium equiseti* M3-1-1 (J) y *Fusarium equiseti* F9 (T); obteniendo como resultado que las 6 cepas de bacterias evaluadas presentaron diferentes capacidades para inhibir a distintos fitopatógenos y en algunos casos no se observó efecto inhibitorio. Los resultados del porcentaje de inhibición frente a los fitopatógenos y la tasa de crecimiento micelial de estos se reflejaron en base al promedio de tres repeticiones por tratamiento, estos resultados se muestran en la Figura 5 y la Tabla 4.

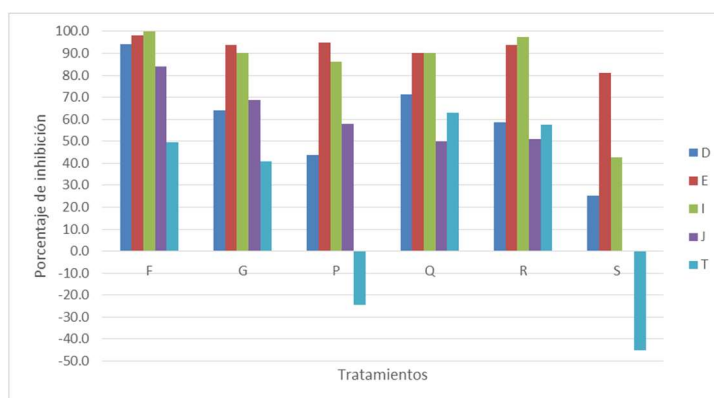


Figura 5. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos: *Fusarium sp.* M 1-2-1 (D), *Fusarium sp.* F15 (E), *Alternaria alternata* M5-62N (I), *Fusarium equiseti* M 3-1-1 (J) y *Fusarium equiseti* F9 (T), frente a las Bacterias previamente seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), *Bacillus sp* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S).

Tabla 4. Tasa de crecimiento de fitopatógenos: *Fusarium sp.* M 1-2-1 (D), *Fusarium sp.* F15 (E), *Alternaria alternata* M5-62N (I), *Fusarium equiseti* M 3-1-1 (J) y *Fusarium equiseti* F9 (T), en presencia de bacterias seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), *Bacillus sp.* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S). En la parte inferior de la tabla se muestra el crecimiento de los testigos (sin presencia de bacterias).

Bacterias	Tasa de crecimiento de fitopatógenos (cm/día)				
	D	E	I	J	T
F	0.02	0.01	0.00	0.05	0.10
G	0.13	0.03	0.04	0.10	0.12
P	0.13	0.02	0.06	0.14	0.24
Q	0.09	0.04	0.04	0.16	0.07
R	0.11	0.03	0.01	0.16	0.08
S	0.20	0.08	0.24	0.33	0.28
Tasa de crecimiento de los fitopatógenos sin presencia de bacterias (Testigo)					
	Día 13	Día 10	Día 10	Día 13	Día 14
Testigo	0.33	0.43	0.43	0.33	0.19

De manera general, los mejores resultados corresponden al aislado DCL4-31 (F) identificado como *Bacillus subtilis*, el cual inhibe el crecimiento entre el 83 y el 100% en cuatro de los cinco hongos fitopatógenos. A pesar de que la cepa LS6-11 (G) también se identificó como *B. subtilis* no obtuvo los mismos resultados; esto concuerda con lo que refiere (Lagunas-Lagunas *et al.*, 2001) que cepas de una misma especie, pueden exhibir diferentes capacidades para inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos. No obstante, las demás cepas evaluadas también inhibieron en cierto grado a alguno de los fitopatógenos. Las cepas LS6-211 P y X5-9CD2 S, *Bacillus sp.* y *Bacillus cereus* respectivamente, frente al fitopatógeno T (*Fusarium equiseti*) obtuvieron porcentajes negativos de inhibición -24.52 y -45.16%, debido a que el hongo creció más rápido en presencia de estas bacterias en comparación a su crecimiento como testigo (Estimulación). Esto se puede evidenciar con el aumento de la tasa de crecimiento presentado en la Tabla 4, de 0.24 y 0.28 cm/día, siendo mayor que en el testigo que crecía 0.19 cm/día.

El efecto protector de los miembros del género *Bacillus* utilizados en el control de enfermedades fúngicas, puede deberse a la presencia de diferentes mecanismos para antagonizar de forma directa o indirecta el crecimiento de patógenos (Tejera *et al.*, 2012). Varios autores han informado la actividad antagónica del género *Bacillus* contra diferentes hongos fitopatógenos (Reinoso Pozo *et al.*, 2007), lo que se atribuye a la producción de compuestos de naturaleza peptídica y lipopeptídica como las micobacilinas, iturinas, bacilomicinas, fungistatinas y micosubtilinas (Souto *et al.*, 2004); compuestos que han demostrado ser efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos in vitro o in situ (Badía *et al.*, 2011; Sosa *et al.*, 2005; Corrales *et al.*, 2011). Entre los mecanismos de acción implicados en el control biológico están el parasitismo directo y muerte del patógeno, competencia por nutrientes, inducción de resistencia sistémica en la planta, disminuyendo el efecto dañino de los fitopatógenos (Orietta & Larrea, 2001). Este efecto inhibidor de las especies de *Bacillus* sobre hongos que causan enfermedades en las plantas puede estar asociado a la producción de enzimas que actúan en la degradación de la pared celular como las quitinasas y proteasas (Rodas *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos evidencian una vez más lo reportado por (Sosa, *et al.* 2005) sobre el elevado potencial que presentan las bacterias del género *Bacillus* para el control biológico en condiciones in vitro, ya que está demostrado por numerosos autores que los microorganismos pertenecientes a este género se caracterizan por tener la capacidad de producir sustancias, tales como, metabolitos, antibióticos, enzimas líticas, entre otras que aisladas, purificadas y producidas a gran escala son una valiosa alternativa del control químico, que tanto se ha encarecido a nivel Internacional y del cual existe una tendencia cada vez más

generalizada a disminuir su uso, debido precisamente a los daños que ha causado al hombre y al medio ambiente.

Un resultado muy interesante que deberá seguirse profundizando en investigaciones futuras, fue el mostrado por la cepa DCL12-11 (Q) identificada como *Rhizobium sp.*, la cual ha sido ampliamente reportada como estimulante cuando se aplica a cultivos de leguminosas (frijol, arveja, garbanzo, lentejas, entre otras) (Hernández *et al.*, 2012), no obstante como se puede apreciar en la Figura 5, también inhibe entre 50-90% (72.8% en promedio) a determinados fitopatógenos (*A. alternata*, *Fusarium sp.* y *F. equiseti*). Estos resultados coinciden con los reportados por Santillana *et al.*, (2012) en el que cepas de *Rhizobium* evaluadas mostraron potencial antagonico con *A. solani* y *Fusarium sp.*, con porcentajes de inhibición hasta de 49% y de 43% respectivamente.

Los resultados de estos ensayos indican que es posible considerar que las cepas evaluadas podrían utilizarse como una alternativa en el control biológico de estos hongos fitopatógenos, mediante la aplicación individual o en mezcla para obtener una mayor eficiencia en el control de estos.

4. CONCLUSIONES

A partir de cuatro bioinsumos recolectados de diferentes zonas de Nicaragua, se logró obtener 30 aislados, de los cuales 23 corresponden a bacterias, que a través de pruebas morfológicas y moleculares, dos de ellas se identificaron como *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G). Por otra parte, como producto de la preselección (Screen grueso) de cepas bacterianas antagonistas, se obtuvo 6 cepas con potencial antagonico de 26 evaluadas, estas fueron identificadas como: *B. subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G), *Bacillus sp.* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *B. cereus* X2-10(2)2 (R) y X5-9CD2 (S). El aislado DCL4-31 (F) correspondiente a *Bacillus subtilis*, fue el que presentó el mejor porcentaje de inhibición con un rango de 50-100%, pudiéndose considerar como una alternativa en el control biológico de hongos fitopatógenos pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Alternaria*. Finalmente, un resultado muy interesante fue el mostrado por la cepa DCL12-11 (Q) identificada como *Rhizobium sp.*, la cual inhibió entre 50-90% el crecimiento de los fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium sp.* y *Fusarium equiseti*; estos resultados sugieren considerar su aplicación no solo como bioestimulante, sino también como bioprotector al inhibir de crecimiento de ciertos fitopatógenos.

AGRADECIMIENTOS

A los estudiantes Mario Flores Hernández y Erick Roque Castellano, por el apoyo y dedicación mostrada para realización de este trabajo, al Programa Institucional, Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA-UNI) por la colaboración como contraparte de este proyecto y a la Universidad Nacional de Ingeniería a través de la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo por haber financiado la realización de esta investigación.

REFERENCIAS

- Álvarez, C., Osorio, N., & Montoya, M. (2013). Identificación molecular de microorganismos asociados a la rizosfera de plantas de vainilla en Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 293-305.
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. Bogotá: Trabajo de Grado. Pontificia Universidad Javeriana.
- Badía, M., Hernández, B., Murrel, J., Mahillon, J., & Pérez, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L). *Revista Brasileña de Agroecología*, 90-99.

Barquero, L., Campos, S., Tobar, M., Guerrero, A., Sánchez, J., & Landinez, L. (2007). Informe de vigilancia tecnológica. Bioinsumos. Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (COLCIENCIAS). Bogotá, Colombia: Cargraphics.

Benítez, S., Bentley, J., Bustamante, P., Sánchez, C., & Corrales, L. (2007). Aislamiento de los microorganismos cultivables de la rizosfera de *Ornithogalum umbellatum* y evaluación del posible efecto biocontrolador en dos patógenos del suelo. *NOVA*, 147-153.

Carrillo, L. (2003). Alternaria. En *Los Hongos de los Alimentos y forrajes* (págs. 70-86). Argentina: Universidad Nacional de Salta.

Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F., Gallegos-Morales, G., Flores-Olivas, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. (2015). Efectividad in vitro de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia-Solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 549-562.

Chen, K., Yang, J., & Zhao, H. (2013). Isolation and characterization of a *Bacillus* strain for alkaline wastewater treatment. *African Journal of Microbiology Research*. 7 (44): 5119-5125.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Barka, E. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Appl Environ Microbiol*. 71 (9): 4951-4959.

Corrales, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Bautista, D., González, L., & Guevara, M. (2011). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *NOVA-Publicación Científica en Ciencias Biomédica*. 8 (13): 63-75.

Cuervo Loza, J. (2010). Aislamiento y caracterización de *Bacillus* spp. como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales. Bogotá: Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana.

Handelsman, J., Raffel, S., Mester, E., Wunderlich, L., & Grau, C. (1990). Biological Control of Damping-Off of Alfalfa Seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Applied and Environmental Microbiology*. 56 (3): 713-718.

Hernández, J., Cubillos-Hinojosa, J., & Milian, P. (2012). Aislamiento de cepas de *Rhizobium* spp., asociados a dos leguminosas forrajeras en el Centro Biotecnológico del Caribe. *Revista Colombiana de Microbiología Tropical*. 2 (2): 51-62.

IPSA. (2016). Lista de plagas reportadas en Nicaragua IV versión. Managua: Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA).

Jiménez, D. (2007). Caracterización molecular de cepas nativas Colombianas de *Azotobacter* spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S. Trabajo de Grado para optar al título de Microbiólogo Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Kikot, G. (2012). Caracterización bioquímica, fenotípica y molecular de aislamientos de *Fusarium graminearum* provenientes de la región pampeana en relación a la patogenicidad. La Plata: Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.

Lagunas-Lagunas, J., Zavaleta-Mejía, E., Osada-Kawasoe, S., & Aranda-Ocampo, S. (2001). *Bacillus firmus* como Agente de Control Biológico de *Phytophthora capsici* Leo. en Jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Revista Mexicana de Fitopatología*. 19 (1): 57-65.

Moreno, J., & Albarracín, V. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)*. Serie Microbiología, 79-93.

Orberá, T., Serrat, M., & Ortega, E. (2014). Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola. *Biotecnología Aplicada*. 31: 7-12.

Orietta, F., & Larrea, V. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo integrado de plagas (Costa Rica)*. 62: 96-100.

Páramo, L. (2012). Caracterización de comunidades microbianas con potencial biotecnológico para la prevención del deterioro estructural. . Reynosa, Tamaulipas.: Tesis doctoral. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Biotecnología Genómica.

Pérez, R. (2012). Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en pepino (*Cucumis sativus* L.). Tesis de maestría, Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Montecillo, Texcoco. México.

Reinoso Pozo, Y., Casadesús Romero, L., García Suárez, A., Gutiérrez Pérez, J., & Álvarez-Rivera, V. (2006). Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*. 10 (3): 187-191.

Reinoso Pozo, Y., Vaillant Flores, D., Casadesús Romero, L., García Pérez, E., & Pazos Álvarez-Rivera, V. (2007). Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*. 11 (1): 35-40.

Rodas, B., Quero, M., Magaña, H., & Reyes, A. (2009). Selección de cepas nativas con actividad Quitino-Proteolítica de *Bacillus* sp. aisladas de suelos tropicales. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11 (1): 107-113.

Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M., Cristóbal-Alejo, J., Valencia-Botín, A., & Reyes-Ramírez, A. (2014). Actividad antagonica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Rev. Mex. Cienc. Agríc*. 5 (7): 1325-1332.

Santambrosio, Ortega, & Garibaldi. (2009). Catedra de Biotecnología. Tinsión y observación de microorganismos. Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional. Rosario, Argentina. p 1-9.

Santillana, N., Zúñiga, D., & Arellano, C. (2012). Capacidad promotora del crecimiento en cebada (*Hordeum vulgare*) y potencial antagonico de *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium etli*. *Agrociencia Uruguay*. 16 (2): 11-17.

Sosa, A., Pazos, V., & Torres, D. (2005). Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco. *Centro Agrícola*. 32 (3): 25-29.

Souto, G., Correa, O., Montecchia, M., Kerber, N., Pucheu, N., Bachur, M., & García, A. (2004). Genetic and functional characterization of a *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, 1247-1256.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.

Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. (2012). Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. Protección Veg.* 27 (2): 117-122.

Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M., & Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas.* 42 (3): 131-138.

SEMBLANZA DE LOS AUTORES



José Mamerto Méndez-Úbeda: Obtuvo el grado de Ingeniero Agrícola en la Universidad Nacional de Ingeniería, Nicaragua, donde actualmente es profesor Encargado de Catedra, investigador acreditado y Coordinador de Investigación de la Facultad de Tecnología de la Construcción. Egresado de la maestría Interinstitucional en Biotecnología, Nicaragua. Tutor de un sinnúmero de monografías de grado en la carrera de Ingeniería Agrícola y ha colaborado en trabajos de Investigación multidisciplinarios en el sector agrícola. Cuenta con diferentes cursos y seminarios de capacitación nacionales e Internacionales en países como México e Israel.



Mario Sergio Flores Hernández, Graduado como Ingeniero Agrícola en la Universidad Nacional de Ingeniería, Nicaragua, en el año 2017. Excelencia académica de la carrera de Ingeniería Agrícola, en los años 2014 y 2015. Proyectista ganador en Feria tecnológica TECNO-UNI edición 2015, en el área de Biotecnología, en colaboración con el Programa de Investigación, Estudios Nacionales y Servicios del Ambiente (PIENSA). Expositor en VII Congreso Nacional de Ingeniería Agrícola, UNI y II Congreso Internacional “Las más recientes innovaciones para enfrentar la variabilidad climática en la producción agropecuaria” del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria.



Leandro Alberto Páramo Aguilera, Graduado como Ingeniero Químico con maestría en Ingeniería Química y énfasis en procesos biotecnológicos, en el Instituto Superior Politécnico “José Antonio Echeverría”, ISPJAE, de la Ciudad de la Habana, Cuba, en el año 1990. En 1997 se gradúa como Master en Microbiología y énfasis en bacteriología en la Universidad de Costa Rica, UCR. En junio del 2012, se gradúa como Doctor en Ciencias en el área de Biotecnología en el Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) de México. Amplia experiencia en el desarrollo de procesos biotecnológicos (biofertilizantes, bebidas alcohólicas, fermentados lácteos, bioprospección, compostaje, etc).