



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Licenciatura en Microbiología



Caracterización fisiológica de aislados de *Serratia* spp para el control de hongos que contaminan granos y su efecto promotor de crecimiento en cultivos de planta de jitomate bajo estrés salino

Alumno: Javier David Pérez Salcedo

Asesor: Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Santiago de Querétaro,

Enero 2025

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.

Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

Caracterización fisiológica de aislados de *Serratia* spp para el control de hongos que contaminan granos y su efecto promotor de crecimiento en cultivos de planta de jitomate bajo estrés salino

Tesis Individual

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Licenciado en Microbiología

Presenta:
Javier David Pérez Salcedo

Dirigido por:
Dr. José Antonio Cervantes Chávez

Dr. José Antonio Cervantes Chávez
Presidente

Dr.Fidel Landeros Jaime
Secretario

Dra. Dulce María Palmerín Carreño
Vocal

M en C. Daniel Mendoza Jiménez
Vocal

Resumen

El presente estudio tuvo como propósito evaluar las características bioquímicas y fisiológicas de varios aislados de bacterias pertenecientes al género *Serratia*, con el fin de explorar su aplicación en el sector agroindustrial, específicamente en el control de hongos que contaminan granos y en el desarrollo del crecimiento de la planta de jitomate bajo condiciones de estrés salino. Para ello, se corroboró la identidad de los aislados de *Serratia* mediante su perfil bioquímico, lo que permitió conocer sus características distintivas, además de lo relacionado con su capacidad para inhibir el crecimiento de los hongos que contaminan algunos granos. Fue posible determinar que producen quitinasas, lipasas, actividades que pueden estar implicadas en el efecto antagónico de los hongos antes mencionados. Así mismo, también se determinó su capacidad para secretar al medio de cultivo enzimas hidrolíticas que degradan el exoesqueleto del camarón.

El efecto antagónico de las cepas se evaluó tanto de manera individual como en consorcio, con el fin de determinar su efectividad en el control biológico de hongos fitopatógenos, además, se investigó la capacidad de estas cepas para tolerar el estrés salino, una condición que afecta negativamente a las plantas, debido a esto se determinó que las bacterias estudiadas son capaces de tolerar concentraciones de NaCl superiores al promedio, con esta dato se determinó su capacidad para proteger y promover el crecimiento de plantas de jitomate bajo estrés salino, lo que podría abrir nuevas posibilidades para mejorar la productividad agrícola en ambientes adversos, considerando que en el país, la cantidad de suelos que presentan condiciones de estrés salino es alta.

Los resultados de este proyecto determinaron que las cepas estudiadas poseen cierto potencial para ser implementadas como herramienta en la agroindustria, tanto para el manejo de plagas fúngicas como para la mejora del rendimiento vegetal en condiciones de estrés.

Palabras clave: *Serratia*, estrés salino, biocontrol, consorcio bacteriano, quitinasas.

Summary

The purpose of the present study was to evaluate the biochemical and physiological characteristics of several isolates of bacteria belonging to the genus *Serratia* spp. to explore its application in the agroindustrial sector, specifically in the control of fungi that contaminates grains and in the development of tomato plant growth under salt stress conditions. To this end, the identity of the *Serratia* spp isolates was confirmed through its biochemical profile, which allowed us to know its distinctive characteristics, in addition, the analysis of its physiological profile of these strains focused on its ability to inhibit the growth of fungi that contaminate some grains. It was possible to determine that they produce chitinases and lipases, activities that may be involved in the antagonistic effect of the fungi. Likewise, its ability to secrete hydrolytic enzymes into the culture medium that degrades the shrimp exoskeleton was also determined.

The antagonistic effect of the strains was also evaluated, both individually and in a consortium, in order to determine their effectiveness in the biological control of fungi. In turn, the ability of these strains to tolerate salt stress was investigated, a condition that negatively affects plants, since it was determined that the bacteria studied are capable of tolerating salt concentrations higher than average, with this data their ability to protect and promote the growth of tomato plants under salt stress was determined, which could open new possibilities to improve agricultural productivity in adverse environments, considering that in the country, the amount of soils that present saline stress conditions is high.

This project determined that the strains studied have certain potential to be implemented as a tool in agribusiness, both for the management of fungal pests and for improving plant performance under stress conditions.

Key words: *Serratia*, salt stress, biocontrol, bacterial consortium, chitinases.

Agradecimientos

Al M en C Salvador Ramírez Baltazar por su apoyo técnico y por su colaboración en el laboratorio. Su ayuda en la realización de los experimentos y su constante disposición para resolver dudas y brindar apoyo técnico fueron muy útiles para llevar a cabo mi investigación.

A mis compañeros de laboratorio LAMIMO, por su apoyo constante y su valiosa colaboración durante el desarrollo de esta tesis. Gracias por compartir su conocimiento, por las pláticas durante los experimentos y por estar siempre dispuestos a ayudar cuando lo necesité. Su compañerismo hizo que el trabajo en el laboratorio fuera menos pesado y mucho más agradable.

Gracias a mis sinodales la Dra. Dulce María Palmerín Carreño, al M en C. Daniel Mendoza Jiménez y el Dr. Fidel Landeros Jaime, por formar parte de este proyecto, por brindarme su tiempo y conocimiento para fomentar mi desarrollo académico y científico.

Gracias al apoyo FONDEC FNB202227.

Agradezco profundamente al Doc Toño por su invaluable apoyo, orientación y paciencia durante todo el proceso de elaboración de esta tesis. Su experiencia y conocimiento fueron cruciales para llevar a cabo este trabajo. Agradezco su constante disponibilidad para aclarar dudas y dar sugerencias, gracias por felicitar mis logros y ayudarme a reponerme de mis fracasos, a mi consideración es un ejemplo de lo que un docente y un científico debe ser, fue un gusto poder realizar este proyecto bajo su cargo.

A mi familia, a mis padres Francisco y Massiel y a mi hermano Francisco, por su dedicación, sacrificio y amor, me han enseñado el valor del esfuerzo y la perseverancia, agradezco su apoyo incondicional durante todo este proceso. Gracias por creer en mí y estar siempre a mi lado, por su comprensión, por ser mi mayor fuente de motivación e inspiración.

A mis amigos de la licenciatura, Gerardo, Emilio, Isabel, Jorge, Yoali y Sara quienes a lo largo de este proceso me brindaron su conocimiento, compañía y amistad. Gracias por ser mi apoyo en los momentos de estrés durante las prácticas, los exámenes y los proyectos, por recordarme la importancia de mantener una sonrisa, incluso cuando las cosas se ponían difíciles.

A mis amigos más cercanos, Fernando, Eduardo, Andrés y Oscar, quienes me han acompañado durante la mayor parte de mi vida, por escucharme, aconsejarme y, sobre todo, alentarme a seguir adelante. Gracias por ser parte fundamental de mi viaje, por hacer que todo fuera más llevadero con su humor y compañía, por ser un referente de que la amistad puede perdurar a pesar de la distancia y el tiempo.

A Dios, por permitirme vivir una vida rodeada de buena compañía, oportunidades y desafíos. Por haberme dado la dicha de ver un sueño hecho realidad.

Dedicatoria

A mi familia, mis gatos y a todas las bacterias que contribuyeron al desarrollo de este proyecto.

Índice

Resumen	12
Summary	13
Agradecimientos	14
Dedicatoria	15
Índice.....	0
Índice de tablas.....	2
Índice de figuras	3
I.- Introducción.....	1
I.2.- Aplicación de plaguicidas en México.....	5
I.3.- Control de la presencia de hongos utilizando microorganismos benéficos	7
I.4.- Bacterias como herramientas biotecnológicas para controlar hongos deterioradores	7
I.5.- Consorcios microbianos	8
I.6.- <i>Serratia</i> spp. como herramienta biotecnológica	10
II.- Hipótesis.....	12
III.- Objetivo general.....	12
IV.- Objetivos particulares	12
V.- Materiales y Métodos.....	13
V.1.- Material biológico.....	13
V.2.- Pruebas bioquímicas	13
V.3.- Producción de prodigiosina.....	13
V.4.- Sensibilidad a antibióticos	14
V.5.- Secreción de hemolisinas	14
V.6.- Secreción de quitinasas	14
V.7.- Degradación de quitina (exoesqueleto camarón)	14
V.8.- Prueba DNAsa	15
V.9.- Prueba lipasa	15
V.10.- Síntesis ácido cianhídrico (HCN)	15
V.11.- Solubilización de fosfato tricálcico.....	15
V.13.- Efecto antagónico del extracto rico en quitinasas (ERQ) en el crecimiento de hongos filamentosos	16
V.14.- Pruebas de compatibilidad para la formación de consorcios bacterianos	16
V.15.- Crecimiento del consorcio bacteriano en medio líquido.....	17
V.16.- Efecto del estrés salino en el crecimiento de <i>Serratia</i> spp.....	17

V.17.- Efecto de <i>Serratia</i> spp. en cultivos de jitomate.....	17
V.18.- Efecto de <i>Serratia</i> spp. en cultivo de jitomate sometido a estrés salino	18
VI.- Consideraciones Bioéticas	18
VII.- Resultados	20
Objetivo 1.- Corroborar la identidad de los aislados de <i>Serratia</i> spp. por su perfil bioquímico...	20
VII.1.- Identificación bioquímica de la colección de cepas de <i>Serratia</i> spp.....	20
VII.2.- Identificación bioquímica de los aislados de <i>Serratia</i> spp.	20
Objetivo 2.- Determinar el perfil fisiológico y bioquímico de los aislados de <i>Serratia</i> spp. con capacidad para antagonizar el crecimiento de hongos que afectan granos.....	21
VII.3.- Producción de prodigiosina.....	21
VII.4.- Producción de quitinasa.....	22
VII.5.- Producción de hemólisis.....	26
VII.6.- Producción de lipasa.....	27
VII.7.- Producción de proteasas	28
VII.8.- Síntesis de ácido cianhídrico	30
Objetivo 3.- Evaluar la susceptibilidad a antibióticos de aislados de <i>Serratia</i> spp. mediante pruebas de sensibilidad in vitro, con el fin de identificar patrones de resistencia y posibles mecanismos de tolerancia.....	32
VII.9.- Perfil de resistencia a antibióticos	32
Objetivo 4.- Determinar el efecto antagónico de <i>Serratia</i> spp. de manera individual y en consorcio contra hongos que contaminan granos.....	34
VII.10.- Pruebas de compatibilidad para la formación de consorcios bacterianos.....	34
VII.11.- Curvas de crecimiento	35
VII.12.- Efecto de los metabolitos bacterianos secretados al medio de cultivo contra hongos....	37
VII.13.- Degradación de exoesqueleto de camarón	38
VII.14.- Cultivo de hongos en medio enriquecido con quitinasas	40
Objetivo 5.- Evaluar la capacidad de tolerar el estrés salino en los aislados de <i>Serratia</i> spp.....	42
VII.15.- Efecto del estrés salino y osmótico en el crecimiento bacteriano	42
Objetivo 6.- Evaluar el efecto promotor de crecimiento por parte de los aislados de <i>Serratia</i> spp. en planta de jitomate sometido a estrés salino.	46
VII.16.- Efecto protector de <i>Serratia</i> spp. contra el estrés salino y osmótico en el desarrollo de plantas de jitomate.....	46
VIII.- Conclusiones	51
IX.- Perspectivas	54
XI.- Referencias	55

Índice de tablas

Tabla 1.- Perfiles bioquímicos de los aislados de <i>Serratia</i> spp.....	21
Tabla 2.- Características bioquímicas con actividad antagonista en aislados de <i>Serratia</i> spp.....	31
Tabla 3.- Halo de crecimiento detectado en las cepas de <i>Serratia</i> spp.	33
Tabla 4.- Ensayo de compatibilidad entre aislados de <i>Serratia</i> spp.....	35

Índice de figuras

Fig. 1.- Producción de prodigiosina en medio peptona-glicerol	22
Fig. 2.- Hidrólisis de quitina.....	25
Fig. 3.- Degradación de quitina.....	26
Fig. 4.- Hemólisis.....	27
Fig. 5.- Producción de lipasas	28
Fig. 6.- Producción de proteasas en medio gelatina.....	29
Fig. 7.- Curva de crecimiento de las cepas 1226, 1227,1292	36
Fig. 8.- Antagonismo de metabolitos generados por cepas de <i>Serratia</i> spp. contra hongos que afectan granos.....	38
Fig. 9.- Capacidad lítica de <i>Serratia</i> spp. en el exoesqueleto de camarón	39
Fig. 10.- Antagonismo de cepas de <i>Serratia</i> spp. contra hongos que afectan granos	41
Fig. 11.- Antagonismo de cepas de <i>Serratia</i> spp. contra hongos que afectan granos	42
Fig. 12.- Efecto del estrés salino y osmótico en las bacterias 1226 y 1227	44
Fig. 13.- Plantas de jitomate sometidas a estrés salino	47
Fig. 14.- Longitud del tallo en plantas de jitomate.....	48
Fig. 15.- Cantidad de hojas en plantas de jitomate.....	49
Fig. 16.- Longitud de la raíz en planta de jiomate.....	50
Fig. 17.- Efecto citotóxico del NaCl en la viabilidad de la plántula de jitomate.....	51

I.- Introducción

El sector agrícola es de gran importancia, considerando que cubre la creciente demanda de alimentos de poblaciones humanas y animales. Dada su alta importancia, es necesario que se cumplan todos los parámetros de calidad necesarios para evitar riesgos a la salud; para ello requiere garantizar la obtención de productos libres de patógenos, así como incrementar la cantidad de producto cosechado por hectárea de terreno. El desarrollo alcanzado se ha obtenido debido a la producción y uso de una serie de compuestos químicos empleados en el sector agrícola, conocidos de manera general como plaguicidas y fertilizantes. Dichos compuestos han demostrado su alta utilidad y capacidad para proteger los cultivos, a la vez que incrementan la producción; sin embargo, su uso ha sido desmedido durante décadas por parte de agricultores y grandes compañías, que esperan mejorar la producción con soluciones inmediatas a los problemas del campo. Un punto que destacar es la falta de apoyo técnico que permite la capacitación acerca de la manipulación adecuada de estos productos; debido a ello se ha impactado negativamente al medio ambiente y la salud humana (Moroch, 2019).

Los patógenos en los cultivos representan un claro riesgo que afecta negativamente la producción de alimentos. Se han encontrado varios tipos de microorganismos que infectan plantas utilizando diversos mecanismos; entre estos se destacan los hongos. Cabe mencionar que estos son patógenos de plantas y de animales. Los hongos que infectan a las plantas se conocen como fitopatógenos; son los agentes causales de más del 70 % de las enfermedades. Diversos grupos filogenéticos afectan los cultivos agrícolas; cabe mencionar: *Fusarium*, *Giberella*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Alternaria*, *Sclerotium* y *Botrytis*, entre muchos otros (Villaseñor et al., 2022).

El análisis económico postcosecha realizado por Cabrero et al., determinó que las pérdidas más significativas se producen en frutas y verduras, con estimaciones de aproximadamente el 45% de la cantidad producida, lo cual claramente tiene un gran impacto negativo en la economía mundial (Cabrero, 2022). Dichas pérdidas se estiman en un 20% en los países industrializados, en más del 50% en áreas con limitaciones de almacenamiento y transporte, es decir, en vías de desarrollo. (Martínez, 2019) La principal causa de estas pérdidas es debida a las infecciones fúngicas, puesto que, posterior a la fase de maduración,

la efectividad de estas infecciones depende de varios factores como la patogénesis de los hongos, la respuesta del huésped, de manera importante las condiciones de transporte y almacenamiento, el daño mecánico que experimenta el producto, las cuales impactan directamente en la vida de anaquel. (Martínez, 2019)

Los productos agrícolas son invadidos frecuentemente por microorganismos durante el desarrollo del cultivo en el campo, cosecha, transporte y almacenamiento, siendo los hongos los más abundantes y la principal causa de enfermedades. En cuanto a las pérdidas postcosecha de granos, las estimaciones son del 10% de la producción total (FAO, 2017). Por ejemplo, para México, de un volumen de 32 millones de toneladas de maíz que el país produce actualmente, las pérdidas postcosecha están estimadas en un 10 %, que representan miles de millones de pesos (FAO, 2020).

El desarrollo eficiente de la agricultura depende en gran medida de la producción y aplicación de fertilizantes, plaguicidas y reguladores de crecimiento para ser suministrados a las plantas. Los plaguicidas se clasifican en insecticidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas y nematicidas, el consumo mundial de plaguicidas está en torno a los 12 billones de euros, de los cuales el 50% corresponde a los países desarrollados de Europa y América del Norte (Tejedor, 2020). Los cultivos que más plaguicidas requieren son el maíz, el arroz, los cereales y el algodón. Sin el uso de plaguicidas se perdería el 50% de las cosechas. (Tejedor, 2020).

La industria química de agroquímicos es muy competitiva, debido a que el desarrollo de un nuevo producto más eficaz reemplaza a otros ya disponibles en el mercado. Un componente adicional es el desarrollo de la resistencia que manifiestan las plagas a los compuestos aplicados; esto hace necesaria la síntesis y obtención de nuevos plaguicidas más eficaces. Debido a la alta demanda, este sector junto con el farmacéutico tiene los costos más altos en investigación (hasta el 8% de los ingresos brutos) (Tejedor, 2020). En la elaboración de estos productos intervienen químicos que son los encargados de sintetizar el producto, además de los entomólogos, toxicólogos, micólogos, microbiológicos, los cuales realizan ensayos para asegurar que el producto resulte efectivo y seguro para su aplicación en el ecosistema y para la población. La admisión de un producto nuevo y su introducción en el mercado tiene múltiples requisitos, las autoridades fitosanitarias exigen una documentación científica y técnica, cuyo costo suele ser mayor a los 12 millones de euros (Tejedor, 2020).

Los gastos suelen ser muy elevados y en cuanto a los resultados, de 10.000 compuestos ensayados, solo uno suele alcanzar la producción comercial (Naranjo, 2018).

Los fungicidas presentan diferentes tipos dependiendo de su composición química, por ejemplo, están los derivados aromáticos como el O-fenilfenol, el diclorán y el clorotalonilo; estos se usan como protectores de semillas (Tejedor, 2020). Los más eficaces son las sales de zinc y de magnesio como el Zineb y el Maneb, que se usan principalmente para cultivos de patatas y hortalizas, también se han usado con éxito diversos compuestos organometálicos, fundamentalmente derivados de estaño y mercurio como el cihexatín, el fenbutatín y el cloruro de metoximercurio (Tejedor, 2020).

El uso masivo de plaguicidas ha dado lugar a contaminantes nocivos en alimentos y contaminación progresiva del suelo; esto ocurre debido a los diferentes compuestos utilizados para generarlos. Con esto su daño y sus efectos pueden variar. Según su toxicidad, los plaguicidas se clasifican en tres clases: A, B y C, de menor a mayor. Por ejemplo, el plaguicida orgánico más antiguo es el DDT (diclorodifeniltricloroetano) que utilizó Müller en 1939, pero fue sintetizado originalmente en 1874 por Othmar Zeidler (Bravo, 2020). Su uso permitió tratar y evitar varias epidemias (tifus transmitido por los piojos y malaria por mosquitos). Actualmente, su uso está restringido debido a que su elevada persistencia causa graves daños al medio ambiente (Tejedor, 2020).

Los fungicidas se dividen en dos tipos según su modo de acción: de contacto y sistémicos (Arroyo, 2022).

Los fungicidas de contacto; se aplican antes de que las esporas de los hongos lleguen a la planta, actúan únicamente en la superficie donde se han aplicado, permanecen en la superficie de la planta y no penetran en sus tejidos, por esta razón, su eficacia solo se da antes de que los patógenos infecten la planta, dado que la planta no los absorbe, estos fungicidas pueden ser eliminados de las superficies por la lluvia o el riego por aspersión (Hausbeck, 2019). Se estima que una pulgada de lluvia elimina alrededor del 50% de los residuos del fungicida, mientras que dos pulgadas de lluvia eliminan la mayor parte residual del fungicida de la superficie de la planta, además, los fungicidas de contacto son vulnerables a la

degradación por otros factores ambientales, como la luz ultravioleta, el calor y la actividad microbiana (Hausbeck, 2019).

La clasificación siguiente son los fungicidas sistémicos, los cuales son absorbidos por la planta hasta cierto grado, aunque la mayoría no son completamente sistémicos, debido a que no se distribuyen por toda la planta, existen diferentes niveles de movimiento sistémico, algunos productos son sistémicos solo a nivel local, lo que significa que son absorbidos por la planta y se desplazan una corta distancia desde el punto de aplicación, los fungicidas altamente sistémicos son capaces de moverse por toda la planta, tanto hacia arriba, hacia las puntas como hacia las raíces (Tejedor, 2020). En el caso de los fungicidas con movimiento translaminar, pueden trasladarse desde un lado de la hoja como la punta hacia el extremo opuesto (la base de la hoja) para protegerla (Hausbeck, 2019). Otro ejemplo de estos son los fungicidas sistémicos de xilema, que se mueven dentro de la hoja, generalmente hacia la punta, o ascienden por la planta hacia las puntas de los brotes, pero no se desplazan hacia las raíces. (Hausbeck, 2019). Sin embargo, solo unos pocos fungicidas se consideran altamente sistémicos.

Los químicos empleados en la elaboración de fungicidas, en su gran mayoría, tienen efectos adversos que dañan la piel, los pulmones y los ojos; los químicos como el metamsodio, ziram y ferbam se les conoce por provocar dermatitis de contacto, una afección crónica de la piel, problemas visuales, edema pulmonar y otros efectos secundarios (Arroyo, 2022). Otro ejemplo es que el captafol puede afectar a las personas con asma; y beber alcohol después de estar expuesto al tiram también puede causar reacciones adversas, además, cabe mencionar que todos los fungicidas son venenosos cuando se ingieren (Arroyo, 2022). En el caso de los fungicidas cimoxanilo y tridemorf pueden dañar al feto en caso de exposición de mujeres embarazadas. (Arroyo, 2022).

Los factores como la lluvia o irrigación pueden distribuir el fungicida aplicado a las plantas hacia acuíferos u otros suelos, con esto no sólo se hace daño a la fauna acuática, sino que también contamina el agua que otros animales pueden beber. Los fuertes vientos pueden soplar los químicos lejos de los cultivos enfermos hacia otras áreas no contaminadas, por ende, hay etiquetas que especifican no rociar fungicidas con vientos superiores a 160 km/h (Arroyo, 2022). Además, los granos tratados con fungicidas no deben alimentar a los

animales de ganado, debido a sus efectos tóxicos, debido a que pueden envenenarlos (Zuccarelli, 2019).

I.2.- Aplicación de plaguicidas en México

El consumo de plaguicidas mundialmente es considerablemente alto, y México no es excepción. En 2017, se registró un consumo de 1.77 kg/ha, el cual ha ido en aumento desde el año 2000, cuando era de 0.63 kg/ha, alcanzando su punto máximo en 2013 con 2.23 kg/ha (FAO, 2017). El uso excesivo de plaguicidas ha generado preocupación en el país, debido a que se han detectado niveles elevados de contaminantes tóxicos, como metales pesados y plaguicidas, en el suelo, agua y plantas en diversas regiones de México, además, se han observado efectos adversos sobre la salud humana (OECD, 2013).

El Plan Nacional de Desarrollo en México no abarca directamente a los plaguicidas. Pero se incluyen metas y objetivos en varios instrumentos políticos y regulatorios que abordan estas sustancias (SHCP, 2019). Hasta ahora hay tres leyes generales o federales que constituyen las más importantes para la gestión de plaguicidas en México:

- **La Ley General de Salud (LGS) de 1984, que regula los principales elementos del ciclo de vida de plaguicidas;**
- **La Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente de 1988 con la meta de prevenir la contaminación del suelo y el agua (LGE)**
- **La Ley Federal de Sanidad Vegetal (LFSV) de 1994**

El país de México es de los pocos de la OCDE que han implementado amplios impuestos a los plaguicidas para reducir su uso indiscriminado (Guerrero, 2019). La Ley General de Salud de México establece que sólo se puede autorizar el uso de plaguicidas persistentes y bioacumulativos si no representan un peligro para la salud humana, de lo contrario, se busca sustituirlos con otros que presenten menos efectos secundarios o riesgos (INEGI, 2019). México cuenta con una clasificación de plaguicidas (a través de la Norma Técnica Oficial NOM-232-SSA1-2009), donde la clasificación de toxicidad se basa en los

criterios de la OMS, sin embargo, esta NOM no especifica cuándo el riesgo se considera inaceptable.

El uso de fertilizantes en México es fundamental para la agricultura, debido a que busca aumentar la productividad de los cultivos y mejorar la calidad de los suelos, sin embargo, su aplicación tanto de orgánicos como de inorgánicos ha generado preocupaciones ambientales debido a su potencial para contaminar cuerpos de agua y afectar la biodiversidad, aunado al fenómeno de eutrofización. En el país, 24.6 millones de hectáreas se destinan para la agricultura, de las cuales se cultivan 20.7 millones con la participación de 5.8 millones de personas que hacen posible una producción de 287.7 millones de toneladas de productos agrícolas (INEGI, 2019).

La producción y productividad del sector agrícola mexicano depende, entre otros factores, del uso de fertilizantes químicos y consecuentemente de su disponibilidad en el mercado, con oportunidad y a precios accesibles para los productores. Conforme a cifras de la Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA) en 2019, el 67.4 % de las unidades de producción del sector utilizaron fertilizantes químicos y el restante 24.4 % abonos naturales (INEGI, 2019). En 2022, los cultivos anuales más destacados fueron: el algodón, con el 70.6 % de la producción nacional; la papa, con el 58.4 %; el brócoli, con el 54.5 %; la cebolla, con el 49.4 %; el maíz grano amarillo, con el 45.0 %; la soya, con el 42.3 %; el trigo grano, con el 41.8 % y el arroz, con el 40.6 % (INEGI, 2022). Del total de grandes productores que realizaron agricultura a cielo abierto, el 65.5 % aplicó fertilizantes químicos. Donde más superficie fertilizada hubo fue en Chihuahua, Sonora, Sinaloa, Jalisco, Tamaulipas y Guanajuato (INEGI-2022).

Los agricultores siguen utilizando estos productos para asegurar la seguridad alimentaria en un país donde la agricultura desempeña un papel fundamental en la economía. Sin embargo, en los últimos años ha surgido un creciente interés por adoptar prácticas más sostenibles, como la agricultura orgánica y el uso de fertilizantes de liberación controlada, que buscan equilibrar la productividad agrícola con la preservación del medio ambiente.

I.3.- Control de la presencia de hongos utilizando microorganismos benéficos

La práctica más novedosa considerada para la reducción de plagas es el control biológico, que implica implementar el uso de organismos para tratar o disminuir el efecto de una plaga específica, haciéndola menos abundante. Los organismos empleados como agentes de control biológico (ACB) que actúan contra las plagas incluyen microorganismos y animales como artrópodos. Dentro del control biológico, la producción de bioplaguicidas a base de bacterias, hongos y virus entomopatógenos ha cobrado importancia en los últimos años, debido a que suelen ser específicos con su blanco de ataque y son de bajo impacto ambiental, a diferencia de sus equivalentes sintéticos (Chillo, 2023).

Los microorganismos presentan una gran diversidad, de los cuales varios son empleados para el control de plagas, los cuales pueden sustituir o complementar ciertos plaguicidas. Algunos de los factores más relevantes para la producción a gran escala y la expansión del uso de estos plaguicidas biológicos incluyen las condiciones de crecimiento, así como la recuperación y conservación del material biológico con efecto plaguicida (Fenibo et al., 2021).

I.4.- Bacterias como herramientas biotecnológicas para controlar hongos deterioradores

La presencia de hongos deterioradores es un factor de alta importancia, además de las pérdidas monetarias, así como la calidad del producto. Los hongos como *Aspergillus*, *Alternaria*, *Fusarium* y *Penicillium* plantean un importante reto a la salud, debido a que algunas especies son productoras de micotoxinas, incluidas aflatoxinas, ocratoxinas, alternariol y fumonisinas (Fenta, 2023).

La problemática planteada determina que es necesario implementar alternativas seguras y amigables con el medio ambiente para controlar las infecciones postcosecha. El empleo de microorganismos antagonistas para el control biológico es una alternativa

novedosa entre los diversos métodos para prevenir la infección postcosecha provocada por patógenos. En comparación con los fungicidas sintéticos, la aplicación de microorganismos antagonistas en el manejo de enfermedades postcosecha tiene varias ventajas, como ser inherentemente menos dañinos que los pesticidas químicos, además, a diferencia de los pesticidas convencionales de amplio espectro, afecta únicamente a la plaga objetivo (Fenta, 2023). En los últimos años, el control biológico ha sido objeto de estudio y ha demostrado ser efectivo en el control de enfermedades postcosecha.

La eficacia de diferentes microorganismos antagonistas ha sido evaluada en el control de varios hongos y se han presentado resultados prometedores; tal es el ejemplo de *Burkholderia spinosa* con aplicaciones previas a la cosecha para fitopatógenos en banano, *Pantoea agglomerans* con aplicación precosecha para controlar enfermedades postcosecha en cítricos, con resultados que mostraron una eficiente protección de la naranja contra *Penicillium digitatum* durante el almacenamiento (Hernández, 2019). La combinación de antagonistas con otros compuestos antimicrobianos podría ser un método eficaz para mejorar el rendimiento de biocontrol.

I.5.- Consorcios microbianos

Un consorcio microbiano es un conjunto de dos o más especies microbianas en un mismo nicho, que actúan conjuntamente como una comunidad donde no se presentan rasgos antagonistas. La asociación requiere estilos de vida sinérgicos en los que el crecimiento y el metabolismo de nutrientes se conducen más efectivamente que en poblaciones individuales (Oliveros, 2023). Considerando esto, en un consorcio microbiano, sus miembros mantienen la compatibilidad metabólica y ecológica, pueden desempeñar funciones complicadas que bacterias pertenecientes a un género y especie, de manera individual, no podrían; además, la sinergia de la asociación puede generar mayor resistencia a las fluctuaciones del ambiente y promover la estabilidad de las bacterias involucradas (Carreño, 2010).

La implementación de consorcios para el control de hongos fitopatógenos es una oportunidad novedosa que ha sido poco estudiada. A la fecha existen algunas publicaciones que respaldan la utilidad de utilizar consorcios bacterianos como biocontroladores; un

ejemplo es el uso de tres cepas de *Bacillus* spp (C1) y otro formado con dos cepas de *Pseudomonas* spp (C2) como potenciales biocontroles de *Solanum tuberosum*, en este caso se observó que los consorcios bacterianos C1 y C2 redujeron significativamente los daños causados por *Spongospora subterranea* f. sp. subterránea. (Muñoz et al., 2021). En otro ejemplo, se evaluó el potencial de un consorcio formado por *Bacillus megaterium*, *Bacillus marisflavi*, *Exiguobacterium aurantiacum* y *Pseudomonas mendocina* en el biocontrol del fitopatógeno *Lasiodiplodia pseudotheobromae*; mostró un 87.73% de inhibición contra el hongo *L. pseudotheobromae* (Mota, 2021).

Los consorcios bacterianos presentan potencial en la promoción del crecimiento de las plantas, debido a que facilitan la disponibilidad de nutrientes esenciales y mejoran la salud del suelo. Además, en condiciones de estrés salino, la presencia de ciertas bacterias reduce los efectos adversos al producir metabolitos que ayudan a las plantas a tolerar la salinidad, regulando la homeostasis de iones y promoviendo mecanismos de defensa. Así, la interacción sinérgica entre plantas y consorcios bacterianos no solo potencia el crecimiento, sino que también ofrece una estrategia eficaz para enfrentar condiciones ambientales desfavorables.

Los resultados documentados muestran otros ejemplos importantes de interacciones positivas entre plantas y microbios asociadas a la promoción del crecimiento de las plantas incluyen *Pseudomonas*, *Azotobacter*, *Serratia* y *Azospirillum*, capaces de mejorar la disponibilidad de nutrientes en el suelo, la absorción y asimilación de nutrientes de las plantas, así como apoyar el ciclo del nitrógeno (Lugtenberg, 2015; Chepsergon, 2023).

El enfoque nuevo que se ha propuesto en los últimos años, consiste en la incorporación de inoculantes microbianos eficaces para replicar las redes biológicas presentes en los suelos nativos. Este proceso estimula la recuperación de grupos microbianos funcionales y beneficiosos que están relacionados positivamente con la fertilidad del suelo (Stringlis et al., 2018). Dichos tratamientos pueden promover la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la producción de sideróforos, fitohormonas y exopolisacáridos, los cuales son conocidos por mejorar el crecimiento de las plantas y, al mismo tiempo, protegerlas del estrés abiótico, como las temperaturas extremas, el pH desfavorable, la salinidad y la sequía (Van Oosten et al., 2017). Además, estos inoculantes contribuyen a la mitigación de la contaminación por metales pesados y pesticidas (Ayilara, 2023).

I.6.- *Serratia* spp. como herramienta biotecnológica

El género *Serratia*, que pertenece a la familia Enterobacteriaceae, incluye diversas especies de bacterias Gram negativas, la mayoría de las cuales se distinguen por producir un pigmento rojo denominado prodigiosina (Williamson et al., 2005). En plantas, se ha demostrado que estas bacterias son capaces de inducir resistencia sistémica contra patógenos y de promover el crecimiento vegetal (Jeong et al., 2015). Además, se ha comprobado su capacidad para establecerse como endófitas, una característica interesante que favorece su supervivencia en el campo y le permite ejercer efectos antagónicos desde el interior de los tejidos vegetales (Tan et al., 2015). El análisis, la comparación y la secuenciación de su genoma han permitido identificar varios genes que otorgan a *Serratia* diversas actividades y atributos que refuerzan su potencial como agente de biocontrol (Li et al., 2015).

Las actividades principales metabólicas que le otorgan a *Serratia* spp. el potencial como ABC de plagas y fitopatógenos es su eficiente maquinaria quitinolítica, la cual utiliza y activa para degradar la quitina estructural de las paredes celulares de los hongos y el exoesqueleto de los artrópodos fitófagos (Latgé, 2010). La maquinaria enzimática de *S. marcescens* ha sido ampliamente estudiada y se compone de tres quitinasas principales (ChiA, ChiB, ChiC), una posible proteína asociada a la quitina (CBP21) (Suzuki et al., 2002), y una quitobiasa (Toratani et al., 2008). Esta maquinaria quitinolítica se activa en condiciones de laboratorio al utilizar medios mínimos suplementados con quitina coloidal como única fuente de carbono (Singh et al., 2016).

Los miembros del género *Serratia* se han estudiado y se han encontrado varias cepas con potencial antifúngico debido a sus propiedades bioquímicas y metabólicas, por ejemplo: *Serratia marcescens*, *Serratia nematodiphila*, *Serratia enthomophyla*, por mencionar algunas, las cuales mostraron actividad quitinolítica, glucanolítica, celulolítica y la producción de prodigiosina, constituyendo así candidatas potenciales como agentes de biocontrol para hongos (Alexander, 2022).

Los experimentos reportados muestran resultados favorables para el uso del género *Serratia* como agente de biocontrol, por ejemplo, contra *Sclerotinia minor*, causante de la pudrición basal en lechuga; encontraron una reducción significativa en el crecimiento in

vitro, cero incidencia de la enfermedad en plantas de invernadero y una alta capacidad de colonización de la rizósfera (El-Tarably et al., 2000). Posteriormente, se reportó sinergismo en la actividad antifúngica sobre *Botrytis cinerea* debido al efecto antifúngico de la prodigiosina y las quitinasas extracelulares de esta misma cepa (B2) (Someya et al., 2001). También otro grupo purificó parcialmente una quitinasa de *S. marcescens* B4A, la cual mostró actividad antifúngica sobre las hifas de *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris sp*, *Alternaria raphani* y *A. brassicicola*, actividad que se visualizó con cambios estructurales en las paredes celulares de los hongos (Castillo, 2022).

Las capacidades que se han observado en bacterias del género *Serratia* para controlar hongos fitopatógenos muestran potencial biotecnológico, en este proyecto proponemos utilizar cepas de *Serratia* spp. como una herramienta biotecnológica, la cual permita antagonizar hongos post cosecha que atacan granos, a la vez que se demuestra su efecto promotor de crecimiento en jitomate.

II.- Hipótesis

La colección de aislados de *Serratia* spp. poseen características fisiológicas y bioquímicas que le permiten antagonizar hongos que contaminan granos, y promueven un efecto benéfico en cultivo de jitomate en condiciones de estrés salino.

III.- Objetivo general

Evaluar las características bioquímicas y fisiológicas de un conjunto de cepas de *Serratia* spp. para su aplicación en el sector agroindustrial enfocada al control de hongos que contaminan granos, y determinar su efecto promotor de crecimiento en planta de jitomate crecido en condiciones de estrés salino.

IV.- Objetivos particulares

- 1.- Corroborar la identidad de los aislados de *Serratia* spp. por su perfil bioquímico.
- 2.- Determinar el perfil fisiológico y bioquímico de los aislados de *Serratia* spp. con capacidad para antagonizar el crecimiento de hongos que afectan granos.
- 3.- Evaluar la susceptibilidad a antibióticos de aislados de *Serratia* spp. mediante pruebas de sensibilidad in vitro, con el fin de identificar patrones de resistencia y posibles mecanismos de tolerancia.
- 4.- Determinar el efecto antagónico de *Serratia* spp. de manera individual y en consorcio contra hongos que contaminan granos.
- 5.- Evaluar la capacidad de tolerar el estrés salino en los aislados de *Serratia* spp.
- 6.- Evaluar el efecto promotor de crecimiento por parte de los aislados de *Serratia* spp. en planta de jitomate sometido a estrés salino

V.- Materiales y Métodos

V.1.- Material biológico.

Las bacterias 1226, 1227, 1291, 1292 y 1293 del cepario del Laboratorio de Microbiología Molecular (LAMIMO), FCN-UAQ, se conservan a -80 °C en glicerol al 40 %; para su uso, se sembraron en agar nutritivo (AN) y se incubaron a 28 °C por 24 h.

El cultivo líquido de las bacterias ajustado a densidad óptica deseada a 600 nm (DO_{600}) se preparó de la siguiente manera: se inoculó la bacteria de interés en caldo nutritivo (CN, BIOXON) por 24 h a 28 °C, se midió la DO_{600} en un espectrofotómetro Genesys 10S UV-Vis de Thermo Fisher, se preparó el volumen necesario al valor de DO_{600} deseado (según se indique en el experimento utilizando CN para diluir).

Los hongos de interés agroindustrial que contaminan granos: (*Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum*) pertenecen al cepario del LAMINO. Los hongos *Sclerotium rolfsii* donados por el Dr. Alfredo Herrera: Langebio Cinvestav-Unidad Irapuato y *Fusarium oxysporum* donado por la Dra. Blanca Estela Gómez de la Universidad de Guanajuato. Todos los hongos se encuentran conservados a -80 °C en una matriz de celofán. Para su crecimiento, se inoculó en una caja de agar papa dextrosa (PDA, BIOXON) un fragmento de dicha matriz y se incubó a temperatura ambiente por una semana.

Los ensayos con jitomate se realizaron con las semillas comerciales Jitomate Saladet y Rancho los Molinos; se sembró en mezcla de suelo general.

V.2.- Pruebas bioquímicas

La batería de pruebas bioquímicas: TSI, KIA, LIA, Citrato, Sim, Urea, Indol, se realizó en el UMBA. Que se inocularon con las bacterias 1226, 1227, 1291, 1292, 1293, se incubaron de 24 a 48 h a una temperatura de 28 °C (Blancas, 2014).

V.3.- Producción de prodigiosina

Las cajas de agar peptona glicerol se prepararon, se crecieron las cepas en CN según el punto 1, se ajustó el cultivo a DO_{600} de 1.0, se inocularon 25 µL de cada cultivo bacteriano. Las cajas se incubaron a temperatura ambiente (TA) 28 °C por 96 h. La presencia de prodigiosina se determinó por el desarrollo de color rojo. El experimento se realizó por triplicado.

V.4.- Sensibilidad a antibióticos

La sensibilidad de las bacterias a antibióticos se realizó por la técnica de Kirby-Bauer. Se utilizó agar Mueller-Hinton (MH, BIOXON) para evaluar a las 5 cepas (1226, 1227, 1291, 1292, 1293). Los cultivos bacterianos se ajustaron a DO600 de 0.2, como se indicó en el punto 1. Cada bacteria se inoculó en agar MH con 200 mL; las células se distribuyeron uniformemente de tal manera que se formó un tapete utilizando un hisopo estéril. Se colocaron los sensidiscos comerciales (ceftazidima, cefotaxima, metoxazolina, cefoxitina, estreptomicina, cefazolina) para los diferentes antibióticos de manera equidistante en la placa. Se incubaron a 28 °C de 24 a 48 h. Se midieron los halos de inhibición con un vernier. El experimento se realizó por triplicado.

V.5.- Secreción de hemolisinas

Las placas de agar sangre se prepararon con sangre de borrego 5-10 %. Las bacterias se ajustaron a la DO600 como en el punto 1. Se colocó una gota de 20 µL de cada bacteria. Como control se incluyó la cepa de *Escherichia coli* (892) y un aislado clínico de *Serratia marcescens* (91). Una vez seca la gota, las placas se incubaron a 28 °C por 72 h. El halo de inhibición se midió a contraluz con un Vernier. El ensayo se realizó por triplicado.

V.6.- Secreción de quitinasas

El medio sintético: NaHPO₄ 6gL⁻¹, KH₂PO₄ 3gL⁻¹, NH₄Cl 1gL⁻¹, extracto de levadura 0.05 gL⁻¹, almidón 1 %, quitina coloidal 10 gL⁻¹, agar bacteriológico 2% se realizó previo a la inoculación de las bacterias. Las placas se inocularon como en el punto anterior (40 µL), se incluyeron los mismos controles. Una vez seca la gota, las placas se incubaron a 28 °C por 96 h. Para evidenciar el halo de hidrólisis de quitina, la placa se tiñó con una solución de rojo Congo (2 %) durante 2 minutos. Se lavó con agua corriente hasta eliminar el exceso de colorante (Wang et al., 2023). El experimento se realizó por triplicado.

V.7.- Degradación de quitina (exoesqueleto camarón)

Las cepas se crecieron como en el punto 1. Se preparó medio sintético compuesto por litro: 6g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0.5 g NaCl, 7.5 mL de quitina coloidal, 5 g almidón, 0.5 g de extracto de levadura y 0.5 g de MgSO₄ y 2% exoesqueleto de camarón. Los exoesqueletos de camarón se lavaron y se esterilizaron de manera independiente. Posteriormente se agregaron al medio de cultivo. Previamente las bacterias se crecieron y se

ajustó su DO₆₀₀ como en el punto 1 a 1.0, posteriormente se inocularon 750 µL de cultivo de cada cepa independiente y 375 µL de cada bacteria en el caso de consorcio. El medio de cultivo se incubó 28 °C en agitación a 150 rpm durante 6 días. Transcurrido el tiempo de incubación los restos de exoesqueleto de camarón se recuperaron por filtración, se secaron en horno a 80 °C durante una semana y por diferencia de peso se determinó el porcentaje de degradación de exoesqueleto (Awaludin y col., 2020). El experimento se realizó por triplicado.

V.8.- Prueba DNAsa

Las cajas de agar DNAsa (BBL) se prepararon previo a inocular las bacterias, las bacterias se prepararon como en el punto 1. Se inoculó una gota de 20 µL de la bacteria de interés, una vez seca la gota se incubó a 28 °C de 24 a 48 h. Posteriormente se agregó ácido clorhídrico (1 N) por 5 minutos para observar el halo de hidrólisis (Britania, 2014).

V.9.- Prueba lipasa

Las cajas con peptona se prepararon con las siguientes especificaciones: 1 gL⁻¹, NaCl 4gL⁻¹, CaCl₂ 1 gL⁻¹, se agregó Tween 80 al 1%. Las bacterias ser prepararon como en el punto 1, y se inocularon como en el punto anterior. Una vez pasado el tiempo de incubación se determinó la presencia del halo gris formado alrededor de la bacteria, considerando así una prueba positiva (Ilesanmi et al., 2020), el experimento se realizó por triplicado.

V.10.- Síntesis ácido cianhídrico (HCN)

La síntesis de HCN se identificó utilizando agar LB adicionado con 4.4 gL⁻¹ de glicina. La bacteria de interés se estrió de forma masiva en toda la superficie de la placa (60x15). En la parte superior de la placa se colocó un papel de filtro Whatman Nº 1 impregnado con una solución de carbonato de sodio al 12.5 % y ácido pícrico al 2.5 %. El viraje de color del papel filtro de color amarillo a naranja/rojo se consideró como una prueba positiva (Sriwati et al., 2023). El experimento se realizó por triplicado.

V.11.- Solubilización de fosfato tricálcico

El agar Pikovskaya (glucosa 10 gL⁻¹, NaCl 0.2 gL⁻¹, KCl 0.2 gL⁻¹, (NH₄)SO₄ 0.5 gL⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.1 gL⁻¹, extracto de levadura 0.5 gL⁻¹, fosfato tricálcico 5 gL⁻¹, FeSO₄·7 H₂O 0.004 gL⁻¹, MnSO₄·7H₂O 0.008 gL⁻¹, agar bacteriológico 20 gL⁻¹, púrpura de bromocresol

(0.04 %) pH 6.8 se realizó conforme a las especificaciones en el UMBA. Las bacterias se prepararon como en el punto 1. En la placa se inoculó una gota de 20 μ L para cada una de las bacterias de forma equidistante, la placa se incubó a 28 °C durante 48 h (Lu et al., 2021). El ensayo se realizó por triplicado.

V.12.- Curvas de crecimiento

El cultivo líquido de las bacterias se preparó como en el punto 1. A partir de esta solución a DO₆₀₀ de 1.0, se inocularon 10 mL de CN a una DO₆₀₀ final de 0.05. Se incubaron a 28 °C en agitación a 150 rpm. Cada 24 h de incubación se tomó 1 mL de cada cepa y se midió su DO₆₀₀. El experimento se realizó por triplicado, en cada ocasión se utilizaron tres muestras. Los datos se analizaron con una prueba de ANOVA.

V.13.- Efecto antagónico del extracto rico en quitinasas (ERQ) en el crecimiento de hongos filamentosos

El cultivo se preparó como el punto anterior; las células se eliminaron por centrifugación a 8000 rpm/10 min. El extracto así obtenido se trató con kanamicina (50 mg/mL) 5 μ L por cada mL de medio y se incubó por 6 h. Se preparó agar PDA a el doble de concentración (PDA 2X), se mezcló en proporción 1:1 con ERQ para preparar cajas de PDA a concentración normal. En el centro se inoculó un disco de micelio del hongo a probar. Se midió el crecimiento radial posterior a 10 días de incubación a 28 °C, cuando la caja control del hongo haya cubierto la superficie de la caja en su totalidad.

El sobrenadante (SN) se recuperó y se utilizó para preparar PDA suplementando con SN, que posteriormente se centrifugó a 6000 rpm durante 8 minutos, se trató con 2 mL de kanamicina (50 mg/mL) por mL de SN durante 6 h en agitación. Este SN libre de célula y tratado con Km se utilizó para preparar agar PDA. Para ello, se esterilizó agar PDA a la concentración 2X; una vez estéril, se agregó un volumen del SN para obtener PDA adicionado de los metabolitos producidos por el consorcio. Como control se utilizó un cultivo de Escherichia coli (Awaludin y col., 2020)

V.14.- Pruebas de compatibilidad para la formación de consorcios bacterianos

El medio utilizado fue el agar Muller-Hinton. Las bacterias se prepararon como en el punto 1, se ajustaron a la DO₆₀₀ de 1.0 y 0.2, se preparó un tubo de 1.5 mL para cada DO₆₀₀. Una

vez con el cultivo ajustado, se inoculó cada cepa por separado sus respectivas cajas de MH, para obtener el tapete de la bacteria de interés, para ello se inocularon 200 µL del cultivo ajustado a DO₆₀₀ 0.2, este se distribuyó con hisopo estéril en toda la superficie del agar. Una vez seco se agregó una gota de 20 µL de los cultivos bacterianos de las otras cepas DO₆₀₀ (1.0), estas se distribuyeron de manera equidistante en la superficie de la placa. Una vez secas las gotas, las placas se incubaron a 28 °C por hasta 96 h, se revisaron cada 24 h. La presencia de un halo de inhibición indica una reacción no compatible, la ausencia de halo indica una reacción compatible (Cao, 2022). El ensayo se realizó por triplicado.

V.15.- Crecimiento del consorcio bacteriano en medio líquido

Los consorcios se crecieron en medio líquido para su inoculación en plantas, las bacterias se crecieron de manera independiente, como en el punto 1. Una vez ajustada la DO₆₀₀ de 1.0 se combinaron los cultivos bacterianos en proporción 1:1, dependiendo del experimento a realizar en función de la cantidad necesaria se escaló el volumen preparado.

V.16.- Efecto del estrés salino en el crecimiento de *Serratia* spp.

Las bacterias se crecieron y se prepararon para su inoculación según lo indicado en el punto 1. Se prepararon 10 mL de CN suplementado con NaCl o KCl de manera independiente con: 0.5 M, 1 M y 2 M respectivamente y polietilenglicol (PEG) a la concentración de 10 %, 15 % y 20 % (peso a volumen). Cada medio de cultivo se inoculó con 50 µL de células, se incubó a 28 °C por 5 días en agitación a 150 rpm. Se tomó 1 mL de cada cultivo para medir la DO₆₀₀ cada 24 h. El ensayo se realizó por triplicado (Ketola, 2014). Los datos se analizaron con una prueba ANOVA.

V.17.- Efecto de *Serratia* spp. en cultivos de jitomate

Los ensayos se realizaron con 40 plantas de jitomate en sustrato estéril (mezcla general de vermiculita, perlita, peat moss) para inocular con cultivo bacteriano, a su vez, se prepararon cultivos para la bacteria 1226, 1227 y el consorcio 1226:1227. Se tomaron 10 plantas con cada tratamiento y se mantuvieron 10 plantas regadas con agua corriente como control, los tratamientos se aplicaron por 2 meses y al finalizar se retiraron las plantas de las macetas (buscando preservar raíces, tallo y hojas intactas) para medir y cuantificar las características de cada planta, una vez se obtuvieron resultados estos se tabularon y se compararon (Mayak, 2004).

V.18.- Efecto de *Serratia* spp. en cultivo de jitomate sometido a estrés salino

El ensayo inicial se realizó preparando 120 plantas de jitomate, que se ordenaron en 4 lotes de 30 plantas cada uno. Control con agua corriente, tratamiento 1: suplementado con consorcio bacteriano, tratamiento 2: NaCl, tratamiento 3: NaCl suplementado con consorcio bacteriano. Para suministrar el NaCl se utilizó 1 mL de una solución de NaCl 250 mM, que se aplicó 3 días por semana con intervalos de 1 día entre la aplicación (lunes, miércoles y viernes). Al consorcio bacteriano 1226/1227 (preparado como en el punto 15) se le suministró 1 mL de cultivo, una vez a la semana, antes de aplicar los tratamientos con NaCl. El experimento se mantuvo a lo largo de 75 días y se suministró agua corriente como riego cuando fue necesario. Una vez terminado este tiempo, se retiraron las plantas de las macetas (buscando preservar raíces, tallo y hojas intactas) para medir y cuantificar las características de cada planta. Una vez se obtuvieron resultados, estos se tabularon y se compararon (Mayak, 2004).

El ensayo siguiente se realizó preparando 60 plantas de jitomate; se ordenaron en 4 lotes de 15 plantas cada uno, con los mismos tratamientos indicados en el párrafo anterior. Bajo las mismas condiciones, en este caso se suministró 1 mL de una solución de NaCl 250 mM durante las primeras 6 semanas de tratamiento, y en las últimas 2 semanas se suministró 2 mL de la misma solución en las mismas condiciones. Este tratamiento se mantuvo por 2 meses.

VI.- Consideraciones Bioéticas

Las bacterias para utilizar en este proyecto no son patógenas para humano, los hongos a utilizar son fitopatógenos y relacionados con el daño postcosecha. Utilizaremos medidas de seguridad adecuadas para el manejo de las muestras biológicas, como el uso de bata, guantes, lentes de seguridad, zapato cerrado y todas las normas de seguridad en un laboratorio nivel 1 de bioseguridad además del uso de campanas de bioseguridad tipo I y II.

La recolección de residuos peligrosos biológicos o químicos la realiza quincenalmente la empresa TRIRSA, según la norma NOM-052-SEMARNAT-2005, la cual identifica y clasifica los residuos peligrosos para su posterior tratamiento, criterios que seguimos para su

disposición basados en el sistema CRETIB. Los cultivos líquidos y sólidos, tanto de bacterias como de hongos, se inactivan por esterilización en autoclave; posteriormente, la biomasa se deposita en bolsas rojas de plástico (RPBI) para su manejo por la empresa TRIRSA, NOM-087-SEMARNAT-SSA1 2002. Lo mismo aplica para residuos de puntas, tubos de plástico que han sido utilizados para manipular a los microorganismos.

Las plantas que se usarán serán de jitomate, las cuales no están protegidas por alguna norma mexicana. Las semillas para utilizar son variedades comerciales. Una vez terminado el experimento, los cadáveres de plantas serán eliminados del sustrato, y esterilizados en autoclave. El suelo utilizado, de igual manera, será esterilizado para eliminar la presencia de microorganismos. Todo el material de desecho, una vez esterilizado, será dispuesto para su manejo por la empresa TRIRSA, el cual es organizado por el técnico del laboratorio M. en C. Salvador Ramírez Baltazar.

VII.- Resultados

Objetivo 1.- Corroborar la identidad de los aislados de *Serratia* spp. por su perfil bioquímico.

VII.1.- Identificación bioquímica de la colección de cepas de *Serratia* spp.

VII.2.- Identificación bioquímica de los aislados de *Serratia* spp.

Los cinco aislados de bacterias no caracterizadas se analizaron (1226, 1227, 1291, 1292, 1293) (Tabla 1), se compararon con los resultados esperados del género *Serratia* descritos en la bibliografía (Carroll, 2019); el género *Serratia* generalmente presenta un TSI positivo, lo que indica la fermentación de glucosa y posiblemente lactosa o sacarosa, con producción de gas en algunos casos. En el análisis, la mayoría de las cepas evaluadas (1227 y 1291) coinciden con este perfil, aunque 1226, 1292 y 1293 presentan discrepancias. Similar al TSI, un KIA positivo sugiere fermentación de azúcares, y esta característica fue observada en las cepas 1227, 1291 y 1292, en concordancia con *Serratia* spp.

Serratia spp. puede presentar variabilidad en la prueba LIA, y los resultados obtenidos reflejan esta diversidad, con algunas cepas positivas (1291 y 1292) y otras negativas. En cuanto a la prueba de citrato, algunas especies como *Serratia marcescens* pueden utilizarlo como única fuente de carbono, en este estudio, las cepas 1227, 1291 y 1292 fueron citrato positivas, lo que es consistente con este perfil, mientras que 1226 y 1293 fueron negativas.

Serratia spp. es generalmente negativa en la producción de sulfuro de hidrógeno y en la prueba de indol (SIM), aunque algunas cepas pueden ser positivas. En este análisis, la cepa 1291 mostró un resultado positivo en SIM, mientras que las demás fueron negativas, lo que podría indicar variabilidad dentro del género. En cuanto a la ureasa, todos los resultados fueron negativos, excepto en la cepa 1292, que mostró actividad ureasa, lo cual es atípico para el género *Serratia*.

La prueba de DNAsa es característica del género *Serratia*, debido a que muchas cepas son DNAsa positivas, en este estudio, 1227, 1291, 1292 y 1293 mostraron actividad DNAsa, lo cual es consistente con el género, pero la cepa 1226 resultó negativa, lo que representa una discrepancia con el perfil esperado.

Tabla 1.- Perfil bioquímico de los aislados de *Serratia* spp.

	TSI	KIA	LIA	Citrato	SIM	Urea	Nut	DNA
1226	+	-	-	-	-	-	+	+
1227	+	+	-	+	-	-	+	+
1291	+	+	-	+	-	-	+	-
1292	-	+	-	+	-	-	+	+
1293	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Serratia</i> spp. esperado	+	+	Variable	+	+	-	+	+

TSI = Prueba Hierro de Triple Azucar, KIA = Prueba de Hierro de Kiegler, LIA = Prueba Lisina
Hierro Agar, SIM = Prueba Sulfuro-Indol-Movilidad

Los resultados de algunos aislados, con base en los resultados esperados reportados en la literatura (particularmente la cepa 1227 y 1291) corresponden con las características típicas del género *Serratia*. Por lo tanto, es posible que los aislados más parecidos no identificados pertenezcan a este género, sin embargo, no se puede hacer una caracterización solo con estos datos por lo que se recomienda realizar pruebas adicionales para una identificación concreta y precisa.

Objetivo 2.- Determinar el perfil fisiológico y bioquímico de los aislados de *Serratia* spp. con capacidad para antagonizar el crecimiento de hongos que afectan granos.

VII.3.- Producción de prodigiosina

La prodigiosina es un pigmento natural producido por ciertas bacterias que pertenecen al género *Serratia*, éste ha suscitado un interés significativo en el ámbito científico debido a sus notables propiedades antibacterianas. Sin embargo, la pigmentación sólo está presente en un pequeño porcentaje de cultivos aislados entre diferentes cepas de *S. marcescens*. La producción de pigmentos es muy variable entre especies y depende de muchos factores, como el tiempo de incubación, la de especie, el pH, la fuente de carbono y de nitrógeno (Araujo,

2010). El pigmento prodigiosina de *S. marcescens*, además de participar en la competencia de *Serratia* contra otras especies bacterianas, el compuesto y otras moléculas similares poseen efectos antimicrobianos, anticancerígenos e inmunomoduladores en mamíferos. Actualmente, se encuentra bajo investigación para su posible uso como agente terapéutico (Esteves, 2024).

Los medios de cultivo diferenciales y selectivos para el crecimiento del género *Serratia* y la producción de prodigiosina presentan varias opciones. En este ensayo, se seleccionaron cinco bacterias para determinar su capacidad productora de prodigiosina, cuya característica es típica de este género. Se utilizó un medio adicionado con glicerol y peptona, ambos compuestos favorecen la síntesis de esta molécula. De las cinco bacterias utilizadas: 1226, 1227, 1292, 1291 y *S. marcescens* (control positivo), todas son productoras de prodigiosina, a excepción de la cepa 1291, la cual produce poco o escasa prodigiosina (Fig. 1), cabe destacar que el control positivo (*S.m.*), el cual es un aislado clínico de *Serratia marcescens*, visiblemente produce grandes cantidades de este pigmento.



Fig. 1.- Producción de prodigiosina en medio peptona-glicerol. Se inoculó una gota de 25 µL de las bacterias de interés ajustadas a DO₆₀₀ de 1. Posterior a 5 días de incubación a TA, se observó la producción de prodigiosina.

El pigmento es característico de las bacterias del género *Serratia*, y su producción está influenciada por factores como la fuente de carbono y el pH del medio. Por ejemplo, Harned

reportó un rendimiento de 5 mg/L utilizando glucosa como fuente de carbono (Harned et al., 1954). En un estudio realizado por Cang et al., se obtuvo un rendimiento de 3000 mg/L en un medio con etanol como fuente de carbono (Cang et al., 2000). Por su parte, Giri et al. alcanzaron rendimientos máximos de 16,680 y 38,750 mg/L utilizando caldo de semillas de sésamo y maní, respectivamente, como medio de cultivo (Giri et al., 2004). Se ha reconocido que la especie *Serratia marcescens* es la que produce mayores cantidades de prodigiosina. En este contexto, la producción de este pigmento se empleó como un criterio para la identificación del género *Serratia* (Takaki et al., 2010). La investigación actual enfocada en la prodigiosina se ha centrado principalmente en tres aspectos: la optimización del aislamiento y la producción de cepas productoras de prodigiosina, la actividad y función biológica de la prodigiosina y el estudio de los mecanismos de síntesis y regulación de prodigiosina en cepas bacterianas. El mecanismo de síntesis y regulación de la prodigiosina es esencial para su producción y modificación efectivas y la base para sus aplicaciones futuras (Jia et al., 2021).

VII.4.- Producción de quitinasa

La quitinasa es una enzima sintetizada en diversos organismos, desde bacterias, plantas y hongos, ésta desempeña un papel fundamental en la degradación de quitina, un polisacárido estructural abundante en la naturaleza, principalmente presente en hongos e insectos. La capacidad de la quitinasa para catalizar la hidrólisis de la quitina la convierte en una herramienta prometedora en aplicaciones biotecnológicas. Debido a esto, se evaluó la colección de cepas de trabajo para determinar su capacidad de secretar quitinasa, considerando que las cepas de *S. marcescens* secretan varios factores de virulencia, como DNasa, lipasa, gelatinasa, hemolisina, proteasas y quitinasa. *S. marcescens* es una bacteria eficiente en la degradación de quitina, puede producir hasta cinco enzimas quitinolíticas diferentes después de ser inducida con quitina como fuente de carbono. En este ensayo, se seleccionaron las bacterias 1226, 1227, 1291, 1292, 1293, S.m y una cepa de *E. coli* como control negativo para evaluar la capacidad productora de quitinasas. Para ello se utilizó un medio de cultivo preparado a base de quitina.

La producción de quitinasas de las 7 bacterias analizadas se detectó por la producción de quitinasa por la presencia del halo de hidrólisis de quitina en las bacterias 1293, 1292, 1226,

1291, 1227 y el control S.m. (Fig. 2). Cabe destacar que el control negativo (*E. coli*) no produjo halo de hidrólisis, mientras que el control positivo, la cepa de *S. marcescens*, sí. El sistema quitinolítico descrito en *S. marcescens* es extracelular, está compuesto por una endoquitinasa, una quitobiasa y un factor (CH1) necesario para la hidrólisis de la quitina (Taira et al., 2001). Este sistema, al ser inducible por la presencia de quitina y secretado al medio, resulta de utilidad para llevar a cabo la degradación de hongos de interés (Taira et al., 2001). La quitinasa de *S. marcescens* ha mostrado características específicas y actividades sinérgicas en la degradación de la quitina (Horn et al., 2006). Además, *S. marcescens* ha sido reconocida como un microorganismo con alta actividad quitinasa, reportando valores de 35,2 U/mL (Cha et al., 2004), 61,01 U/mL (Green et al., 2005) y 77,3 U/mL (Parani et al., 2011). Los estudios realizados hasta ahora han demostrado que la maquinaria quitinolítica de *Serratia* spp. es eficiente a comparación de otros microorganismos quitinolíticos, siendo esta una herramienta potencial de aplicación biotecnológica (Dzakiyya et al., 2020).

El equipo de Taira demostró con un bioensayo que las quitinasas de clase I inhiben el alargamiento del micelio mejor que las quitinasas de clase II. Estos informes sugieren que el dominio de unión a quitina de la quitinasa de clase I contribuye en gran medida a la actividad antifúngica de esta enzima (Taira et al., 2001). En las paredes celulares de los hongos, a cierta distancia de la punta de las hifas, los polisacáridos se entrecruzan para formar fibras mixtas de quitina y glucano que a la vez pueden estar recubiertas por otros polisacáridos y capas de proteínas, con este ensayo se demostró que la quitinasa de clase I se unía a las puntas de las hifas, las paredes laterales y los septos, pero la clase II se unía solo a la punta de las hifas. Además, la clase I tenía una mayor afinidad por las paredes celulares que la clase II (Taira et al., 2001).

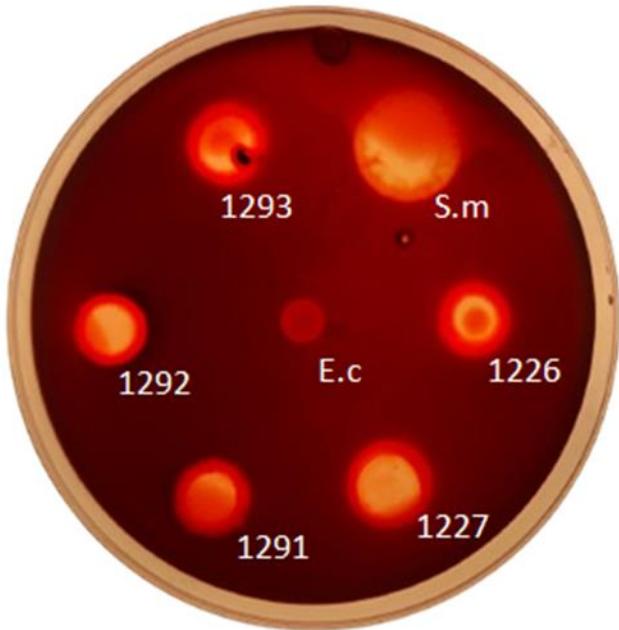


Fig. 2.- Hidrólisis de quitina.- Las bacterias analizadas se sembraron en medio supplementado con quitina. Posterior a 4 días de incubación a TA, se observó un halo de hidrólisis, el cual se reveló por la adición de Rojo Congo. Control positivo cepa Sm; *S. marcescens*, control negativo, *E. coli* cepa Top10 (E.c.). Las bacterias se crecieron en AN por 24 h/28 °C, 150 RPM, se ajustó la DO_{600nm} a 1.0, Se inocularon 20 µL de las bacterias excepto S.m. 5 µL.

La medición de los halos de hidrólisis mostró que prácticamente todas las bacterias probadas presentan un halo mayor que el producido por la cepa clínica, cabe mencionar que para este control se inoculó con la mitad de volumen en comparación con el resto de las cepas. Este dato indica que la colección de bacterias analizadas lleva a cabo de manera efectiva la degradación de este polisacárido y puede ser considerado como una herramienta de biocontrol (Fig. 3).

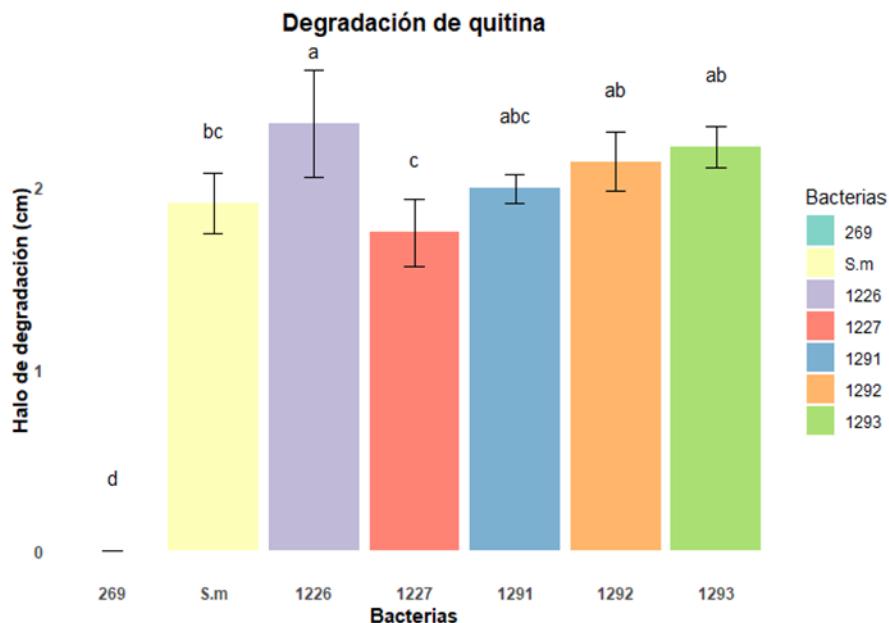


Fig. 3.- Degradación de quitina. Las bacterias indicadas se crecieron en agar suplementado con quitina coloidal (Fig. 2). La prueba se realizó por triplicado. Los datos obtenidos se analizaron con la prueba ANOVA. Las diferencias se visualizan con las letras de significancia obtenidas con la prueba post hoc de Tukey.

VII.5.- Producción de hemólisis

La hemólisis es un proceso biológico en el cual los glóbulos rojos presentes en la sangre se rompen, liberando su contenido intracelular, este fenómeno puede ocurrir de manera natural, por condiciones patológicas o como resultado de manipulaciones externas como la acción enzimática mediada por las hemolisinas producidas por algunas bacterias patógenas. (Palmer, 2001). *S. marcescens* se ha descrito que tiene actividad hemolítica, el único factor hemolítico y citotóxico de *S. marcescens* informado hasta el momento es la hemolisina ShlA. (Hertle, 2005). Este tipo de enzimas normalmente forma un homoolígómero integrado en su membrana celular objetivo, lo que cambia la permeabilidad celular y conduce a la muerte celular. Sin embargo, se ha demostrado que la hemolisina ShlA aumenta la permeabilidad de la membrana celular, pero no forma un oligómero lo cual implica un método de acción diferente al normalmente visto en este tipo de enzimas. (Shimuta, 2009) En este ensayo, se seleccionaron las bacterias 1226, 1227, 1291, 1292, 1293, y una cepa S.m en placas de agar sangre (sangre de borrego 5-10 %) para observar su capacidad hemolítica (Fig. 4).

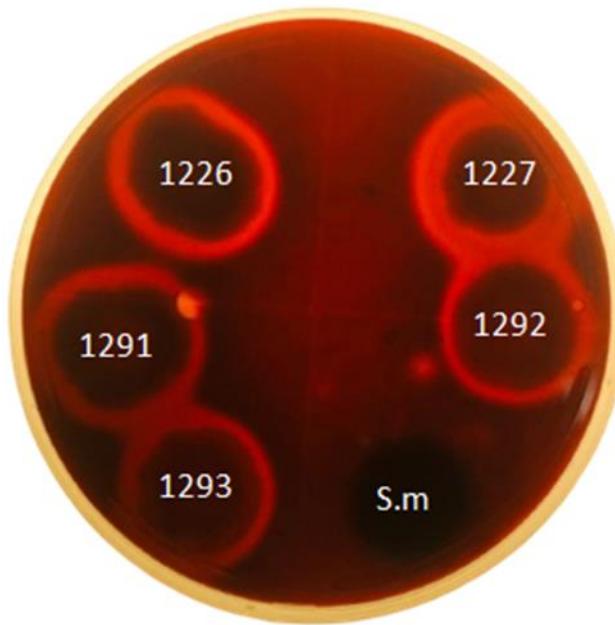


Fig. 4.- Hemólisis.- Para determinar la capacidad de producir hemólisis por parte del conjunto de bacterias utilizadas en este trabajo, se procedió a inocularlas en un medio de agar sangre (sangre de borrego 5-10 %). Posterior a 2 días de incubación a TA, se observaron los halos de hemólisis.

VII.6.- Producción de lipasa

La capacidad de *S. marcescens* para secretar lipasas al medio de cultivo ha despertado un creciente interés en la investigación biotecnológica debido a las diversas aplicaciones potenciales de estas enzimas. Las fosfolipasas catalizan la hidrólisis de los enlaces éster en los fosfolípidos, liberando ácidos grasos y otras moléculas.

La selección para este ensayo fue de seis bacterias: 1226, 1227, 1291, 1292, 1293 y S.m para determinar su capacidad para secretar lipasas. En todas las bacterias analizadas fue posible detectar la capacidad para hidrolizar fosfolípidos; en este caso se utilizó el Tween 80, dado que es posible observar el halo de hidrólisis alrededor de la colonia, indicando que esta enzima se secreta al medio de cultivo. Cabe destacar que cualitativamente el control de la cepa de *S. marcescens* produjo un halo equiparable a los aislados bacterianos analizados (Fig. 5).

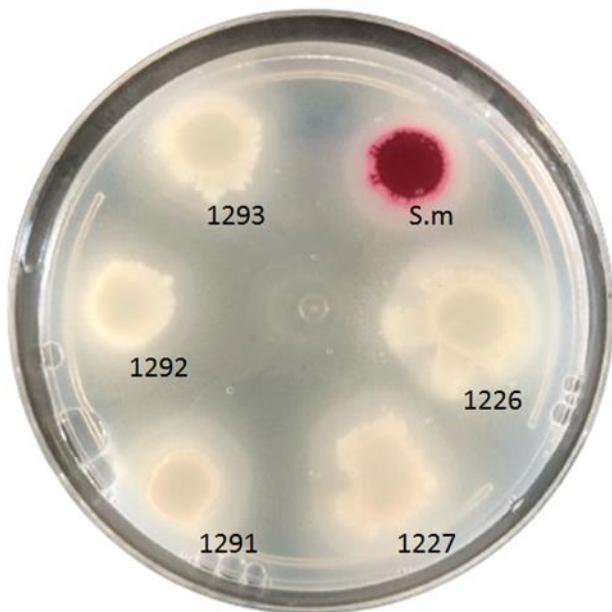


Fig. 5.- Producción de lipasas. Las bacterias utilizadas se inocularon en un medio con Tween 80. Se inoculó una gota de 15 µL de las bacterias ajustadas a DO₆₀₀ de 1. Posterior a 5 días de incubación a TA, se observaron halos alrededor de las colonias, este dato indica la capacidad de producir lipasas.

La literatura muestra que se ha reportado que una de las muchas proteínas secretadas de *S. marcescens* es la enzima fosfolipasa PhlA; se ha determinado la presencia de cuatro genes (*cyaA*, *crp*, *fliJ* y *fliP*) que están involucrados en la vía de secreción de PhlA (Anderson et al., 2017). La capacidad para hidrolizar fosfolípidos cobra importancia en el ámbito del control biológico de hongos, puesto que se ha demostrado su potencial antifúngico. En el experimento realizado por Quintero y colaboradores, se demostró que algunas fosfolipasas A2 presentes en el veneno de serpiente (svPLA2) y sus péptidos derivados exhiben actividad fungicida y bactericida. Estas fosfolipasas denominadas MTX-I y II mostraron un efecto inhibidor en el crecimiento de *E. coli* y de *C. albicans* (Quintero et al., 2015).

El mecanismo de acción implicado ha sido poco investigado, la toxicidad de MTX-I y II en bacterias; estos generan alteraciones de la membrana celular a través de residuos catiónicos y aminoácidos hidrofóbicos en el extremo C de la proteína (Quintero et al., 2015).

VII.7.- Producción de proteasas

Las proteasas son un grupo de enzimas que desempeñan un papel crucial en la degradación de proteínas, al hidrolizar proteínas, y ser un biopolímero abundante, lo que la hace valiosa en diversas industrias. Entre los microorganismos que producen proteasas, las cepas de *Serratia* spp. destacan por su capacidad para sintetizar esta enzima de manera eficiente. La actividad de las proteasas ha sido reconocida como un factor de virulencia en esta bacteria, pero enfocada como una característica importante en el control biológico, implica el hidrolizar proteínas del huésped (Petersen, 2014).

La selección fue de cinco bacterias en este ensayo, para determinar su capacidad productora de proteasas, cuya característica es típica de este género. Se utilizó un medio agar gelatina como sustrato de degradación. De las cinco bacterias utilizadas: 1226, 1227, 1292 y 1293, son productoras de proteasa, mientras que la 1291 no mostró secreción de proteasas (Fig. 6).

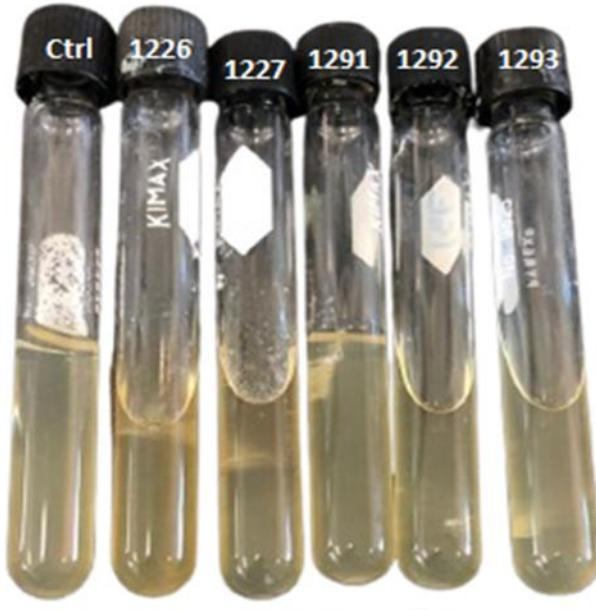


Fig. 6.- Producción de proteasas en medio gelatina. Se inoculó un raspado de las bacterias de interés. Posterior a 3 días de incubación a 28 °C, se observó la licuefacción de gelatina para una prueba positiva posterior a ser refrigerado el tubo.

S. marcescens es capaz de secretar múltiples tipos de proteasas, aunque la mayor parte de su actividad se debe a una metaloproteasa de 56 kDa denominada PrtA. Secretada por un sistema de transporte ABC LipBCD, en el caso de *S. marcescens*, la agresividad de la cepa está

directamente relacionada con la alta capacidad para producir la proteasa PrtA (Jupatanakul, 2020).

VII.8.- Síntesis de ácido cianhídrico

La capacidad de algunas bacterias para producir ácido cianhídrico (HCN) tiene varias aplicaciones potenciales, debido a que, por ejemplo, en el entorno natural, el HCN es una molécula volátil que actúa como un mecanismo de defensa para estas bacterias, ayudándolas a protegerse de microorganismos antagonistas y depredadores al inhibir el crecimiento de otras especies microbianas y patógenos. A su vez, el uso de bacterias productoras de HCN puede ser aprovechado para el control biológico de enfermedades de las plantas, debido a que el ácido cianhídrico puede reducir la población de hongos y bacterias dañinas en el suelo. Además, estas bacterias pueden ser empleadas en procesos de biorremediación para la degradación de compuestos tóxicos, al degradar ciertos residuos contaminantes en formas menos perjudiciales (Bhat, 2021).

Las bacterias 1226, 1227, 1291, 1292, 1293 y la bacteria 752 (control positivo) fueron utilizadas en este ensayo. De todas las bacterias empleadas, solo la 752 mostró un resultado positivo en el ensayo de síntesis de HCN (datos no mostrados), el cual se evidenció por una coloración roja-naranja del indicador (ácido pícrico-carbonato). Estos resultados indican que ninguna de las bacterias utilizadas en este estudio tiene la capacidad de producir ácido cianhídrico, lo que sugiere que este no es un mecanismo de inhibición que pudiera estar involucrado en la capacidad para controlar el crecimiento de hongos.

Tabla 2.- Características bioquímicas con actividad antagónica en aislados de *Serratia* spp.

	Hemólisis	Lipasa	Quitinasa	Gelatinasa	HCN
269	-	-	-	-	n.d.
S.m	-	-	+	-	n.d.
1226	+	+	+	+	-
1227	-	+	+	+	-
1291	+	-	+	-	-
1292	+	+	+	+	-
1293	+	-	+	-	-

HCN = Prueba de producción de ácido cianhídrico. S.m., *Serratia marcescens*. n.d., no determinada.

Los ensayos utilizaron medios específicos y se incorporaron 1 control positivo (S.m) y 1 control negativo (269) los cuales fueron proporcionados por el M. en C Daniel Mendoza para poder realizar los ensayos de forma completa.

De los resultados obtenidos (Tabla 2) la única bacteria utilizada en nuestro experimento que resultó negativo en la prueba de hemolisina fue la bacteria 1227 lo cual en concordante con el resultado obtenido del control positivo de *Serratia marcescens*, sin embargo ya considerando los resultados de las pruebas de lipasa, quitinasa y gelatinasa, las bacterias que más se asemejan a los resultados de nuestro control son las bacterias 1291 y 1293, lo cual nos indica que, de las pruebas el perfil bioquímico de nuestro aislado clínico de *Serratia* spp. y las bacterias 1291 y 1293 es similar, sin embargo, se requieren más pruebas y análisis para tener resultados más precisos de las bacterias no caracterizadas. Cabe mencionar que todas las bacterias, a excepción del control negativo 269, mostraron producción de quitinasa positivo.

Objetivo 3.- Evaluar la susceptibilidad a antibióticos de aislados de *Serratia* spp.
mediante pruebas de sensibilidad in vitro, con el fin de identificar patrones de resistencia y posibles mecanismos de tolerancia.

VII.9.- Perfil de resistencia a antibióticos

Las bacterias que habitan en la rizosfera son esenciales para la salud y el crecimiento de las plantas, debido a que facilitan el suministro de nutrientes fundamentales y favorecen el desarrollo de varios cultivos. Una de las características más relevantes de estas bacterias es su capacidad para resistir antibióticos, lo que les permite desempeñar un papel beneficioso en los ambientes agrícolas, reduciendo los efectos adversos de ciertos tratamientos químicos. Además, en un entorno donde los nutrientes pueden ser limitados, las bacterias enfrentan una competencia constante con otros microorganismos. Los mecanismos de resistencia que poseen les brindan una ventaja competitiva, favoreciendo su supervivencia. Esto les permite seguir cumpliendo su función en la rizosfera, promoviendo la salud del suelo y mejorando la productividad de los cultivos (Habboush et al., 2023).

Los análisis de este perfil se realizaron utilizando diferentes tipos de antibióticos en esta prueba para observar el espectro de resistencia de las bacterias a utilizar en este proyecto: Se incluyeron las cefalosporinas de tercera generación: ceftazidima y cefotaxima, la cefoxitina de segunda generación y la cefazolina de primera generación, estas inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana al unirse a las transpeptidasas. En el caso de la estreptomicina, es un aminoglucósido que inhibe la síntesis de proteínas bacterianas al unirse irreversiblemente a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano.

Los resultados obtenidos muestran que de las cepas de *Serratia* spp. manejadas en este proyecto, todas las cepas son resistentes a cefotaxima y ceftazidima, las cuales son cefalosporinas de tercera generación, caso contrario, todas las cepas de *Serratia* spp. manejadas en este proyecto fueron susceptibles a los antibióticos estreptomicina y cefazolina, los cuales son aminoglucosido y cefalosporina de primera generación respectivamente.

El estudio realizado por Cosimato et al. analizó el perfil de resistencia a antibióticos de *S. marcescens* y se compararon los resultados con los resultados obtenidos de un estudio previo de Simsek et al. En el trabajo de Simsek, se encontró que las cepas aisladas de *Serratia* spp. presentaron sensibilidad a amikacina (95,7 %), ciprofloxacina (91,5 %) y gentamicina (82,2

%), destacando que tanto la amikacina como la gentamicina pertenecen al grupo de los aminoglucósidos (Simsek et al., 2019). En su estudio, Cosimato observó que la resistencia a la amikacina era baja (4,4 %), a la ciprofloxacina era del 20,7 % y a la gentamicina del 6,8 % (Cosimato et al., 2024). Otros estudios también han señalado la resistencia de las cepas de *S. marcescens* a los antibióticos betalactámicos, en particular a las cefalosporinas (Cosimato et al., 2024).

El estudio de Simsek et al., mostró que los aislados clínicos de *Serratia* spp. presentaron una alta resistencia a ceftriaxona, ceftazidima y piperacilina, sin embargo, la cefotaxima y la gentamicina fueron los antibióticos más eficaces y adecuados para el tratamiento, en el estudio de Cosimato encontraron que el antibiótico ceftazidima, de acuerdo con el estudio, tiene una tasa de resistencia del 20,2 % (Cosimato et al., 2024, Simsek et al., 2019).

Tabla 3.- Halo de inhibición de crecimiento detectado en las cepas de *Serratia* spp

	1226	1227	1291	1292	1293
Ceftazidima	+	+	+	+	+
Cefotaxima	+	+	+	+	+
Mitoxantrona	-	+	-	-	-
Cefoxitina	+	-	+	-	+
Estreptomicina	-	-	-	-	-
Cefazolina	-	-	-	-	-

	1226	1227	1291	1292	1293
Ceftazidima	4 mm	1 mm	6 mm	5 mm	0.05 mm
Cefotaxima	3 mm	4 mm	5 mm	2 mm	3 mm
Metoxazolina	-	3 mm	-	-	-
Cefoxitina	2 mm	-	3.2 mm	-	0.05 mm
Streptomicina	-	-	-	-	-
Cefazolina	-	-	-	-	-

Tamaño de halo inhibitorio formado en cada cepa

Los resultados obtenidos (Tabla 3) muestran una alta resistencia de las cepas del género *Serratia* spp. a los antibióticos evaluados, particularmente a ceftazidima y cefotaxima, todas las cepas analizadas mostraron algún grado de resistencia a estos antibióticos, aunque se observaron diferencias en los halos de inhibición, lo que sugiere una variabilidad en la sensibilidad de las cepas. Por ejemplo, la cepa 1291 mostró el halo de inhibición más grande para ceftazidima (6 mm), mientras que la cepa 1293 fue la más resistente (0.05 mm). Por otro lado, los antibióticos estreptomicina y cefazolina no mostraron halos de inhibición en ninguna de las cepas, lo que indica una resistencia completa de las bacterias a estos compuestos.

Los resultados con otros antibióticos muestran variación, por ejemplo, la cefoxitina y la metoxazolina mostraron cierto grado de eficacia, aunque con una variabilidad considerable entre las cepas, la cepa 1291 presentó un halo de inhibición de 3.2 mm con cefoxitina, mientras que la cepa 1293 apenas mostró inhibición (0.05 mm), la metoxazolina solo generó un halo en la cepa 1227 (3 mm), lo que indica una actividad limitada.

El análisis general de los resultados indica que la mayoría de las cepas presentan una resistencia significativa a los antibióticos evaluados. Sin embargo, la cepa 1292 demostró una mayor susceptibilidad a cuatro de los seis antibióticos analizados, lo que podría sugerir una menor expresión de mecanismos de resistencia en esta cepa específica.

Objetivo 4.- Determinar el efecto antagónico de *Serratia* spp. de manera individual y en consorcio contra hongos que contaminan granos.

VII.10.- Pruebas de compatibilidad para la formación de consorcios bacterianos

La compatibilidad entre las bacterias presenta una oportunidad, debido a que indica la posible coexistencia de dos o más microorganismos en un mismo nicho. La ventaja que otorga es que se pueden obtener metabolitos o subproductos sintetizados por los dos microorganismos al mismo tiempo, de igual manera la síntesis se potencia debido a la presencia de otros microorganismos (Fuentes, 2019).

Los resultados obtenidos muestran que las bacterias 1291, 1292 y 1293 son incompatibles con las otras bacterias, mientras que la bacteria 1226 muestra compatibilidad con el resto de las bacterias del grupo. Considerando estos resultados se optó por analizar al consorcio

formado por las bacterias 1226 y 1227 para experimentos posteriores, debido a que se buscaba observar si se presentaba un efecto sinérgico entre bacterias compatibles solo se optó por generar un consorcio el cual fue seleccionado con base en su efectividad para degradación de quitina (Tabla 3).

Tabla 4.- Ensayo de compatibilidad entre aislados de *Serratia* spp.

	1226	1227	1291	1292	1293
1226					
1227					
1291					
1292					
1293					

Verde: sin inhibición, reacción compatible; Rojo: inhibición, reacción no compatible.

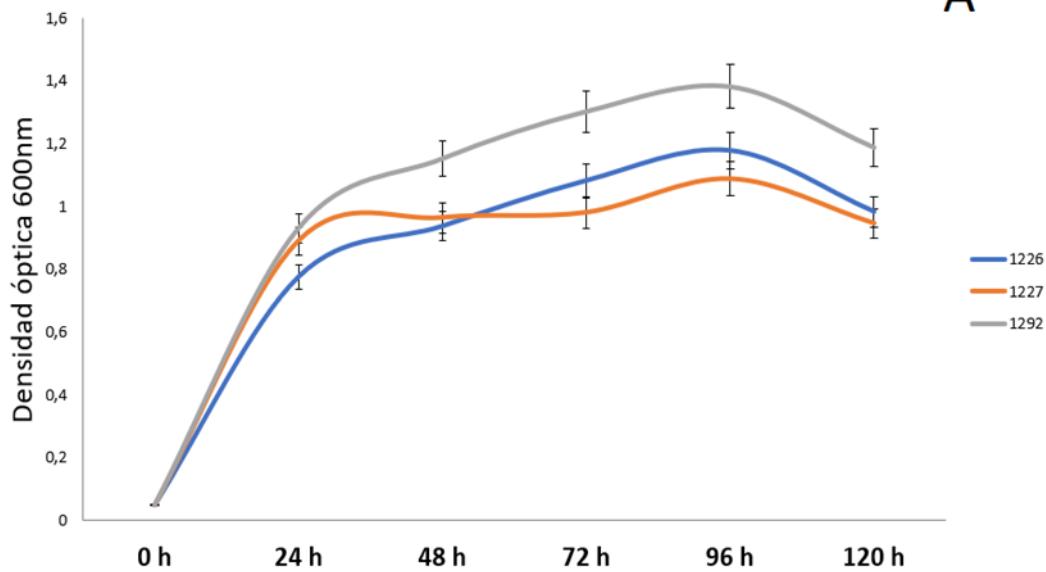
Los consorcios muestran interacciones positivas en conjunto entre las especies pueden incluir la producción de compuestos que promueven el crecimiento de las plantas, la fijación de nitrógeno atmosférico, la solubilización de fosfatos y el efecto antagónico contra agentes fitopatógenos. Además, la diversidad dentro de un consorcio bacteriano puede aumentar su estabilidad y adaptabilidad frente a condiciones bióticas o abióticas adversas. Actualmente, los consorcios bacterianos representan herramientas biotecnológicas en el sector agroindustrial para promover el crecimiento de los cultivos, mejorar la salud del suelo y aumentar la resistencia a enfermedades de las plantas (Lahiri et al., 2022).

VII.11.- Curvas de crecimiento

La curva de crecimiento para las bacterias 1226, 1227 y 1292 se realizó con la finalidad de conocer su comportamiento en dos temperaturas, a 28 y 37 °C, para ello se utilizó CN. El crecimiento de las tres bacterias fue mejor a 28 °C, en este caso la fase estacionaria se alcanzó entre las 72 y 96 h (Fig. 7). Este dato es importante, puesto que los metabolitos secundarios se acumulan en esta etapa de crecimiento (Clements et al., 2019).

Curva de crecimiento *Serratia* spp 28°C

A



Curva de crecimiento *Serratia* spp 37°C

B

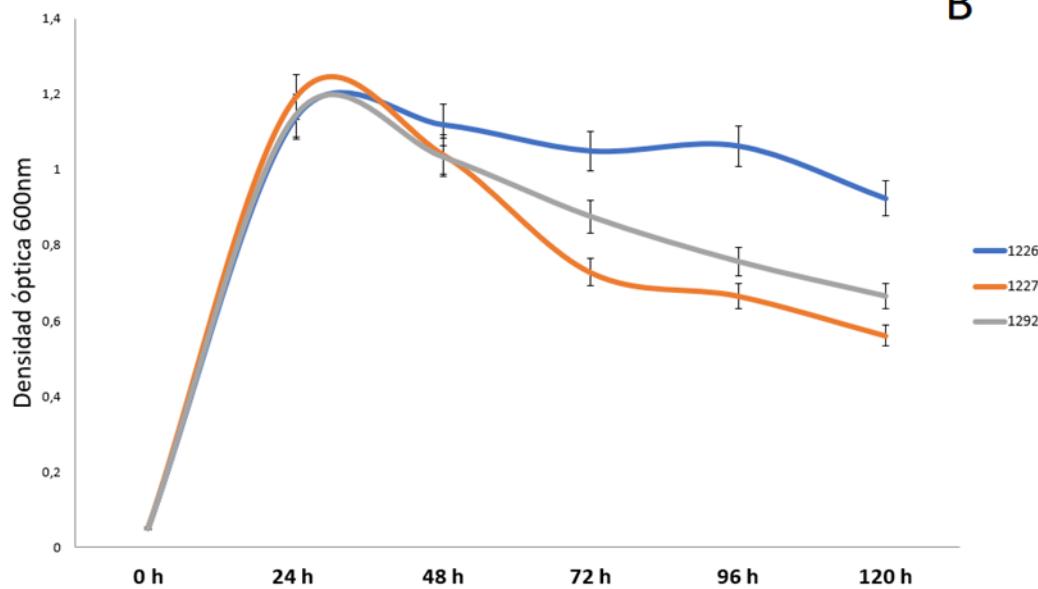


Fig. 7.- Curva de crecimiento de las cepas 1226, 1227, 1292. Se incubaron las bacterias por 120 h en caldo nutritivo. Se tomaron alícuotas cada 24 h para medir la DO₆₀₀. La prueba se realizó por triplicado y se calculó la desviación estándar. Panel A, a 28 °C, panel B a 37 °C.

La temperatura de 37 °C en el mismo medio de cultivo resultó no ser adecuada para estas bacterias, puesto que a las 24 h de incubación se observó su crecimiento óptimo, para

comenzar a descender drásticamente, este comportamiento se observó en las tres bacterias analizadas (Fig. 7). Con este resultado, los cultivos de las bacterias, así como de los consorcios, se optimizó su cultivo durante 96 h para potenciar la producción de metabolitos secundarios.

El ensayo realizado por Decker et al., tuvo como objetivo analizar el perfil metabólico secundario de algunas cepas de *S. marcenses* utilizando UPLC-MSE. Dichos metabolitos mostraron actividad antibacteriana y antifúngica, las condiciones de incubación fueron de 48 a 96 h, dato que concuerda con la etapa estacionaria mostrada por las bacterias incluídas en este estudio (Clements y col., 2019). En el estudio mencionado se utilizó la cepa NP10 de *S. marcescens* que produjo diferentes tipos de “stephensioides” (Decker et al., 2023, Clements et al., 2019). De igual manera, la cepa B8 de *S. marcescens* produjo metabolitos secundarios con actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos, dichos metabolitos se obtuvieron posterior a los 5 días de incubación tanto en cultivo sumergido como en agar (Mendonça et al., 2023). Con estos resultados y con los obtenidos en este ensayo, se determinó un tiempo de incubación de 4 días para que las cepas produjeran los metabolitos que posteriormente se utilizarán en ensayos de antagonismo, así como para determinar su efecto promotor de crecimiento en planta.

VII.12.- Efecto de los metabolitos bacterianos secretados al medio de cultivo contra hongos.

La capacidad de inhibir el crecimiento por parte de las bacterias por la secreción de metabolitos al medio de cultivo se determinó con la prueba de antibiosis donde se analizó el efecto que se produce cuando una especie produce una sustancia nociva para otra especie que compite con ella. Posterior a crecer las bacterias sobre una película de celofán en PDA, se retiró el celofán; se obtiene así una placa suplementada con metabolitos de distinta índole. A este tipo de ensayos se les hace referencia como “caja envenenada”. En este caso encontramos que los hongos utilizados en este ensayo (1274, 1262, 1284, 1264, 1283, 1276 y 1270) presentaron diferentes perfiles de retardo en el crecimiento frente a los metabolitos presentes en el medio. Los resultados observados de este ensayo muestran que, en comparación con los controles, los metabolitos bacterianos tuvieron un efecto en el desarrollo de todos los hongos utilizados en el ensayo (Fig. 8), lo cual confirma que todas las cepas de

Serratia spp. utilizadas en este proyecto producen compuestos antagónicos para el desarrollo de los hongos. Los hongos que mostraron mayor resistencia fueron: 1274, 1284 y 1283, mientras que la bacteria que mostró menos efectividad en el ensayo fue la bacteria 1292.

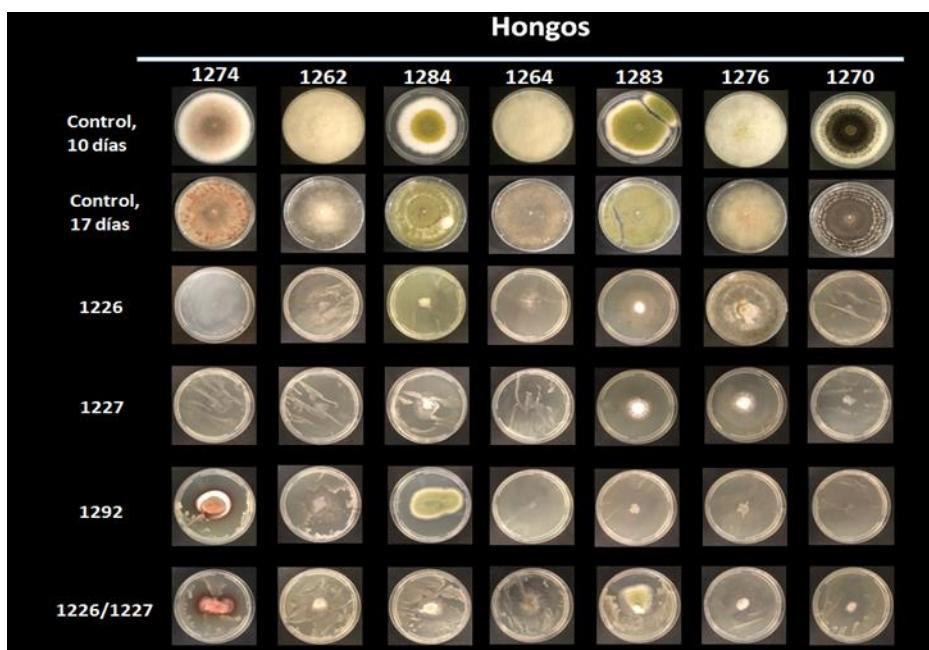


Fig. 8 .- Antagonismo de metabolitos generados por cepas de *Serratia* spp. contra hongos que afectan granos. Los hongos indicados se retaron con los metabolitos secundarios producidos por las bacterias en PDA, como control se utilizaron cajas de PDA con disco de celofán sin bacteria. Las placas se inocularon con 10,000 esporas. Posterior a 5 días de incubación a 28 °C, se retiró el disco de celofán obteniendo el medio PDA suplementado con los metabolitos producidos por las bacterias. Las cajas se inocularon con 10,000 esporas y se incubaron a TA por una semana.

VII.13.- Degradación de exoesqueleto de camarón

El exoesqueleto de camarón es un subproducto abundante de la industria camaronera; normalmente es desecharido debido a que no es comestible, sin embargo, tiene un gran potencial para su reutilización, en lugar de ser descartado como residuo, el exoesqueleto puede ser procesado para extraer quitina y quitosano, compuestos de alto valor agregado que tienen aplicaciones en la medicina, agricultura, biotecnología y tratamiento de aguas. El aprovechamiento de estos desechos no solo reduce el impacto ambiental asociado con la acumulación de residuos, sino que también crea nuevas oportunidades económicas para la industria camaronera (Robles, 2018). Integrar estos subproductos en la economía circular contribuye a un uso más eficiente de los recursos y promueve un modelo económico más

sostenible y resiliente, además de representar menos contaminación al ambiente (Robles, 2018).

El exoesqueleto de camarón fue seleccionado como un aditivo a nuestro medio de cultivo para favorecer la producción de quitinasas. Al tener un medio adicionado con camarón, realizamos una prueba de degradación de exoesqueleto de camarón con las bacterias 1226, 1227, 1292, el consorcio de interés y una cepa de *E. coli* (269), la cual manejamos como control negativo para observar la eficacia del perfil degradativo. Una vez analizados los datos resultantes del perfil degradativo, se determinó que la bacteria 1226 degradó en menor porcentaje el exoesqueleto, y que las bacterias 1227, la 1292 y el consorcio, presentan un mejor perfil degradativo, mientras que el control (*E. coli*) presentó 0% de degradación (Fig. 9).

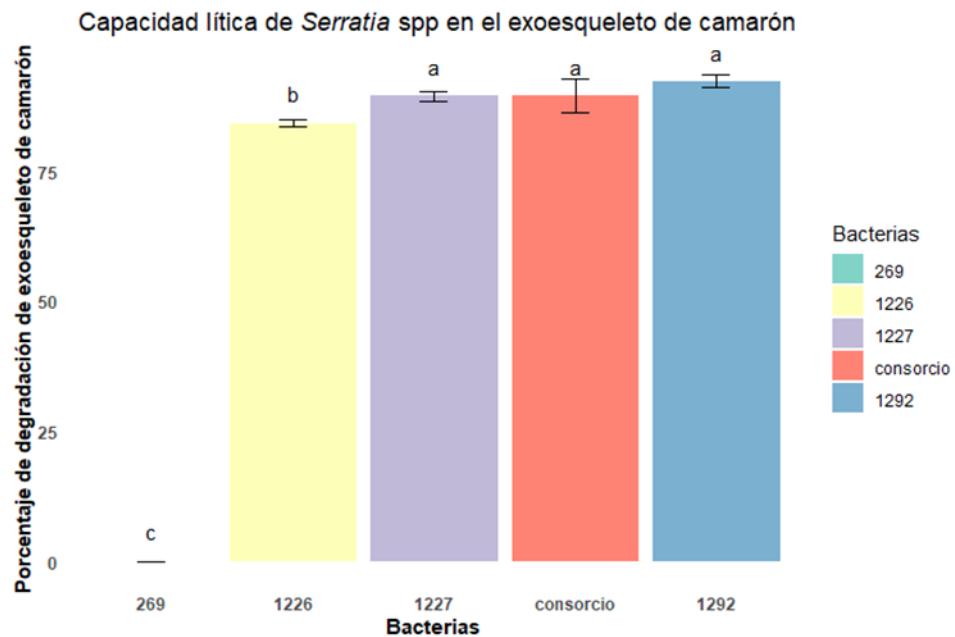


Fig 9.- Capacidad lítica de *Serratia* spp. en el exoesqueleto de camarón. El medio mínimo se suplementó con exoesqueleto de camarón como fuente de carbono, se inocularon las bacterias 269, 1226, 1227, 1292, 269, y el consorcio formado de las bacterias 1226 y 1227. El cultivo se incubó por una semana a 28 °C en agitación a 150 rpm. Posterior a una semana de incubación, el porcentaje de degradación se determinó por diferencia de peso. El ensayo se realizó por triplicado.

VII.14.- Cultivo de hongos en medio enriquecido con quitinasas

La capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos por parte de las bacterias debido a la acción de las quitinasas secretadas al medio de cultivo se determinó preparando un medio mínimo suplementado con exoesqueleto de camarón (Materiales y métodos sección 13), donde posteriormente las células se eliminaron por centrifugación a 8000 rpm/10 min. El extracto enriquecido en quitinasas y otros metabolitos, se utilizó para preparar el medio de cultivo. Como control se utilizó el extracto libre de células obtenido a partir de un cultivo de *Escherichia coli*. En el centro de la placa se inoculó un disco de micelio del hongo a probar. Se registraron resultados a 10 días de incubación a 28 °C, cuando la caja control del hongo cubrió la superficie de la caja en su totalidad. En este caso encontramos que de los hongos utilizados en este ensayo (1262, 1264, 1274, 1278) se presentaron diferentes perfiles de inhibición en el crecimiento frente a las quitinasas, así como metabolitos secundarios secretados al medio de cultivo. Los resultados observados de este ensayo muestran que, en comparación con los controles, el conjunto de moléculas bacterianas sí tuvo un efecto en el crecimiento de todos los hongos utilizados en el ensayo (Fig. 10), lo cual confirma que todas las cepas de *Serratia* spp. utilizadas en este proyecto producen compuestos antagónicos para el desarrollo de los hongos. Los hongos que mostraron mayor resistencia fueron: 1274, 1264 y 1278, mientras que la bacteria que mostró menos efectividad en el ensayo fue la bacteria 1227. Es importante destacar el efecto aditivo conseguido en el consorcio 1226 y 1227. Cabe mencionar que, además del efecto observado en el crecimiento radial de la colonia, también se detectaron cambios en la coloración de la colonia, así como en la producción de esporas, determinado de manera cualitativa.

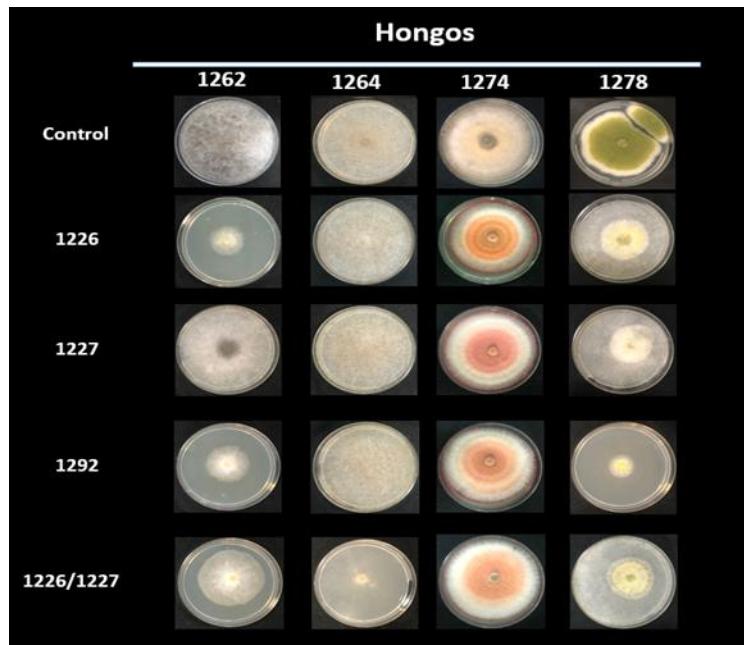


Fig. 10.- Antagonismo de cepas de *Serratia* spp. contra hongos que afectan granos. Los hongos indicados se retaron con el extracto libre de células producidas por las bacterias indicadas, como control se utilizaron cajas de PDA con extracto libre de células producido por *E. coli*. Las placas se inocularon con disco de micelio. Fotografía posterior a 10 días de incubación a 28 °C. El ensayo se realizó por duplicado.

El caso siguiente muestra cómo se utilizó la misma metodología con diferentes hongos, encontramos que los hongos utilizados en este ensayo (1270 y 1284) presentaron diferencia en el desarrollo durante su crecimiento en medio suplementado con moléculas producidas por las bacterias (quitinasas, así como metabolitos secundarios). Los resultados observados de este ensayo muestran que, en comparación con los controles, sí hay un efecto en el desarrollo de todos los hongos utilizados en el ensayo (Fig. 11). Sin embargo, en estos 2 casos, se observó también la formación incrementada de conidios, principalmente en el hongo 1284, lo cual confirma que las cepas de *Serratia* spp. utilizadas en este proyecto producen compuestos antagónicos para el desarrollo de los hongos y pueden influenciar la conidicación. Este aspecto es importante de analizar en hongos benéficos, en el cual la producción de conidias es un beneficio, como es el caso de *Trichoderma* (Narváez, 2023).

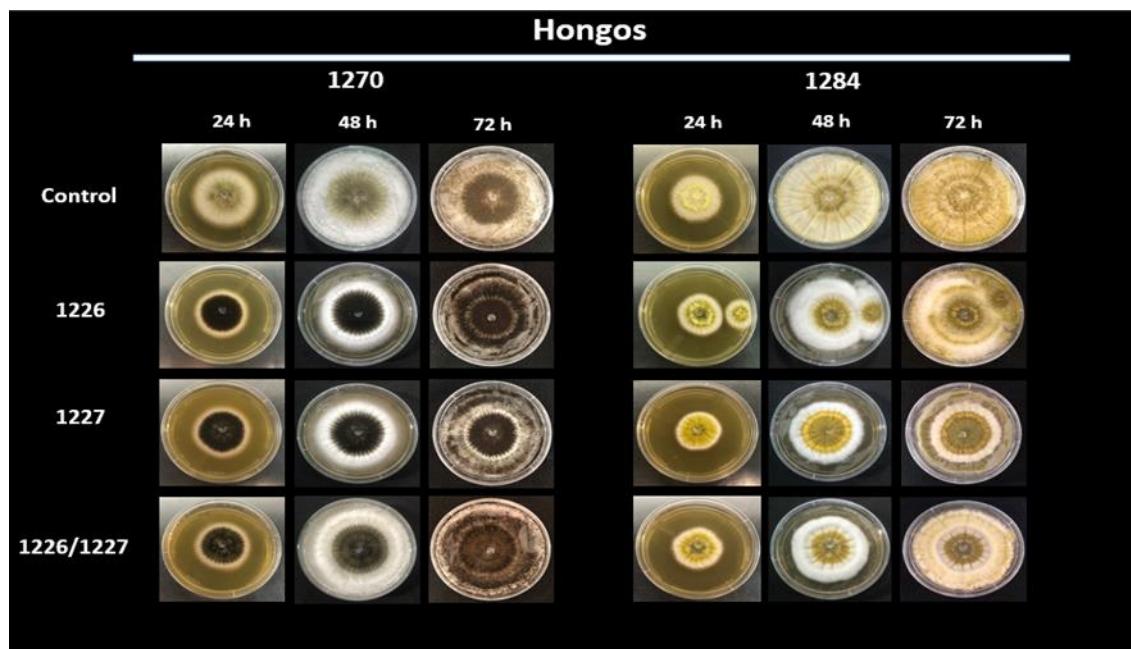


Fig. 11.- Antagonismo de cepas de *Serratia* spp. contra hongos que afectan granos. Los hongos indicados se retaron con quitinasas producidas por las bacterias en agar PDA 2X que se adicionó con quitinasas, como control se utilizaron cajas de PDA fresco. Las placas se inocularon con un disco de micelio. Fotografías tomadas a partir de 24 h de incubación a 28 °C. El ensayo se realizó por duplicado.

Objetivo 5.- Evaluar la capacidad de tolerar el estrés salino en los aislados de *Serratia* spp.

VII.15.- Efecto del estrés salino y osmótico en el crecimiento bacteriano

El estrés salino es una condición que supone una alteración tal que las bacterias han desarrollado la capacidad para adaptarse y sobrevivir en condiciones de alta salinidad, lo cual puede afectar negativamente su crecimiento y metabolismo. La exposición a altos niveles de sal induce un estrés osmótico, que obliga a las bacterias a implementar diversas estrategias para mantener la homeostasis celular, por ejemplo, *Halobacterium salinarum*, una bacteria extremófila halófila, ha desarrollado mecanismos especializados como la acumulación de iones y solutos compatibles para contrarrestar la alta concentración de sal en su entorno (Vauclare, 2015). De manera similar, *Bacillus cereus*, conocido por su capacidad para tolerar salinidad moderada, ajusta su composición lipídica de la membrana celular para preservar su integridad y funcionalidad (Besten, 2006). *S. marcescens* puede tolerar y prosperar en

ambientes salinos al regular activamente sus mecanismos de transporte iónico y sintetizar osmoprotectores que equilibran la presión osmótica interna. Estos mecanismos de adaptación permiten a las bacterias prosperar en ambientes salinos extremos (Ketola, 2014).

Los resultados muestran que las bacterias presentan una respuesta positiva a la presencia de las sales utilizadas, como agentes de estrés salino se emplearon NaCl y KCl; además se utilizó el PEG como agente de estrés osmótico, este reactivo es utilizado en plantas para estudiar el proceso de estrés por sequía. En el caso del NaCl, las bacterias crecieron bien al inocularse e incubarse en un caldo adicionado con 1 M de NaCl; sin embargo, a concentraciones de 1.5 M y 2 M de NaCl adicionado en el medio, su crecimiento se observó claramente afectado (Figura 11). Los datos de los diferentes ensayos de estrés osmótico realizados en este experimento junto con lo reportado por Hamane y Jagtap muestran diferentes concentraciones de salinidad analizadas en cada ensayo, pero corroboran que las bacterias del género *Serratia* presentan un buen perfil de resistencia a estrés salino en comparación con otras bacterias Gram negativas (Hamane et al., 2023; Jagtap et al., 2023).

Los resultados al ser analizados muestran que, en las diferentes condiciones de estrés analizadas, en las mayores concentraciones de los 3 tratamientos se presenta la mayor inhibición de crecimiento bacteriano. En el caso del NaCl, a partir de las concentraciones 1.5 M y 2 M, se observó un gran decremento en el crecimiento de ambas bacterias. Cabe mencionar que comparando la bacteria en control con la concentración 1 M hay una diferencia entre la bacteria 1226 y 1227, la bacteria 1226 parece verse favorecida con la concentración 1 M de NaCl, debido a que las lecturas indicaron mayor concentración bacteriana con este tratamiento a comparación del control. En el caso de la bacteria 1227, ocurrió lo opuesto: la concentración 1 M decrementó el crecimiento de la bacteria a comparación del control, lo cual era el resultado esperado (Fig. 12).

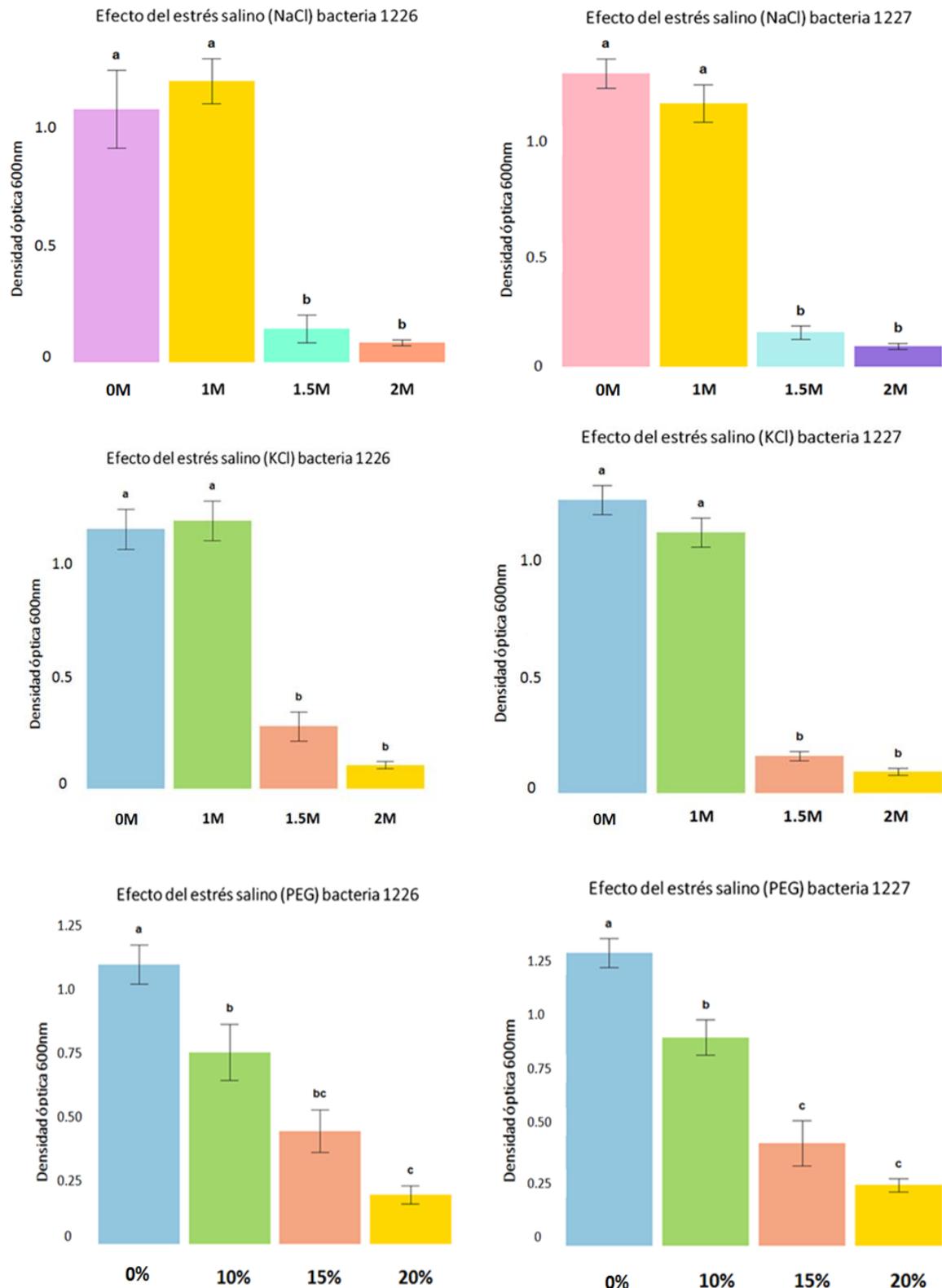


Fig 12.- Efecto del estrés salino y osmótico en las bacterias 1226 y 1227. Las bacterias crecieron en diferentes cantidades de NaCl, KCl, y Polietilenglicol (PEG). Los cultivos se incubaron en agitación durante 96 h, se midió la DO₆₀₀ de los cultivos intervalos de 24 h. El ensayo se realizó por triplicado.

El resultado del KCl, de igual forma que en el ensayo realizado con NaCl, se observa que en mayores concentraciones el efecto inhibitorio; sin embargo, el crecimiento bacteriano de la cepa 1226 es más vulnerable al efecto del KCl que la cepa 1227, debido a que en promedio el decremento es más notorio en la cepa 1226. El ensayo realizado con PEG mostró resultados similares; a mayores concentraciones de PEG, disminuyó significativamente el crecimiento bacteriano de las cepas 1226 y 1227.

El estudio de Kulkova et al., confirmó el potencial de las cepas de *Serratia* spp. como biofertilizantes capaces de promover el crecimiento de las plantas, al mismo tiempo que mejoran diversos parámetros fisiológicos, bioquímicos y moleculares en condiciones de estrés salino. No obstante, los autores consideran necesario llevar a cabo más investigaciones sobre las cepas de *Serratia* spp., debido a que estas han demostrado tolerancia a la salinidad en un rango de 0.993 a 1.71 M de NaCl, además de un significativo potencial para favorecer el crecimiento vegetal en condiciones normales (Hamane et al., 2023, Jagtap et al., 2023, Kulkova et al., 2024).

El experimento realizado por Palamiyandi, se enfocó en probar cepas de *Streptomyces* para determinar su tolerancia a diversas concentraciones de NaCl: 0.171 M, 0.342 M, 0.685 M y 1.027 M de NaCl suplementado en medio agar de Bennett, posteriormente, observaron que las cepas PGPA39 y PGPA42 toleraron hasta 1.026 M de NaCl, mientras que la cepa PGPA36 fue capaz de tolerar NaCl 1.027 M, mientras que el resto de las otras cepas toleraron solo NaCl a 0.342 M (Palamiyandi, 2014).

La cepa PGPA39 utilizada en el estudio de Palamiyandi promovió el crecimiento de plantas de tomate a 0.180 M de NaCl, concentración que afecta significativamente el desarrollo de las plantas. Es importante resaltar que, en condiciones de cultivo axénico retado con NaCl, la bacteria es capaz de crecer a 1 M (Palamiyandi, 2014). Esta actividad de la bacteria podría deberse principalmente a su tolerancia al NaCl hasta 1 M.

Los mecanismos principales de *Serratia* spp. muestran algunos que pueden promover el crecimiento de las plantas en condiciones normales, de estrés salino y de sequía son: producción de fitohormonas, producción de ACC desaminasa, facilitación de la disponibilidad de nutrientes (solubilización de P o Zn), neutralizar especies reactivas de oxígeno (ROS), producción de osmolitos, síntesis de exopolisacáridos (EPS), homeostasis de iones en plantas, inducción de la expresión de genes que codifican la tolerancia al estrés por sal y sequía (Saikia et al., 2018; Mahdi et al., 2021; Nordstedt y Jones, 2021; Ahmad et al., 2022).

El potencial papel de cepas del género *Serratia* en la solubilización de nutrientes ha sido descrita por muchos trabajos; por ejemplo, se observó un aumento estadísticamente significativo en el contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en plantas de maíz después de la inoculación con *Serratia* spp. QW45 (Zhang et al., 2018). También se observó estimulación del crecimiento de las plantas mediante la solubilización de fosfatos con cepas como *Serratia* S2, *S. marcescens* CDP-13 (Dogra et al., 2019), *Serratia* sp KPS-14 (Hanif et al., 2020), *Serratia* sp. LX2 (Guo et al., 2021) y *S. plymuthica* BMA1 (Borgi et al., 2020).

La problemática presente es que *Serratia* spp. en comparación con la mayoría de los promotores bacterianos del crecimiento de las plantas, no se ha estudiado tan exhaustivamente, particularmente en lo que respecta a su potencial para promover el crecimiento de las plantas mediante la modulación del suelo o la microbiota de las plantas (Kulkova, 2024).

Objetivo 6.- Evaluar el efecto promotor de crecimiento por parte de los aislados de *Serratia* spp. en planta de jitomate sometido a estrés salino.

VII.16.- Efecto protector de *Serratia* spp. contra el estrés salino y osmótico en el desarrollo de plantas de jitomate.

La salinidad en el suelo tiene un impacto significativo en el desarrollo de las plantas; altos niveles de sal pueden reducir la disponibilidad de agua y la solubilidad de nutrientes esenciales, causando estrés hídrico y disminución del crecimiento. La acumulación de sales altera el equilibrio osmótico, lo que puede llevar a la deshidratación celular y la muerte de las plantas, lo cual representa un riesgo, debido a que en áreas utilizadas para agricultura se

llegan a emplear químicos para el manejo de plagas, enriquecimiento del medio, ajuste de acidez, actividades que causan acumulamiento de sales en el suelo (SADR, 2021).

El año 2021 fue el año donde la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural de México llevó a cabo un análisis sobre la calidad del suelo, en el cual se observó que 3.43 millones de hectáreas presentaron una afectación leve por sodio, mientras que 2.43 millones de hectáreas fueron afectadas levemente por salinidad. Ambas afectaciones representaron el 60% de la superficie agrícola de riego (SADR, 2021). A una profundidad de 30-100 cm, se registró un aumento de la presencia de sales en 3.37 millones de hectáreas de tierras de riego, además, se reportaron 1.27 millones de hectáreas con salinidad moderada, 183,263 hectáreas con sodicidad moderada y 518,567 hectáreas con condiciones salino-sódicas. La salinidad en las áreas más profundas (30-100 cm) aumentó en 2.15 millones de hectáreas (SADR, 2021).

El enfoque fue analizar el efecto que puedan ejercer las bacterias sujeto de estudio en cuanto a la protección contra el estrés salino. Para ello se trajeron plantas de jitomate bajo el siguiente esquema: se formaron 4 grupos de 15 plantas con un tratamiento diferente: 1 agua normal, 2 consorcio bacteriano, 3 consorcio bacteriano y NaCl, 4 adición de NaCl (Materiales y Métodos punto 18). Posterior a 75 días del tratamiento se analizaron los resultados (Fig. 13).



Fig. 13.- Plantas de jitomate sometidas a estrés salino. Las plantas de jitomate se sometieron a diferentes condiciones. A.- Agua corriente, B.- Consorcio bacteriano, C.- Consorcio bacteriano y estrés salino, D.- Estrés salino. El experimento se terminó a los 75 días.

Las plantas tratadas fueron medidas en varios parámetros: longitud de tallo, número de hojas y longitud de raíz. En cuanto a la longitud de tallo, se observó que las plantas pertenecientes al bloque tratado con el consorcio bacteriano presentaron mayor longitud de tallo en promedio, a diferencia de las plantas tratadas solamente con solución de NaCl, las cuales presentaron la longitud de tallos más reducida de los 4 grupos (Fig. 14).

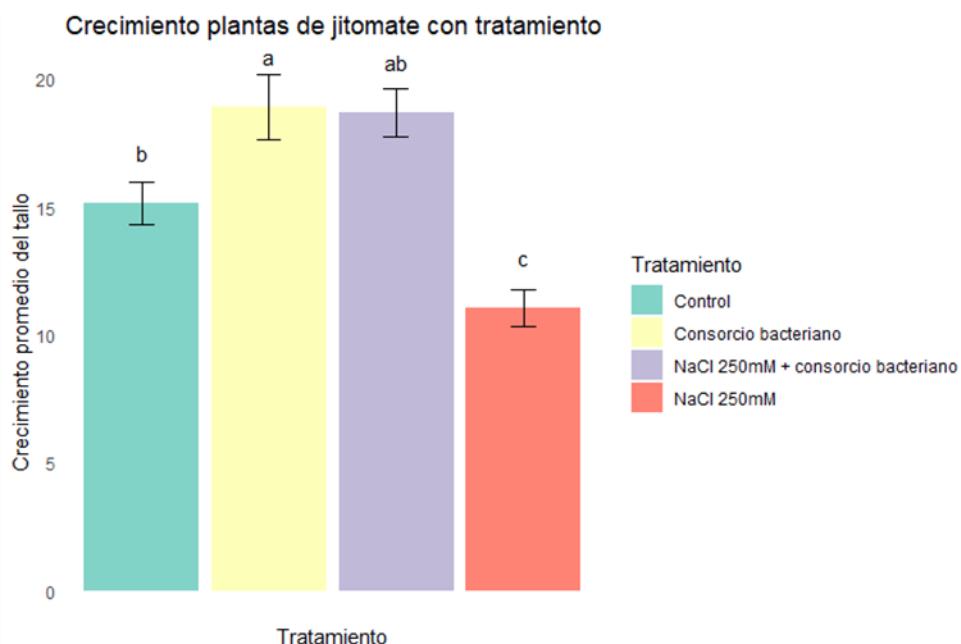


Fig. 14.- Longitud del tallo en plantas de jitomate. Se analizó el efecto del tratamiento en la longitud del tallo, se calculó el promedio de los 4 grupos. Se calculó el error estándar y se realizó un análisis ANOVA con prueba post-hoc Dunnet, para determinar si los resultados eran significativos entre los 4 tratamientos.

Las mediciones también consideraron la cantidad de hojas producidas por la planta, en este caso los resultados mostraron que el grupo tratado con NaCl presentó menor cantidad de hojas que los otros tres tratamientos (Fig. 15).

Desarrollo plantas de jitomate con tratamiento

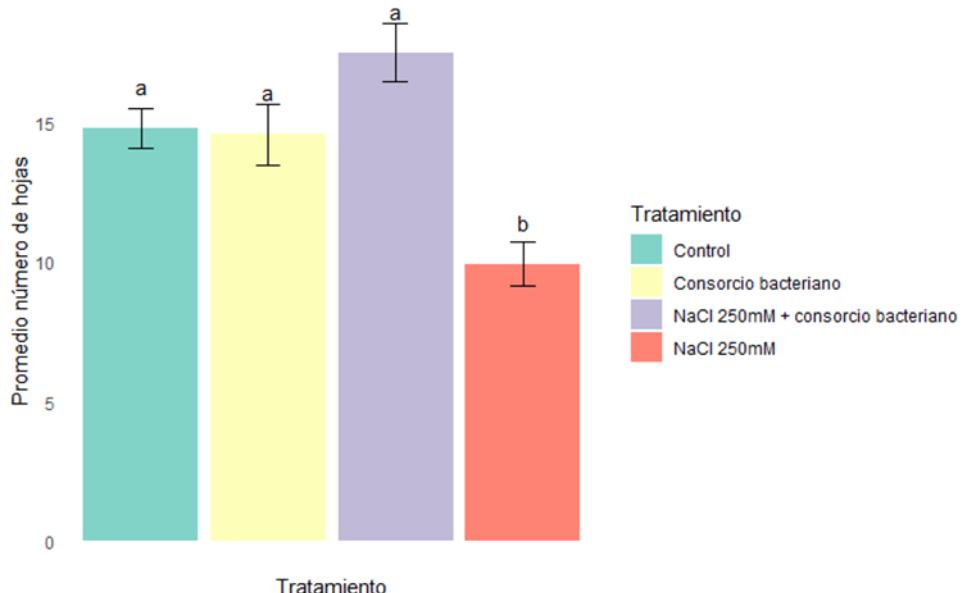


Fig. 15.- Cantidad de hojas en plantas de jitomate. Se calcularon los promedios, se calculó el error estándar y se realizó un análisis ANOVA con prueba post-hoc Dunnet, para determinar si los resultados eran significativos entre los 4 tratamientos.

El aspecto importante en cuanto al desarrollo de la planta de jitomate, así como en etapas fenológicas posteriores, es que un desarrollo masivo de la raíz se relacionará directamente con mayor producción de fruto. Es por ello por lo que se analizó la longitud de la raíz. Los resultados demostraron que en este caso el grupo tratado con NaCl mostró tener las raíces más cortas en comparación con los otros tratamientos (Fig. 16).

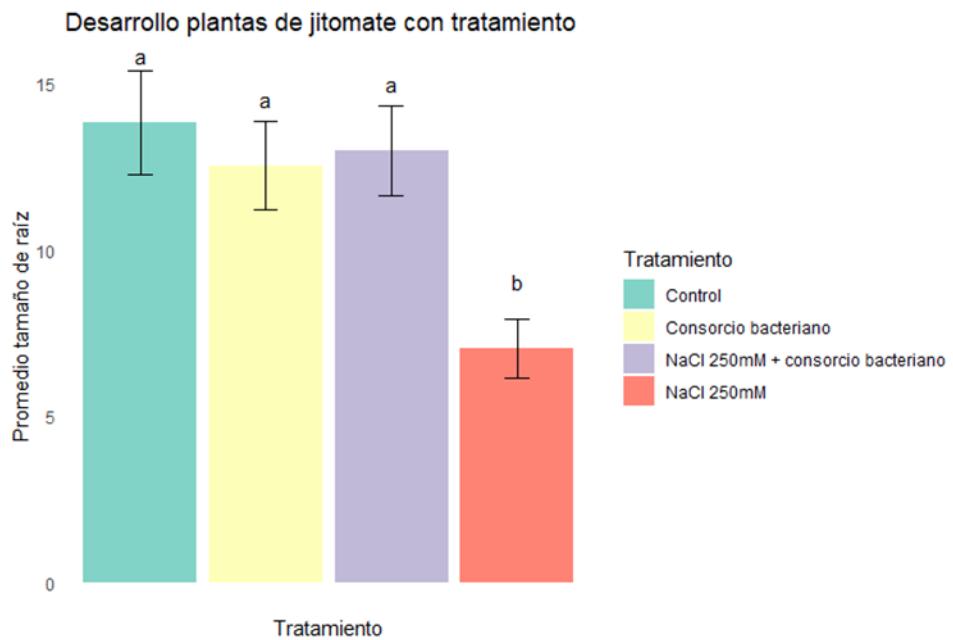


Fig. 16.- Longitud de la raíz en planta de jitomate. Se calcularon los promedios, se calculó el error estándar y se realizó un análisis ANOVA con prueba post-hoc Dunnet, para determinar si los resultados eran significativos entre los 4 tratamientos.

El ensayo final se realizó para determinar el efecto protector del consorcio bacteriano contra la toxicidad del NaCl en el desarrollo de la plántula. En este caso de las 15 plantas tratadas, se observó que el efecto tóxico del NaCl es considerable, debido a que después de 2 meses, partiendo de 15 plantas del grupo, solo 3 sobrevivieron, mientras que del grupo tratado con consorcio bacteriano y NaCl sobrevivieron 9 plantas, lo que corrobora que el consorcio bacteriano protege a las plantas del efecto citotóxico ejercido por el NaCl. Cabe mencionar que el grupo tratado con el consorcio bacteriano a simple vista se puede observar mayor desarrollo de la planta, lo cual demuestra que el consorcio utilizado no presenta un efecto dañino para las plantas (Fig. 17).

Los ensayos realizados muestran resultados favorables, sin embargo, es importante mencionar el hecho de que es necesario que se realice con una mayor cantidad de plantas para mejorar la precisión y veracidad de los resultados; sin embargo, este experimento piloto revela la importancia de estas bacterias en estos ensayos.

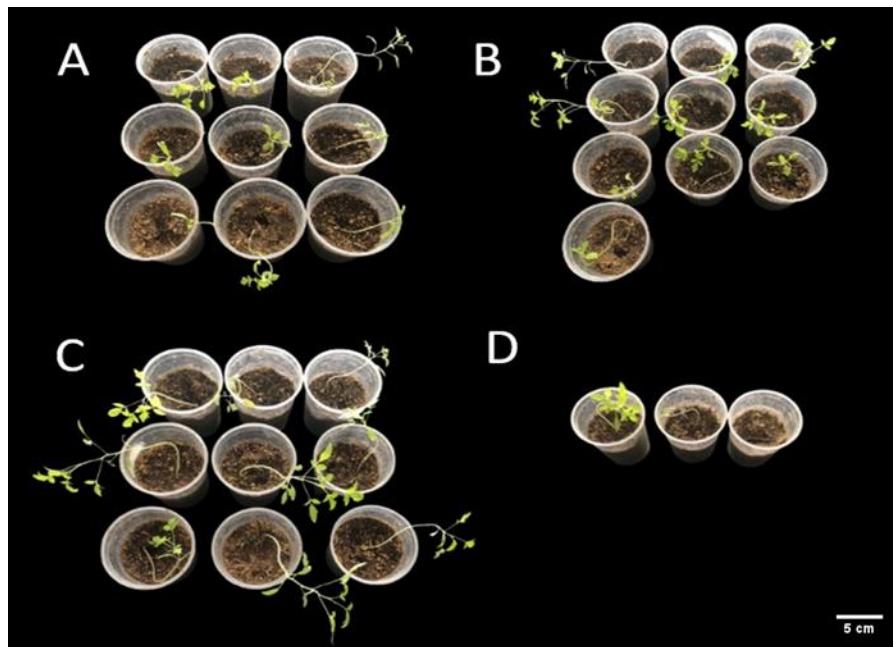


Fig. 17.- Efecto citotóxico del NaCl en la viabilidad de la plántula de jitomate. (A) control, (B), consorcio bacteriano, (C) consorcio bacteriano y NaCl, (D) NaCl. Se presentan solo las plantas sobrevivientes al tratamiento con NaCl durante 2 meses. La n inicial de cada grupo fue de 15 plantas.

La acumulación de sales en los tejidos vegetales puede dañar las membranas celulares y desestabilizar la función enzimática, afectando negativamente el metabolismo celular. La combinación de estos factores conduce a una reducción en la tasa de crecimiento, disminución de la producción de biomasa y deterioro del desarrollo de las raíces y hojas. A medida que las plantas intentan adaptarse a estas condiciones adversas, la calidad y cantidad de los cultivos pueden disminuir considerablemente, afectando la productividad agrícola (Tarolli, 2024).

La adición de NaCl 100 mM se observó que resultó en un retroceso del proceso de germinación, pasando de 2 días en el control hasta 8 días en presencia de NaCl, y que la adición de NaCl 150 mM inhibe por completo la germinación (Roşca et al., 2023).

VIII.- Conclusiones

1.- Del conjunto de cepas utilizadas; 1226, 1227, 1291, 1292, 1293, en particular las bacterias 1227 y 1291 comparten las mismas propiedades bioquímicas descritas esperadas para el género *Serratia*. Para su identificación robusta se procederá a secuenciar el marcador 16S.

2.- Fue posible establecer un consorcio bacteriano (el consorcio 1226/1227), aunque las bacterias no se han caracterizado para observar si pertenecen al mismo género, la compatibilidad solo se observó entre algunas de las bacterias.

3.- La capacidad de estas cepas para producir quitinasas y actuar sobre diversos sustratos orgánicos, proteínas, quitina (incluso presente en exoesqueleto), lipasas demuestra su potencial metabólico en la descomposición de materia orgánica y la utilidad y aplicación de su perfil bioquímico como agentes antifúngicos potenciales.

4.- Las cepas utilizadas en este proyecto antagonizan el crecimiento de hongos debido a la síntesis de diversos compuestos antimicrobianos y enzimas que afectan a los hongos.

5.- Las bacterias trabajadas en este estudio son excelentes candidatas para la producción de enzimas líticas capaces de degradar el exoesqueleto de camarón, el cual está compuesto principalmente de quitina. El exoesqueleto de camarón, al ser considerado un producto de desecho, puede entrar en una cadena de economía circular al producir compuestos de valor agregado a partir del perfil metabólico generado por estas bacterias utilizando el exoesqueleto de camarón como fuente de carbono y de nitrógeno.

6.- Las bacterias demostraron una notable resistencia a condiciones de crecimiento de estrés salino hasta 1.5 M, lo cual indica que se presentan mecanismos fisiológicos y bioquímicos que les permiten mantener la homeostasis iónica y osmótica, como la síntesis de compuestos osmoprotector o la regulación de bombas de iones que expulsan el exceso de sodio y otros iones. Condición que les permitirá crecer en ambientes hostiles en los que exista estrés salino y osmótico.

7.- Los ensayos con tratamiento de consorcio bacteriano en cultivos de jitomate mostraron beneficios para la salud y el crecimiento de las plantas. Se observó que con consorcios de *Serratia* spp. que presenta la capacidad para inhibir el crecimiento de hongos, fortalecer las defensas naturales de las plantas y promover el crecimiento vegetal. Estos hallazgos abren oportunidades para explorar su uso en estrategias de manejo integrado de plagas y en la mejora de la resiliencia de cultivos en condiciones adversas.

El resultado de la investigación estadística presentada nos permite determinar que se presenta un efecto de protección en cultivos de jitomate frente a estrés, en este caso salino, al ser inoculados con bacterias que presentan propiedades bioquímicas pertenecientes al género de *Serratia*. Debido a la resistencia a estrés salino que presentan las bacterias y la producción de enzimas y pigmentos por parte de las bacterias, los cuales se pudieron ver optimizados al estar trabajando en consorcios bacterianos.

IX.- Perspectivas

- 1.- Considerando la capacidad para degradar exoesqueleto de camarón por parte de las bacterias, investigar la factibilidad de utilizar estas bacterias para degradar la pared celular de hongos y producir un cóctel rico en enzimas líticas y explorar su producción para generación, de protoplastos en hongos de interés en investigación.
- 2.- A partir del cultivo sumergido se obtuvo un alto porcentaje de degradación de exoesqueleto de camarón. Al utilizar este sobrenadante para investigar su efecto como elicitor de la respuesta de defensa de la planta al contener productos de degradación de la quitina.
- 3.- Realizar ensayos de protección en granos por efecto de un liofilizado preparado a base de los metabolitos secretados por el consorcio bacteriano en el medio de cultivo.
- 4.- Determinar el efecto promotor de crecimiento de las bacterias analizadas en plantas de jitomate hasta la etapa productiva, tanto en condiciones de estrés salino comparando con la condición control sin este estrés.
- 5.- Investigar a nivel molecular los mecanismos específicos mediante los cuales las bacterias analizadas protegen las plantas de jitomate.

XI.- Referencias

1. Ahmad, H. M., Fiaz, S., Hafeez, S., Zahra, S., Shah, A. N., Gul, B., Aziz, O., Mahmood-Ur-Rahman, N., Fakhar, A., Rafique, M., Chen, Y., Yang, S. H., & Wang, X. (2022). Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Eliminate the Effect of Drought Stress in Plants: A Review. *Frontiers In Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.875774>
2. Alexander T.L., Rangel-Vargas, E., Gómez-Aldapa, C. A., Villagómez-Ibarra, J. R., Falfán-Cortes, R. N., Acevedo-Sandoval, O. A., & Castro-Rosas, J. (2022). Isolation and Molecular Identification of *Serratia* Strains Producing Chitinases, Glucanases, Cellulases, and Prodigiosin and Determination of Their Antifungal Effect against *Colletotrichum siamense* and *Alternaria alternata* In Vitro and on Mango Fruit. *International Journal of Plant Biology*, 13(3), 281-297. <https://doi.org/10.3390/ijpb13030024>
3. Anderson MT, Mitchell LA, Zhao L, Mobley HLT. Capsule Production and Glucose Metabolism Dictate Fitness during *Serratia marcescens* Bacteremia. *mBio*. 2017 May 23;8(3):e00740-17. doi: 10.1128/mBio.00740-17. PMID: 28536292; PMCID: PMC5442460.
4. Ayilara, M. S., Adeleke, B. S., Akinola, S. A., Fayose, C. A., Adeyemi, U. T., Gbadegesin, L. A., Omole, R. K., Johnson, R. M., Uthman, Q. O., & Babalola, O. O. (2023). Biopesticides as a promising alternative to synthetic pesticides: A case for microbial pesticides, phytopesticides, and nanobiopesticides. *Frontiers In Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1040901>
5. Arroyo, M.A.(2022). Alternativas biológicas para reemplazar los plaguicidas de mayor consumo en el Ecuador : Alternativa biológica con potencial para reemplazar a los fungicidas de síntesis química en cultivos de Ecuador. 58 páginas. Quito : EPN.
6. Awaludin. A., Yanti, I., Murtazam, M. A., & Jatmiko, Y. D. (2020). Optimization of glutaminase-free L-asparaginase production using mangrove endophytic *Lysinibacillus fusiformis* B27. *F1000Research*, 8, 1938. <https://doi.org/10.12688/f1000research.21178.2>
7. Besten, H. M. W. D., Mataragas, M., Moezelaar, R., Abbe, T., & Zwietering, M. H. (2006). Quantification of the Effects of Salt Stress and Physiological State on Thermotolerance of *Bacillus cereus* ATCC 10987 and ATCC 14579. *Applied And Environmental Microbiology*, 72(9), 5884-5894. <https://doi.org/10.1128/aem.00780-06>
8. Bhat R., Sustainability challenges in the valorization of agri-food wastes and by-products, Editor(s): Rajeev Bhat, *Valorization of Agri-Food Wastes and By-Products*, Academic Press, 2021, Pages 1-27, ISBN 9780128240441, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824044-1.00022-2>.
9. Blancas, P. G., & Medellín, A. M. (2014). Pruebas bioquímicas tradicionales y de alta resolución para identificación manual de enterobacterias. Redalyc.org. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53531787011>
10. Borgi, M. A., Saidi, I., Moula, A., Rhimi, S., & Rhimi, M. (2020). The Attractive *Serratia plymuthica* BMA1 Strain With High Rock Phosphate-Solubilizing Activity and Its Effect on the Growth and Phosphorus Uptake by *Vicia faba* L. Plants. *Geomicrobiology Journal*, 37(5), 437–445. <https://doi.org/10.1080/01490451.2020.1716892>

11. Bravo F., Sergio, Bertomeu Sánchez, José Ramón, & Schifter Aceves, Liliana. (2020). Adopción y producción estatal de DDT en México (1940-1980). *Estudios de historia moderna y contemporánea de México*, (60), 257-292. Epub 14 de marzo de 2022.<https://doi.org/10.22201/ih.24485004e.2020.60.70144>
12. Britania, 2014, DNAsa Agar, Britanialab, URL: https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_607067e62ab29.pdf
13. Cabreros Herrera J.M., (2022), Impacto económico de las pérdidas postcosecha en los sistemas agrícolas: El sistema de uva de mesa, Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, vol. 23, núm. 1, pp. 2-17, Asociación Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, S.C., <https://www.redalyc.org/journal/813/81371861001/html/>
14. Cang, S., Sanada, M., Johdo, O., Ohta, S., Nagamatsu, Y., & Yoshimoto, A. (2000). Biotechnology letters, 22(22), 1761–1765. <https://doi.org/10.1023/a:1005646102723>
15. Cao, Z., Yan, W., Ding, M., & Yuan, Y. (2022). Construction of microbial consortia for microbial degradation of complex compounds. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1051233>
16. Carreño et al., (2010), Consorcios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias, redalyc, URL: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=90920053003>
17. Carroll KC, Patel R. 2019. Systems for identification of bacteria and fungi, p 45–71. In KC Carroll, MA Pfaller, ML Landry, AJ McAdam, R Patel, SS Richter, DW Warnock (ed), *Manual of Clinical Microbiology*, 12th ed. ASM Press, Washington, DC
18. Castillo et al., (2022), *Serratia marcescens* (Enterobacteriaceae): promotora de la salud vegetal, IBCIENCIAS, URL: [chrome-extension://efaidnbmnnibpcajpcglclefindmkaj/http://biociencias.unach.mx/ibciencias/doc/vol5-art1.pdf](http://efaidnbmnnibpcajpcglclefindmkaj/http://biociencias.unach.mx/ibciencias/doc/vol5-art1.pdf)
19. Cha, J. M., K. Cheong, C. Wol-Suk, C. DuBok, R. Sung-Hee, K. Sun-II. (2004), J of Biotech & Bioprocess Eng. 9 297 – 302
20. Chepsergon J, Moleleki LN. Rhizosphere bacterial interactions and impact on plant health. Curr Opin Microbiol. 2023 Jun;73:102297. doi: 10.1016/j.mib.2023.102297. Epub 2023 Mar 30. PMID: 37002974.
21. Chillo, (2023), Effect of different organic management practices in raspberry on the diversity of arthropods of agricultural importance in El Bolsón, Río Negro, Universidad Nacional de la Plata, URL: <https://revistas.unlp.edu.ar/revagro/article/view/12811/14270>
22. Clements, T., Ndlovu, T., & Khan, W. (2019). Broad-spectrum antimicrobial activity of secondary metabolites produced by *Serratia marcescens* strains. Microbiological Research, 229(126329), 126329. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126329>
23. Cosimato, Ilaria, Biagio Santella, Sandra Rufolo, Paola Sabatini, Massimiliano Galdiero, Mario Capunzo, Giovanni Boccia, Veronica Follieri, and Gianluigi Franci. 2024. "Current Epidemiological Status and Antibiotic Resistance Profile of *Serratia marcescens*" *Antibiotics* 13, no. 4: 323. <https://doi.org/10.3390/antibiotics1304032>
24. Decker C., T., Rautenbach, M., van Rensburg, W. et al. Secondary metabolic profiling of *Serratia marcescens* NP10 reveals new stephensiolides and glucosamine derivatives with bacterial membrane activity. *Sci Rep* 13, 2360 (2023). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28502-6>

25. Dogra, N., Yadav, R., Kaur, M. *et al.* Nutrient enhancement of chickpea grown with plant growth promoting bacteria in local soil of Bathinda, Northwestern India. *Physiol Mol Biol Plants* **25**, 1251–1259 (2019). <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00661-9>
26. Dzakiyya N., Indun Dewi Puspita, Sri Pudjiraharti, (2020), Chitinase Activity of *Serratia marcescens* PT-6 Cultured in Bioreactor with Various Aeration Rate, E3S Web Conf., 147, DOI: <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014703010>
27. Esteves, N.C., Scharf, B.E. (2024), *Serratia marcescens* ATCC 274 increases production of the red pigment prodigiosin in response to Chi phage infection. *Sci Rep* 14, 17750, DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-68747-3>
28. El-Tarabily, K.A., Soliman, M.H., Nassar, A.H., Al-Hassani, H.A., Sivasithamparam, K., McKenna, F. and Hardy, G.E.S.J. (2000), Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathology*, 49: 573-583. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2000.00494.x>
29. FAO. (2020). el sistema post-cosecha y las pérdidas alimentarias, claridades agropecuarias, URL: <http://www.fao.org/3/ac301s/ac301s03.htm>.
30. FAO (2017), Pesticide Indicators, URL: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/EP>
31. Fenibo, E. O., Ijoma, G. N., & Matambo, T. (2021). Biopesticides in sustainable agriculture: A critical sustainable development driver governed by green chemistry principles. *Frontiers in sustainable food systems*, 5. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.619058>
32. Fenta, L., Mekonnen, H., & Kabtimer, N. (2023). The exploitation of microbial antagonists against postharvest plant pathogens. *Microorganisms*, 11(4), 1044. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041044>
33. Fuentes L. et al., (2019), Efecto de un consorcio microbiano en la eficacia del tratamiento de aguas residuales, Universidad Nacional de Trujillo, DOI: <http://dx.doi.org/10.22497/arnaldoa.261.26123>
34. Gamalero, E., & Glick, B. R. (2022). Recent advances in bacterial amelioration of plant drought and salt stress. *Biology*, 11(3), 437. <https://doi.org/10.3390/biology11030437>
35. Giri, A. V., Anandkumar, N., Muthukumaran, G., & Pennathur, G. (2004). A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-11>
36. Green, A. T., M. G. Healy, A. Healy. (2005) J of Chem. Tech. & Biotech. 80 28 – 34
37. Guerrero, S. and A. Muñoz (2019), Agri-environmental Indicators: Land use, Pesticides and Biodiversity in Farmland, OECD, Paris, [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=COM/TAD/C A/ENV/ EPOC\(2018\)17/FINAL&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=COM/TAD/C A/ENV/ EPOC(2018)17/FINAL&docLanguage=En).
38. Guo, S., Feng, B., Xiao, C., Wang, Q., Zhou, Y., & Chi, R. (2021). Effective Solubilization of Rock Phosphate by a Phosphate-Tolerant Bacterium *Serratia* sp. *Geomicrobiology Journal*, 38(7), 561–569. <https://doi.org/10.1080/01490451.2021.1903623>
39. Habboush Y. et al., (2023), Antibiotic Resistance, StatPearls, NIH, URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513277/>
40. Hamane, S., El Yemlahi, A., Hassani Zerrouk, M., El Galou, O., Laglaoui, A., Bakkali, M., et al. (2023). Plant growth promotion and biocontrol potentiality of endophytes

isolated from root nodules of *Sulla flexuosa* L. Int. J. Agron. 2023, 1–9. doi: 10.1155/2023/2451806

41. Hanif M. K., Kauser Abdullah Malik, Sohail Hameed, Muhammad Jawad Saddique, Ayesha, Kaneez Fatima, Tahir Naqqash, Afshan Majeed, Muhammad Javed Iqbal, Asma Imran, Growth stimulatory effect of AHL producing *Serratia* spp. from potato on homologous and non-homologous host plants, Microbiological Research, Volume 238, 2020, 126506, ISSN 0944-5013, <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126506>.
42. Harned R.L. The production of Prodigiosin by submerged growth of *Serratia marcescens*. Appl. Environ. Microbiol. 1954;2:365–368
43. Hausbeck, M. and Phillips, B. (2019), Broad-spectrum fungicides for vegetables. Michigan State University, MSU Extension, url: https://www.canr.msu.edu/news/broad_spectrum_fungicides_for_vegetables.
44. Hernández-Trejo, Antonia, Estrada Drouaillet, Benigno, Rodríguez-Herrera, Raúl, García Giron, José Manual, Patiño-Arellano, Sara Alejandra, & Osorio-Hernández, Eduardo. (2019). Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays* L.). Revista mexicana de ciencias agrícolas, 10(4), 803-813. Epub 22 de mayo de 2020.<https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1665>
45. Hertle, R. (2005). The family of *Serratia* type pore forming toxins. Current Protein & Peptide Science, 6(4), 313–325. <https://doi.org/10.2174/1389203054546370>
46. Horn, S. J., M. Sorlie, G. Vaaje-Kolstad, A. L. Norberg, B. Synstad, K. M. Varum, V.G. H. Eijsinkl. (2006), Biocatalyst & Biotransform. 24 (1/2) 39 – 53
47. Ilesanmi, O. I., Adekunle, A. E., Omolaiye, J. A., Olorode, E. M., & Ogunkanmi, A. L. (2020). Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. Scientific African, 8(e00279), e00279. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00279>
48. INEGI, 2019, Encuesta Nacional Agropecuaria, URL: <https://www.inegi.org.mx/rnm/index.php/catalog/607>
49. INEGI, 2022, Censo Agropecuario (CA), URL: <https://www.inegi.org.mx/programas/ca/2022/>
50. Jagtap, R. R., Mali, G. V., Waghmare, S. R., Nadaf, N. H., Nimbalkar, M. S., and Sonawane, K. D. (2023). Impact of plant growth promoting rhizobacteria *Serratia nematodiphila* RGK and *Pseudomonas plecoglossicida* RGK on secondary metabolites of turmeric rhizome. Biocatal. Agric. Biotechnol. 47:102622. doi: 10.1016/j.bcab.2023.102622
51. Jaime M., & Reese, E. T. (1969). The chitinase of *Serratia marcescens*. Canadian Journal of Microbiology, 15(7), 689–696. <https://doi.org/10.1139/m69-122>
52. Jeong, H., Kloepper, J. W., & Ryu, C.-M. (2015). Genome sequence of Rhizobacterium *Serratia marcescens* strain 90-166, which triggers induced systemic resistance and plant growth promotion. Genome Announcements, 3(3). <https://doi.org/10.1128/genomea.00667-15>
53. Jia, Xianbo & Liu, Fangchen & Zhao, Ke & Lin, Junjie & Fang, Yu & Cai, Shouping & Lin, Chenqiang & Zhang, Hui & Chen, Longjun & Chen, Jichen. (2021). Identification of Essential Genes Associated With Prodigiosin Production in *Serratia marcescens* FZSF02. Frontiers in Microbiology. 12. 705853. 10.3389/fmicb.2021.705853.

54. Jupatanakul, N., Pengon, J., Selisana, S. M. G., Choksaengkarn, W., Jaito, N., Saeung, A., Bunyong, R., Posayapisit, N., Thammatinna, K., Kalpongukul, N., Upalee, K., Pisitkun, T., & Kamchonwongpaisan, S. (2020). *Serratia marcescens* secretes proteases and chitinases with larvicidal activity against *Anopheles dirus*. *Acta Tropica*, 212(105686), 105686. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105686>
55. Ketola, T., & Hiltunen, T. (2014). Rapid evolutionary adaptation to elevated salt concentrations in pathogenic freshwater bacteria *Serratia marcescens*. *Ecology and Evolution*, 4(20), 3901–3908. <https://doi.org/10.1002/ece3.1253>
56. Kulkova, I., Wróbel, B., & Dobrzański, J. (2024). *Serratia* spp. as plant growth-promoting bacteria alleviating salinity, drought, and nutrient imbalance stresses. *Frontiers in microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1342331>
57. Lamz Piedra, A., & González Cepero, M. C. (2013). La salinidad como problema en la agricultura: la mejora vegetal una solución inmediata. *Cultivos tropicales*, 34(4), 31–42. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362013000400005&lng=es&tlang=es.
58. Latgé JP. (2010). Tasting the fungal cell wall. *Cellular Microbiology* 12(7): 863–872
59. Lahiri, D., Nag, M., Ghosh, S., Dey, A., & Ray, R. R. (2022). Microbial consortium and crop improvement: Advantages and limitations. En *Trends of Applied Microbiology for Sustainable Economy* (pp. 109–123). Elsevier.
60. Lu, J.-l., Li, J.-t., Wang, H.-y., Fang, Z., Wang, X.-j., Feng, S.-w., Wang, Z., Yuan, T., Zhang, S.-c., Ou, S.-n., Yang, X.-d., Wu, Z.-h., Du, X.-d., Tang, L.-y., Liao, B., Shu, W.-s., Jia, P. and Liang, J.-L. (2021), A comprehensive synthesis unveils the mysteries of phosphate-solubilizing microbes. *Biol Rev*, 96: 2771–2793. <https://doi.org/10.1111/brv.12779>
61. Lugtenberg, B. (2015). Principles of Plant-Microbe Interactions. *Cambridge International Law Journal*, URL: <https://www.semanticscholar.org/paper/Principles-of-Plant-Microbe-Interactions-Lugtenberg/e6042e4b26a3e33cb53dcef43a25c1165a4181f4>
62. Mahdi, I., Hafidi, M., Allaoui, A., & Biskri, L. (2021). Halotolerant endophytic bacterium *Serratia rubidaea* ED1 enhances phosphate solubilization and promotes seed germination. *Agriculture*, 11(3), 224. <https://doi.org/10.3390/agriculture11030224>
63. Martínez, (2018), Deterioro de frutas y hortalizas en post-cosecha, Infoagro, URL: <https://mexico.infoagro.com/deterioro-de-frutas-y-hortalizas-en-post-cosecha/>
64. Mayak, S., Tirosh, T., & Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(6), 565–572. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2004.05.009>
65. Mendonça C., Amorim, É. A. da F., Aragão, F. M. M., Câmara, W. de S., Araújo, M. C., Pereira, C. D. da S., Dias, L. R. L., Gomes, W. C., Aliança, A. S. dos S., Souza, J. C. de S., da Silva, L. C. N., & Miranda, R. de C. M. de. (2023). Biocontrol potential of *Serratia marcescens* (B8) and *Bacillus* sp. (B13) isolated from urban mangroves in raposa, Brazil. *Life* (Basel, Switzerland), 13(10), 2036. <https://doi.org/10.3390/life13102036>
66. Morocho et al., (2019), Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas Ctro. Agr, vol.46, n.2, pp.93-103. ISSN 2072-2001.
67. Mota, (2021), Formación de un consorcio bacteriano para el manejo orgánico de *Lasiodiplodia pseudotheobromae*, agente causal de la pudrición en frutos de mango.,

Universidad Veracruzana, URL:

<https://www.uv.mx/mceb/estudiantes/generaciones/alumnos/gen2019/s19019917/>

68. Naranjo, A. El gatopardismo en el campo: Soberanía alimentaria y la omnipresencia de los plaguicidas altamente peligrosos. In: ESTEBAN, D., ARTACKER, T., and LIZANO, R., coords. Cambio climático, biodiversidad y sistemas agroalimentarios: avances y retos a 10 años de la Ley Orgánica del Régimen de la Soberanía Alimentaria en Ecuador [online]. Quito: Editorial Abya-Yala, 2020, pp. 233-244. ISBN: 978-9978-10-466-8. <http://doi.org/10.7476/9789978105689.0014>.
69. Narváez, Y. A., & Botina-Azain, B. L. (2023). Effect of adjuvants, fungicides and insecticides on the growth of *Trichoderma koningiopsis* Th003. *Revista mexicana de fitopatología: la revista oficial de la Sociedad Mexicana de Fitopatología*, 41(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2305-1>
70. Muñoz N., Y. D., & Rodríguez Rodríguez, L. F. (2021). Eficiencia de dos consorcios bacterianos para el control de *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* en cultivos de papa *Solanum tuberosum* var. andígena. *Temas Agrarios*, 26(2), 182-189. <https://doi.org/10.21897/rta.v26i2.2742>
71. Nordstedt, N. P., & Jones, M. L. (2021). Genomic Analysis of *Serratia plymuthica* MBSA-MJ1: A Plant Growth Promoting Rhizobacteria That Improves Water Stress Tolerance in Greenhouse Ornamentals. *Frontiers in microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.653556>
72. OECD (2013), Environmental Performance Reviews: Mexico 2013, OECD Publishing, Paris, <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264180109-en.pdf?expires=1582891971&id=id&accname=ocid84004878&checksum=D32B6046B31AF193C6109A27EC0E188D>
73. Oliveros, (2023), Diseño de un consorcio bacteriano sintético con capacidad de degradar petróleo crudo, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Centro de Investigación en Biotecnología, URL:
<https://riaa.uaem.mx/xmlui/bitstream/handle/20.500.12055/4075/PAOKLR04T.pdf?sequence=1>
74. Palaniyandi, S. A., Damodharan, K., Yang, S. H., & Suh, J. W. (2014). *Streptomyces* sp. strain PGPA39 alleviates salt stress and promotes growth of 'Micro Tom' tomato plants. *Journal of Applied Microbiology*, 117(3), 766–773. <https://doi.org/10.1111/jam.12563>
75. Palmer, M. (2001). The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolsins. *Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology*, 39(11), 1681–1689. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(01\)00155-6](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(01)00155-6)
76. Parani, K., G. P. Shetty, B. K. Saha. (2011), Indian J Micro. 51(3) 247 – 250
77. Petersen LM, Tisa LS. Molecular characterization of protease activity in *Serratia* sp. strain SCBI and its importance in cytotoxicity and virulence. *J Bacteriol.* 2014 Nov;196(22):3923-36. doi: 10.1128/JB.01908-14. Epub 2014 Sep 2. PMID: 25182493; PMCID: PMC4248818.
78. Quintero Rueda, Aristides & Rodríguez, Isela & Setúbal, Sulamita & Calderon, Leonardo & Stabeli, Rodrigo & Zuliani, Juliana & Soares, Andreimar. (2015). *In Vitro*

- Antimicrobial and Antifungal Activity of Phospholipases A2 isolated of *Bothrops asper* Snake Venom from Panama. 10.1177/1091581815623753.
79. Robles, J., Mejía, L., Perea, S., & Hernández, R. (2018). Aprovechamiento del exoesqueleto de camarón en la comunidad estudiantil para el desarrollo académico. *IJMSOR: International Journal of Management Science & Operation Research*, 3(1), 51-55. URL: <http://ijmsoridi.com/index.php/ijmsor/article/view/96>
 80. SADR (2021), Mapa Agrícola de afectación por salinidad en México, Gobierno de México, URL: <https://www.gob.mx/agricultura/acciones-y-programas/mapa-agricola-de-afectacion-por-salinidad-en-mexico#:~:text=Salinidad%20en%20la%20agricultura&text=La%20afectaci%C3%B3n%20leve%20por%20sodio,la%20superficie%20agr%C3%ADcola%20de%20riegos>.
 81. Saikia, J., Sarma, R. K., Dhandia, R., Yadav, A., Bharali, R., Gupta, V. K., & Saikia, R. (2018). Alleviation of drought stress in pulse crops with ACC deaminase producing rhizobacteria isolated from acidic soil of Northeast India. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-21921-w>
 82. Roșca Mihaela, Mihalache Gabriela, Stoleru Vasile, Tomato responses to salinity stress: From morphological traits to genetic changes, *Frontiers in Plant Science*, Volume 14, 2023, URL=<https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1118383>, DOI=10.3389/fpls.2023.1118383, ISSN=1664-462X
 83. SHCP (2019), Plan Nacional de Desarrollo 2019-2024, (National Development Plan 2019-2024), https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5565599&fecha=12/07/2019.
 84. Shimuta, K., Ohnishi, M., Iyoda, S., Gotoh, N., Koizumi, N., & Watanabe, H. (2009). The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhlA) depend on lysophospholipid production by PhlA. *BMC Microbiology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-261>
 85. Simsek M. Determination of the antibiotic resistance rates of *Serratia marcescens* isolates obtained from various clinical specimens. *Niger J Clin Pract.* 2019 Jan;22(1):125-130. doi: 10.4103/njcp.njcp_362_18. PMID: 30666031.
 86. Singh, R. P., & Jha, P. N. (2016). The multifarious PGPR *Serratia marcescens* CDP-13 augments induced systemic resistance and enhanced salinity tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.). *PloS One*, 11(6), e0155026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155026>
 87. Someya, N., Nakajima, M., Hirayae, K. et al. Synergistic Antifungal Activity of Chitinolytic Enzymes and Prodigiosin Produced by Biocontrol Bacterium, *Serratia marcescens* Strain B2 against Gray Mold Pathogen, *Botrytis cinerea*. *J Gen Plant Pathol* **67**, 312–317 (2001). <https://doi.org/10.1007/PL00013038>
 88. Song, M.-J., Bae, J., Lee, D.-S., Kim, C.-H., Kim, J.-S., Kim, S.-W., & Hong, S.-I. (2006). Purification and characterization of prodigiosin produced by integrated bioreactor from *Serratia* sp. KH-95. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 157–161. <https://doi.org/10.1263/jbb.101.157>
 89. Sriwati, R., Maulidia, V., Intan, N., Oktarina, H., Syamsuddin, Khairan, K., Skala, L., & Mahmud, T. (2023). Endophytic bacteria as biological agents to control fusarium wilt disease and promote tomato plant growth. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 125(101994), 101994. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.101994>

90. Stringlis IA, Yu K, Feussner K, de Jonge R, Van Bentum S, Van Verk MC, Berendsen RL, Bakker PAHM, Feussner I, Pieterse CMJ. MYB72-dependent coumarin exudation shapes root microbiome assembly to promote plant health. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 May 29;115(22):E5213-E5222. doi: 10.1073/pnas.1722335115. Epub 2018 Apr 23. PMID: 29686086; PMCID: PMC5984513.
91. Suzuki K., Noriko SUGAWARA, Megumi SUZUKI, Taku UCHIYAMA, Fuminori KATOUNO, Naoki NIKAIDOU, Takeshi WATANABE, Chitinases A, B, and C1 of *Serratia marcescens* 2170 Produced by Recombinant *Escherichia coli*: Enzymatic Properties and Synergism on Chitin Degradation, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, Volume 66, Issue 5, 1 January 2002, Pages 1075–1083, <https://doi.org/10.1271/bbb.66.1075>
92. Taira, T., Yamagami, T., Aso, Y., Ishiguro, M., & Ishihara, M. (2001). Localization, accumulation, and antifungal activity of chitinases in rye (*Secale cereale*) seed. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65(12), 2710–2718. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.2710>
93. Takaki, G. M. C., Casullo de Araújo, H. W. & Fukushima, K. (2010). Prodigiosin Production by *Serratia marcescens* UCP 1549 Using Renewable-Resources as a Low Cost Substrate. *Molecules*, 15(10), 6931-6940. <https://doi.org/10.3390/molecules15106931>
94. Tan, D., Fu, L., Han, B., Sun, X., Zheng, P., & Zhang, J. (2015). Identification of an endophytic antifungal bacterial strain isolated from the rubber tree and its application in the biological control of banana Fusarium wilt. *PloS One*, 10(7), e0131974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131974>
95. Tarolli, P., Luo, J., Park, E., Barcaccia, G., & Masin, R. (2024). Soil salinization in agriculture: Mitigation and adaptation strategies combining nature-based solutions and bioengineering. *iScience*, 27(2), 108830. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.108830>
96. Tejedor A. (2020). La industria agroquímica, Química orgánica industrial, URL: <https://www.eii.uva.es/organica/qoi/tema-12.php>
97. Toratani, Tadayuki and Shoji, Toshihiro and Ikebara, Tomonori and Suzuki, Kazushi and Watanabe, Takeshi, The importance of chitobiase and N-acetylglucosamine (GlcNAc) uptake in N,N'-diacetylchitobiose [(GlcNAc)₂] utilization by *Serratia marcescens* 2170, *Microbiology*, 2008, volume 154, number 5, pages 1326-1332, doi: <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/016246-0>, url = <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.2007/016246-0>
98. Tresner HD, Hayes JA, Backus EJ. Differential tolerance of streptomycetes to sodium chloride as a taxonomic aid. *Appl Microbiol*. 1968 Aug;16(8):1134-6. doi: 10.1128/am.16.8.1134-1136.1968. PMID: 5675504; PMCID: PMC547607.
99. Vauclare, P., Marty, V., Fabiani, E., Martinez, N., Jasnin, M., Gabel, F., Peters, J., Zaccai, G., & Franzetti, B. (2015). Molecular adaptation and salt stress response of *Halobacterium salinarum* cells revealed by neutron spectroscopy. *Extremophiles: Life under Extreme Conditions*, 19(6), 1099–1107. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0782-x>

100. Van Oosten, M.J., Pepe, O., De Pascale, S. *et al.* The role of biostimulants and bioeffectors as alleviators of abiotic stress in crop plants. *Chem. Biol. Technol. Agric.* **4**, 5 (2017). <https://doi.org/10.1186/s40538-017-0089-5>
101. Villaseñor N. et al., (2022), Conociendo a los hongos fitopatógenos, INECOL, URL: [https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1042-conociendo-a-los-hongos-fitopatogenos#:~:text=En%20la%20sociedad%2C%20los%20hongos,son%20de%20los%20m%C3%A1s%20importantes. \)](https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/1042-conociendo-a-los-hongos-fitopatogenos#:~:text=En%20la%20sociedad%2C%20los%20hongos,son%20de%20los%20m%C3%A1s%20importantes.)
102. Wang D, He H, Wei C. Cellular and potential molecular mechanisms underlying transovarial transmission of the obligate symbiont Sulcia in cicadas. *Environ Microbiol.* 2023 Apr;25(4):836-852. doi: 10.1111/1462-2920.16310. Epub 2023 Jan 4. PMID: 36515176.
103. Williamson, N. R., Simonsen, H. T., Ahmed, R. A. A., Goldet, G., Slater, H., Woodley, L., Leeper, F. J., & Salmond, G. P. C. (2005). Biosynthesis of the red antibiotic, prodigiosin, in *Serratia*: identification of a novel 2-methyl-3-n-amyl-pyrrole (MAP) assembly pathway, definition of the terminal condensing enzyme, and implications for undecylprodigiosin biosynthesis in *Streptomyces*. *Molecular Microbiology*, 56(4), 971–989. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04602.x>
104. Zhang, Y., Kang, X., Liu, H., Liu, Y., Li, Y., Yu, X., ... Chen, Q. (2018). Endophytes isolated from ginger rhizome exhibit growth promoting potential for *Zea mays*. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 64(9), 1302–1314. <https://doi.org/10.1080/03650340.2018.1430892>
105. Zarei, Mandana & Aminzadeh, Saeed & Zolgharnein, Hossein & Safahieh, Alireza & Daliri, Morteza & Noghabi, Kambiz & Ghoroghi, Ahmad & Motallebi, Abbasali. (2011). Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*. 42. 1017-29. 10.1590/S1517-838220110003000022.
106. Zuccarelli, P. R. (2019). Fungicidas: Impacto en la Salud y el Medio Ambiente. TSI Group - Tecnosoluciones Integrales. URL: <https://tecnosolucionescr.net/blog/145-fungicidas-impacto-en-la-salud-y-el-medio-ambiente>