



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA



**Efecto elicitor del uso de ADN propio en *Bacillus cereus*-Amazcala (Bc-A)
como herramienta para aumentar su capacidad bioestimulante**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Licenciada en Microbiología

Presenta:

Fernanda Salazar Jiménez

Dirigida por:

M.C. Noelia Isabel Ferrusquía Jiménez

Santiago de Querétaro, Qro. Noviembre de 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Efecto elicitor del uso de ADN propio en *Bacillus cereus*-Amazcala (Bc-A) como herramienta para aumentar su capacidad bioestimulante

por

Fernanda Salazar Jiménez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: CNLIN-243478



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN MICROBIOLOGÍA

**Efecto elicitor del uso de ADN propio en *Bacillus cereus*-Amazcala (Bc-A)
como herramienta para aumentar su capacidad bioestimulante**

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

Presenta:

Fernanda Salazar Jiménez

Dirigido por:

Noelia Isabel Ferrusquía Jiménez

SINODALES

Noelia Isabel Ferrusquía Jiménez

Presidente

Ramón Gerardo Guevara González

Secretario

Angelina Rodríguez Torres

Asesora

Bertha Isabel Carvajal Gamez

Asesora

Joel Ernesto Martínez Camacho

Asesor

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
1 de Noviembre de 2023
México

Resumen

Este trabajo explora las nuevas propuestas en el campo de la agricultura como lo son el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR) como una solución innovadora para mejorar el crecimiento y los rendimientos en las plantas, recientemente, el ADN propio extracelular que, aplicado como tratamiento a bajas concentraciones, ha mostrado tener un efecto protector contra enfermedades, además de ser capaz de inducir respuestas relacionadas con los sistemas de defensa innatos de las plantas. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del uso del ADN propio obtenido a partir la bacteria *Bacillus cereus*-Amazcala (Bc-A) como señalizador para inducir estrés sobre dicha bacteria, determinando su capacidad para funcionar como bioestimulante a través de experimentos *in vitro* aplicando diversas concentraciones de ADN propio fragmentado en la bacteria. Para el ensayo de crecimiento se analizaron 6 grupos de concentración de ADN propio a diferentes concentraciones (0, 0.5, 2, 5, 10 y 50 µg/mL). Mientras que para el resto de los ensayos se tuvieron cuatro grupos distintos de concentración de ADN propio aplicada (0, 2, 10 y 50 µg/mL). Los resultados mostraron que la aplicación de ADN propio como tratamiento potenció el crecimiento de Bc-A después de 24 hrs de exposición, especialmente en las concentraciones de 2, 10 y 50 µg/mL. Para las pruebas donde se midió la actividad específica de la catalasa (CAT) se observaron valores mayores en actividad específica para los tratamientos con mayor concentración de ADN propio aplicada (10 y 50 µg/mL). La capacidad de solubilización de fosfatos aumentó de manera uniforme para todos los grupos donde se aplicó ADN propio en comparación con el control. Los resultados del ensayo donde se midió la actividad específica de la superóxido dismutasa (SOD) mostraron mayor actividad específica de la enzima para los grupos de concentración de ADN propio 2 y 10 µg/mL. La producción de giberelinas (Gb3) en la concentración de 50 mostró ser significativamente mayor a la observada en el grupo control. Los grupos de concentración 2 y 10 difirieron significativamente del grupo 0, pero no entre ellos. Este proyecto abre nuevas posibilidades para desarrollar una estrategia innovadora amigable con el medio ambiente destinada a aprovechar al máximo las capacidades benéficas presentes en esta cepa bacteriana Bc-A. Se propone como biofertilizante o biopesticida con el fin de proporcionar una nueva herramienta agrícola dentro programas orientados hacia un manejo integrado contra enfermedades en cultivos.

Palabras clave: ADN propio, DAMPS, Biocontrol, biofertilizante, PGPR

Summary

This work explores new proposals in the field of agriculture, such as the use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) as an innovative solution to improve plant growth and yields. Recently, extracellular own DNA, when applied in low concentrations, has shown a protective effect against diseases and the ability to induce responses related to plant's innate defense systems. The study aimed to evaluate the effect of using self-DNA obtained from the *Bacillus cereus*-Amazcala (Bc-A) bacterium as a signaling molecule to induce stress on the bacterium, determining its capacity to function as a biostimulant through in vitro experiments applying various concentrations of fragmented self-DNA on the bacteria. For the growth assay, 6 concentration groups of self-DNA at different levels (0, 0.5, 2, 5, 10, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were analyzed. Meanwhile, for the other assays, four different groups of self-DNA concentration were used (0, 2, 10, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The results showed that applying self-DNA as a treatment enhanced the growth of Bc-A after 24 hours of exposure, especially at concentrations of 2, 10, and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. In the tests measuring the specific activity of catalase (CAT), higher specific activity values were observed for treatments with higher concentrations of applied self-DNA (10 and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The phosphate solubilization capacity uniformly increased for all groups where self-DNA was applied compared to the control. Results from the assay measuring the specific activity of superoxide dismutase (SOD) showed higher enzyme-specific activity for the groups with self-DNA concentrations of 2 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Gibberellin (Gb3) production at a concentration of 50 showed significantly higher levels compared to the control group. Concentration groups 2 and 10 differed significantly from group 0 but not between each other. This project opens new possibilities to develop an environmentally friendly innovative strategy aimed at maximizing the beneficial capabilities present in this Bc-A bacterial strain. It is proposed as a biofertilizer or biopesticide to provide a new agricultural tool within programs focused on integrated disease management in crops.

Keywords: Self-DNA, DAMPS, Biocontrol, biofertilizer, PGPR

Dedicatoria

A mis padres por su apoyo incondicional ante todo, sin ellos la realización de este trabajo de tesis no sería posible. A mis hermanos y amistades por su apoyo moral y motivación.

Agradecimientos

A mi directora Dr. Noelia Ferrusquía por su guía, paciencia, grandes consejos y enseñanzas, así como al Dr. Ramón por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y la confianza para desarrollar este proyecto. Al Dr. Joel Martínez por su apoyo durante la experimentación. Y a cada uno de mis sinodales por sus observaciones, consejos y correcciones durante la escritura del presente trabajo de tesis.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	10
II. ANTECEDENTES	12
2.1. Generalidades de <i>Bacillus cereus</i>	12
2.2. <i>Bacillus cereus</i> como PGPR	15
2.3. Bacterias PGPR en su uso como biofertilizantes	17
2.4. ADN propio como señalizador de estrés	19
III. JUSTIFICACIÓN	23
IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVOS	24
VI. METODOLOGÍA	25
1.1 Mantenimiento y crecimiento de Bc-A	25
1.2 Extracción de ADN propio de Bc-A	25
1.3 Determinación in vitro del efecto de la concentración de ADN propio en el crecimiento de Bc-A	26
1.4 Prueba de solubilidad de fosfatos	26
1.5 Cuantificación de las actividades enzimáticas de SOD y CAT	27
1.6 Determinación del efecto del ADN propio en la producción de Giberelinas	27
1.7 Análisis Estadísticos	28
VII. RESULTADOS	29
10.1. Evaluación del efecto del ADN propio sobre el crecimiento de Bc-A.	29
10.2. Determinación del efecto del ADN propio sobre la actividad específica de SOD	30
10.3. Determinación del efecto de la concentración del ADN propio sobre la actividad de la enzima CAT	32
10.4. Evaluación del efecto del ADN propio sobre la capacidad de solubilización de fosfato de calcio	33

10.5. Determinación del efecto de ADN propio sobre la producción de Giberelinas en Bc-A	34
VIII. DISCUSIÓN	35
IX. CONCLUSIÓN	38
X. REFERENCIAS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de Bc-A tras el tratamiento con ADN propio	30
Figura 2. Actividad enzimática específica de SOD	31
Figura 3. Actividad enzimática específica de CAT	32
Figura 4. Prueba de solubilización de fosfato	33
Figura 5. Producción de giberelinas en Bc-A tras los tratamientos con ADN propio	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad promedio de SOD por tratamiento

31

I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, las enfermedades agrícolas suelen causar pérdidas anuales del 30 - 50 % en cultivos, especialmente en los países menos desarrollados donde el acceso a los métodos de control de enfermedades es limitado (Kelman et al., 2021). Se reporta que se espera un aumento en el tamaño poblacional de 9 billones de personas para el año 2050, lo que significa un aumento en las demandas alimenticias, las cuales no podrán ser cubiertas bajo las estrategias de producción agrícola actuales (Hayed et al., 2022). Además, se encuentra presente una crisis climática a nivel mundial, donde los cambios en los niveles de dióxido de carbono atmosférico, temperatura y humedad aumentan la severidad y frecuencia de las enfermedades vegetales, intensificando así los esfuerzos y recursos necesarios para controlarlas (Kim et al., 2021). Lo anterior ha provocado un uso excesivo de pesticidas y fertilizantes químicos que en los suelos favorecen la formación de gases de efecto invernadero y la generación de patógenos resistentes (Good & Beatty, 2011). Por este motivo, nuevas estrategias como el uso de Bacterias PGPR ha sido propuesto en el campo de la agricultura como una alternativa amigable con el medio ambiente, con la expectativa de que permita una disminución en el uso de agroquímicos

Se ha visto que las bacterias PGPR pueden actuar como señalizadores de estrés hacia las plantas por medio de moléculas que la misma produce o secreta, y son reconocidas por los sistemas de defensa innatos vegetales. Un ejemplo de esto son los péptidos bacterianos conocidos como bacteriocinas (Nazari & Smith 2020). La Turincina 17 de la PGPR *Bacillus thuringiensis* ha demostrado disminuir el estrés hídrico en plantas de soya y aumentar su tasa fotosintética cuando se aplica como tratamiento (Zhang et al., 2019; Nazari & Smith 2020). Las bacterias PGPR también son solubilizadoras de fosfato inorgánico y excelentes en la captación de nitrógeno, lo que incrementa el flujo de nutrientes disponibles en la rizósfera para ser absorbidos por las plantas (Igiehon & Babalola et, 2018). En adición a esto, se ha demostrado que la gestión de las comunidades microbianas en la rizósfera contribuye al control de enfermedades en el campo (Zhang et al., 2019; Whang et al., 2012). La inoculación con microorganismos vivos (biofertilizantes) ha demostrado propiciar una reducción significativa en la prevalencia de *Fusarium* en los cultivos de tomate (Yang et al., 2014)

Adicionalmente, muchas de estas bacterias son capaces de producir hormonas como lo son las giberelinas (Gb3) las cuales han sido implicadas en el crecimiento y

desarrollo de las plantas, específicamente en la germinación de las semillas, expansión de las hojas y las flores (Yamaguchi shinjiro, 2008). La cepa Bc-A, aislada por Solano-Alvarez et al., 2021 a partir de las raíces de una planta de Ricino (*Ricinus communis*) de Amazcala, Qro. ha sido clasificada como PGPR, dada su capacidad para inducir el crecimiento vegetal en tomate. El uso de las rizobacterias promotoras del crecimiento en plantas, ha sido una de las propuestas más innovadoras y con mejores resultados para controlar diferentes patógenos del suelo que ha surgido recientemente. Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales promueven el crecimiento y la mejora de rendimientos en las plantas aún son estudiados.

Bacillus cereus es una bacteria gram positiva facultativa anaerobia que se encuentra comúnmente en el medio ambiente, especialmente en el suelo. Dado su amplio espectro de distribución natural, esta bacteria ha evolucionado diversas adaptaciones para sobrevivir en los diferentes ecosistemas donde habita. Algunas de sus adaptaciones más destacadas son la formación de biopelículas, motilidad celular, producción de surfactina o enzimas metabólicas (Wang et al. 2011; Cybulski et al. 2009). Se ha reportado que múltiples tipos de superóxido dismutasas juegan un papel importante en el incremento de resistencia bacteriana en diversos ambientes de estrés como calor, cambios en la osmolaridad, disposición de nutrientes y condiciones altas de oxígeno.

La superóxido dismutasa es una enzima importante tanto para organismos aerobios como para los anaerobios, ya que gracias a ella pueden protegerse ante el estrés oxidativo, catalizando la conversión de $-O_2$ en $H_2O_2 + O_2$. Existen cuatro tipos de enzimas SOD descritas y son clasificadas de acuerdo al metal que utilizan como cofactor, para *Bacillus spp* estos cofactores pueden ser: manganeso, hierro, cobre y zinc (Zhang et al., 2020). Otra de las enzimas principales implicadas en la supervivencia de las bacterias y otros organismos es la catalasa (CAT), la cual es una enzima oxidorreductasa que se encuentra ampliamente distribuida en el medio ambiente. Su función principal radica en la rápida descomposición del peróxido de hidrógeno en moléculas de agua y de hidrógeno, dado que el exceso de oxigenación da lugar a la formación de lo que se conoce como radicales libres. Moléculas altamente inestables, y con potencial carcinogénico (Staerck et al., 2017).

El estudio de Ferrusquía-Jiménez et al., 2022 indica que la utilización del ADN extracelular propio de *Phytophthora capsici* durante el cultivo de *Capsicum annuum*, a concentraciones bajas de 2 $\mu\text{g/mL}$, presenta un efecto protector contra las enfermedades causadas por *P. capsici*. Además, observaron también que el ADN propio y el no propio de un microorganismo o planta pueden ser reconocidos de manera similar a como lo hacen los patrones moleculares asociados a daño

(DAMPs). Los DAMPs son moléculas conservadas evolutivamente que se originan dentro de las células y permiten al organismo reconocer y diferenciar el daño propio o daños celulares asociados a estrés mecánico cuando son detectadas en espacios extracelulares y cuando son componentes mitocondriales o del núcleo detectados en citoplasma (Ferrusquía et al., 2020). Estas moléculas se liberan durante la lisis celular, lo que posibilita un reconocimiento indirecto de patógenos y células dañadas. Este proceso informa sobre el estado de estas células a otras cercanas, cuando son detectadas en espacios que van más allá de su función habitual dentro de la célula. Se han identificado diversos DAMPs en plantas como lo pueden ser la sucrosa, nucleótidos como el ATP o ADN extracelulares así como proteínas y péptidos pequeños (Ferrusquía et al., 2020).

El presente trabajo tiene como objetivo evaluar el efecto de la aplicación del ADN propio de Bc-A, previamente aislada por Solano- Alvarez et al., 2021, en la señalización o activación de mecanismos de defensa, promoción del crecimiento bacteriano, síntesis de enzimas relacionadas con metabolismo o respuestas al estrés. La metodología propuesta en este trabajo no sugiere daños o alteraciones futuras en el ecosistema donde es aplicada, de manera contraria a los efectos que tiene el uso de productos químicos fertilizantes y pesticidas, ya que el ADN propio simplemente funciona como señalizador de estrés de manera especie específico y no se acumula en los suelos (Mazzoleni et al., 2014). Los microorganismos solubilizadores de fosfato prometen una mejor alternativa a este problema y a la obtención de mejores rendimientos.

II. ANTECEDENTES

Generalidades de *Bacillus cereus*

Bacillus cereus es una bacteria Gram-positiva de forma alargada, que exhibe un crecimiento robusto en placas de agar Luria-Bertani (LB). Bajo el microscopio, se observa en forma de varillas rectas, con extremos cuadrados, dispuestas individualmente o en cadenas cortas (Marollo, 2016). En entornos líquidos como fluidos clínicos o cultivos en caldo, estos bacilos son móviles, aunque su motilidad es lenta. Esta bacteria es un microorganismo facultativo aerobio y esporulante, ampliamente distribuido en el medio ambiente natural (Marollo, 2016), con la capacidad de formar esporas, lo que le confiere la habilidad de sobrevivir en condiciones de temperaturas extremas (McDowell et al., 2023).

La resistencia de *Bacillus cereus* a los procesos de pasteurización en alimentos se ha asociado con casos de intoxicación alimentaria en seres humanos. A pesar de que la tasa de mortalidad por infecciones de *B. cereus* es baja, el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Estados Unidos informó de 7385 casos entre 1998 y 2015, con un total de 63,400 casos a nivel mundial (McDowell et al., 2023). Estos incidentes han consolidado su relevancia clínica, estimulando la investigación científica orientada a identificarla y comprender su contenido genético. Este esfuerzo busca obtener conocimientos fundamentales para prevenir o contrarrestar las infecciones ocasionadas por esta bacteria.

Antes de 1998, el grupo *Bacillus* se dividía en cuatro grupos distintos, diferenciados por la apariencia morfológica de las colonias en cultivos sólidos de agar LB, su capacidad hemolítica en agar sangre, y las condiciones específicas de temperatura u oxigenación requeridas para su crecimiento, ya que estas características son variables entre cepas (McDowell et al., 2023). Posteriormente, a partir de ese mismo año, se implementaron métodos moleculares para su identificación y diferenciación, tales como la secuenciación del ARN ribosomal 16S (Johnson et al., 2019), la reacción en cadena de la polimerasa y marcadores moleculares específicos (Ehling-Schulz et al., 2019).

Los estudios de Fox et al., 1992 revelaron que *B. cereus* es cercano fenotípica y genéticamente (basado en el análisis del ARNr 16S) a otras especies de *Bacillus*, especialmente a *Bacillus anthracis*. De hecho, hoy en día se sabe que no es realmente una única bacteria, sino que en realidad representa un amplio grupo de bacterias, que incluye ocho especies: *B. cereus*, *B. anthracis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus cytotoxicus* y *Bacillus toyonensis* (Jiménez et al., 2013).

La categorización de las especies dentro del grupo *Bacillus spp.*, como *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis*, ha generado debates debido a estudios que indican una ausencia de justificación taxonómica clara para su separación. Se sugiere que estas especies podrían no estar claramente diferenciadas a nivel cromosómico, ya que sus rasgos distintivos parecen estar vinculados a genes plasmídicos en lugar de secuencias cromosómicas (Jiménez et al., 2013).

Esta discrepancia ha impulsado la categorización de dichas especies y la identificación de sus variantes en base a características fenotípicas y a su relevancia clínica y económica, especialmente asociadas con el contenido de plásmidos. Por ejemplo en *B. anthracis*, se encuentran dos plásmidos grandes, pXO1 (182 kb) y pXO2 (95 kb), que llevan genes estructurales para proteínas tóxicas y genes biosintéticos para la formación de la cápsula, respectivamente. Por su parte, las cepas eméticas de *B. cereus* albergan el plásmido pCER270, que contiene componentes enzimáticos para la biosíntesis de la toxina cereulida sin utilizar los ribosomas. Además, *B. thuringiensis* posee múltiples plásmidos con una amplia gama de toxinas insecticidas Cry y Cyt, generando el característico cristal parasporal de la especie (Ehling-Schulz et al., 2019). Las otras cinco especies se distinguen por características morfológicas o fisiológicas únicas. Por ejemplo, *B. mycoides* y *B. pseudomycoides* exhiben un tipo de crecimiento con estructuras similares a raíces, las cepas de *B. weihenstephanensis* son capaces de sobrevivir a bajas temperaturas. En contraste con las cepas de *B. cytotoxicus* que son tolerantes a temperaturas más altas, alcanzando hasta 50 °C. Finalmente, *B. toyonensis* ha sido identificado por sus propiedades probióticas y se emplea con este propósito en la alimentación de animales (Jiménez et al., 2013; Johnson et al., 2019).

Como se ha establecido anteriormente, el papel de los plásmidos en la expresión de la virulencia es importante para la identificación de cepas y sumamente crucial dentro del grupo *B. cereus*. Por ejemplo, los genes responsables de la síntesis de la toxina emética (cereulida) se encuentran en un plásmido grande casi exclusivamente en un grupo monomórfico de *B. cereus* (Hoton, 2005). Sin embargo, la tipificación multilocus (MLST) ha identificado cepas productoras de cereulida que pertenecen a un clúster filogenético diferente al grupo emético principal mencionado anteriormente (Hoton, 2005). Además, se ha observado que dos cepas de *B. weihenstephanensis* producen cereulida y también llevan el gen *cesB*, lo que complica la clasificación de estas especies (Jiménez et al., 2013).

Sin embargo, la identificación basada en el contenido de plásmidos y características morfológicas o fisiológicas específicas puede ser engañosa y llevar a conclusiones subjetivas. Por consiguiente, se ha propuesto que *B. cereus* emético difiere de las

cepas no eméticas en propiedades fenotípicas como la hemólisis, la hidrólisis de almidón, la actividad lecitinasa y el rango de temperatura para el crecimiento (Jiménez et al., 2013). De esta manera, aunque se ha sugerido que *B. cereus*, *B. thuringiensis* y *B. anthracis* sean considerados una sola especie, basados en la evidencia genética, hasta el momento no hay consenso en este asunto. Por un lado la investigación genómica sugiere que el grupo *B. cereus* se considere como una sola especie, por el otro existe aún un argumento sólido que respalda la nomenclatura actual apoyado en las diferencias en las secuencias plasmídicas y se quieren evitar confusiones innecesarias al renombrar estas bacterias (Marrollo, 2016) pues continua siendo innegable la importante necesidad de diferenciar las especies de *Bacillus* como patógenos de humanos y aquellas con fines agrícolas (relacionadas con sus propiedades de biocontrol y biofertilización) ya que numerosas cepas tienen relevancia económica al ser utilizadas como probióticos para prevenir trastornos intestinales. Incluso existe una variante de *Bacillus* llamada “toyoi” que de hecho, fue aprobada por el Ministerio de Agricultura y Silvicultura de Japón como el producto comercial TOYOCERIN® (SAVINI et al., 2013). Sus esporas se han utilizado en la nutrición de animales, especialmente en aves de corral, cerdos, ganado y conejos, pues debido a la resistencia de sus esporas garantiza que las bacterias sobrevivan a los procesos de digestión de los animales y se establezcan a su vez que estabilizan la flora intestinal contribuyendo a mejorar la salud gastrointestinal y el sistema inmunitario, lo que incrementa la productividad de los animales (Jimenez et al., 2013).

***Bacillus cereus* como PGPR**

Uno de los precedentes fundamentales en la investigación sobre las bacterias PGPR se encuentra en el estudio realizado por Kloepper y Schroth, 1978. Este examen fue uno de los primeros que demostró sistemáticamente que ciertas bacterias presentes en las raíces de las plantas podían fomentar activamente su crecimiento. En este análisis, los autores aislaron bacterias de las raíces del rábano y las caracterizaron por su habilidad para impulsar el desarrollo vegetal. Observaron que algunas de estas bacterias (identificadas posteriormente como PGPR) tenían la capacidad para generar compuestos estimulantes del crecimiento vegetal como auxinas, hormonas orgánicas principalmente ácidos indolacéticos implicados en el progreso vegetal; además competían con patógenos del suelo lo cual resultaba en una mayor salud de las plantas del rábano.

Hoy en día, sabemos que *Bacillus cereus* tiene implicaciones en la agricultura, tanto positivas como negativas. Su relevancia en este campo se debe a varios factores,

uno de ellos es que algunas cepas de *B. cereus* y *B. thuringiensis* tienen la capacidad de promover el crecimiento de las plantas. Un ejemplo de esto son las plantas de soya tratadas con una bacteriocina producida por la PGPR *Bacillus thuringiensis*, las cuales mostraron menos estrés causado por déficit de agua y un incremento en la tasa de fotosíntesis (Babalola et al, 2010). Incluso se ha visto que estos microorganismos pueden colonizar las raíces de las plantas y facilitar la absorción de nutrientes, como el fósforo y el hierro. Además, estas bacterias han mostrado mejorar de manera directa la absorción de nutrientes del suelo en las plantas como la soya, el pimiento, habas y sorgo (Nazari & Smith, 2020). Se ha visto que la co-inoculación de bacteriocinas con *Bradyrhizobium japonicum* aislado de los nódulos de soya, favoreció la formación de nódulos en la planta, lo que se traduce a una mayor captación de nitrógeno (Prudent et al., 2014). Aunado a esto, tanto *B. cereus* como *B. thuringiensis* son conocidos por su capacidad para actuar como agentes de control biológico en la agricultura, ya que algunas cepas producen antibióticos y enzimas que pueden suprimir patógenos de las plantas, como hongos y bacterias perjudiciales (Marrollo, 2016). Esto reduce la necesidad de utilizar productos químicos sintéticos, lo cual es beneficioso para los modelos de agricultura sostenible.

Diversos estudios han demostrado que un manejo de las comunidades microbianas en la rizósfera contribuye en el campo como control de enfermedades, revelando que la inoculación con biofertilizantes orgánicos reduce significativamente la prevalencia de *Fusarium* en tomates (Solano-Alvárez et al., 2021, Whang et al., 2012, Zhang et al., 2019, Nazari & Smith 2020).

Por otra parte, si bien *B. cereus* generalmente no es un patógeno de plantas, puede ser un contaminante de alimentos. Sus esporas resistentes al calor pueden sobrevivir en suelos agrícolas y si no se toman medidas adecuadas de higiene durante la cosecha y el procesamiento, pueden contaminar alimentos como cereales, arroz y legumbres, lo que lleva a intoxicaciones alimentarias (Lotte et al., 2008). De hecho, uno de los antecedentes clave que condujo a la investigación y el conocimiento acumulado sobre *Bacillus cereus* se relaciona con los brotes de intoxicación alimentaria y las infecciones asociadas a este microorganismo, tan solo en Estados Unidos se reportaron 63,400 casos anuales de enfermedad por *B. cereus* desde 2005 hasta 2007 (MacDowell et al., 2023). Este incidente marcó uno de los primeros eventos documentados en los que *Bacillus cereus* se asoció directamente con la intoxicación alimentaria y las infecciones en humanos. A partir de este suceso se intensificaron las investigaciones sobre este microorganismo en

las que se profundizó en la comprensión de sus características morfológicas, su ecología y sus mecanismos de patogenicidad (Anderson et al, 1943).

Bacterias PGPR en su uso como biofertilizantes

Anteriormente, se asociaban como biofertilizantes a una amplia gama de sustancias como extractos de algas marinas, desechos urbanos compostados, mezclas microbianas con componentes no identificados y formulaciones de fertilizantes químicos que incluyen compuestos orgánicos como proteínas y vitaminas. Sin embargo, el trabajo de Vessey et al., 2003 propone redefinir a los biofertilizantes como una sustancia que contiene microorganismos vivos que, al ser aplicados a semillas, superficies de plantas o suelos, colonizan la rizósfera o el interior de la planta, estimulando así el crecimiento, al mejorar la disponibilidad de nutrientes esenciales para la planta huésped. Se establece que no todas las PGPR pueden ser consideradas como biofertilizantes, debido a la existencia de bacterias que fomentan el desarrollo de las plantas al controlar la presencia de organismos patógenos en ellas. Por lo tanto, estas bacterias son denominadas como biopesticidas en lugar de biofertilizantes.

Los biofertilizantes son generalmente aplicados en forma sólida o seca tras mezclar los microorganismos vivos con materiales adecuados para que incrementen el tiempo de vida de los microorganismos empaquetados y faciliten la manipulación al momento de la inoculación. Algunos de los materiales más utilizados son minerales de arcilla, salvado de trigo o arroz, humus y carbón vegetal (Chaudhary e al., 2022). Existen diversos tipos de biofertilizantes y son agrupados en base a sus funciones y mecanismos de acción, por ejemplo están los más comunes que son aquellos que mejoran la captación de nitrógeno compuestos principalmente por microorganismos de vida libre y simbiótica que tienen la capacidad de incrementar el nitrógeno disponible en el suelo para las plantas mediante la fijación de nitrógeno atmosférico, los que mejoran la disponibilidad de nutrientes a través de la movilización de fósforo orgánico del suelo a la rizósfera de las plantas compuestos principalmente por micorrizas, otros promueven el crecimiento de las plantas directamente al estar conformado por microorganismos que producen o secretan hormonas de crecimiento como las rizobacterias y finalmente están los que mejoran la absorción de nutrientes al solubilizar compuestos inorgánicos del suelo como el fósforo, potasio, zin y azufre (Daniel et al., 2022).

La relación entre las PGPR y las plantas huéspedes se pueden clasificar en dos niveles de complejidad: el nivel rizosférico, que son aquellas bacterias que crecen en la primera zona cercana o sobre las raíces de las plantas, donde metabolizan o

secretan sustancias que interactúan con ellas. El nivel endofítico que estrictamente se refiere a las bacterias que se desarrollan dentro de las plantas en los espacios intercelulares (Vessey et al., 2003).

Diversos estudios han demostrado que la presencia de bacterias PGPR aumenta significativamente la capacidad fijadora de nitrógeno y la absorción de nutrientes en las plantas (Nazari & Smith, 2018). Dentro de estos nutrientes se encuentra el fósforo, que es el segundo mineral más importante, después del nitrógeno y suele limitar el crecimiento de las plantas terrestres. Aunque irónicamente, los suelos generalmente tienen grandes reservas totales de fósforo, la cantidad disponible para las plantas es una fracción muy pequeña de ese total, debido a que la mayor parte de este elemento en el suelo se encuentra en formas insolubles y las plantas solo pueden absorber fósforo de iones monobásicos y dibásicos (Vessey et al., 2003).

En la rizósfera, es común encontrar bacterias capaces de solubilizar el fósforo insoluble como parte de su metabolismo, por lo que una forma común en la que facilitan esta conversión de formas insolubles de fósforo a formas disponibles para las plantas es mediante la secreción de ácidos orgánicos y fosfatasas, haciendo que la solubilización del fósforo en la rizósfera sea el mecanismo de acción más frecuente asociado a las bacterias PGPR (Babalola et al., 2010).

Uno de los pilares fundamentales en el uso de biofertilizantes bacterianos se encuentra en la investigación llevada a cabo por Bhardwaj y colaboradores en el año 2020. Este estudio resalta el creciente valor de estos productos en el contexto de la agricultura sostenible, profundizando en su papel crucial para potenciar la fertilidad del suelo, fortalecer la resistencia de las plantas frente a situaciones de estrés y elevar el rendimiento general en la producción agrícola. Finalmente, Ahemad et al en el año 2014 revisan de manera exhaustiva la literatura científica actual sobre el uso de biofertilizantes bacterianos y resaltan sus beneficios en la agricultura moderna. Los autores enfatizan cómo estos biofertilizantes pueden mejorar la disponibilidad de nutrientes para las plantas, promover el crecimiento de las raíces, aumentar la resistencia de las plantas a enfermedades y estrés abiótico además de reducir la dependencia de fertilizantes químicos. Estas referencias y estudios adicionales refuerzan la importancia y el potencial de los biofertilizantes bacterianos en la agricultura moderna, subrayando su contribución a la sostenibilidad, la eficiencia en el uso de recursos y la reducción de la huella ambiental de la agricultura convencional.

En resumen, el uso de biofertilizantes bacterianos se ha convertido en un componente esencial de las prácticas agrícolas sostenibles en la actualidad y la literatura científica continúa aportando evidencia sobre su eficacia y ventajas en la agricultura moderna. El uso de biofertilizantes bacterianos ha experimentado un

crecimiento significativo en las últimas décadas debido a su capacidad para mejorar la calidad del suelo, aumentar la disponibilidad de nutrientes para las plantas y reducir la dependencia de fertilizantes químicos.

ADN propio como señalizador de estrés

El ácido desoxirribonucleico (ADN) ha sido considerado durante mucho tiempo como la molécula de la vida. Incluso antes de comprender completamente su estructura, ya se había identificado su función como portadora de información genética, proporcionando las instrucciones necesarias para la síntesis de proteínas. Sin embargo, persistían incógnitas sobre las propiedades fisicoquímicas y estructurales esenciales para su función. En 1953, el trabajo premiado de Watson & Crick reveló que el ADN está compuesto por dos cadenas helicoidales de polinucleótidos, cada una formada por cuatro tipos de nucleótidos con bases nitrogenadas: adenina (A), timina (T), guanina (G) y citocina (C), unidas por puentes de hidrógeno (Alberts et al., 2007).

En células eucariotas, el ADN reside en el núcleo lipídica con poros una membrana de doble capa entre el núcleo y citosol. Factores de transcripción, mediante receptores de membrana o translocadores, llegan al núcleo para iniciar la síntesis de proteínas, las cuales a través de interacciones bioquímicas y biofísicas participan en un sin fin de procesos celulares (Alberts et al., 2007). Procesos como la replicación y transcripción del ADN son esenciales para el correcto funcionamiento celular, por lo que es necesario para la célula asegurarse de mantener la integridad del ADN correctamente (Matthew et al., 2005). Estos procesos celulares son algunos de los más importantes relacionados con el ADN, pues los cambios estructurales en el mismo impactan severamente su función y obstaculizan una correcta replicación y transcripción, jugando un papel importante en el desarrollo de enfermedades relacionadas con el envejecimiento e hiperproliferación celular como lo es el cáncer (Matthew et al., 2005; Ju et al., 2014).

Los errores durante la replicación, recombinación descontrolada e inducción a mutaciones son atribuidos a múltiples factores como pueden ser errores cometidos por la polimerasa de ADN, exposición a luz ultravioleta, radiación ionizante, químicos tóxicos y por la presencia excesiva de especies reactivas de oxígeno. Pese a los variados factores de daño al ADN son escasos y fácilmente controlables en la gran mayoría de los casos, esto es debido a que la célula cuenta con diversos mecanismos de respuesta al daño como un pre-requisito esencial para preservar la integridad celular y del propio organismo (Giglia-Mari et al., 2011).

Múltiples mecanismos como la reparación por escisión de bases (BER), la reparación por escisión de nucleótidos, metilación específica dirigida, enzimas de restricción y ARN interferente participan en la reparación y eliminación de ADN dañado (Ferrusquía-Jiménez et al., 2021; Giglia-Mari et al., 2011).

Para que se efectúe la acción de un mecanismo de reparación del daño al ADN antes de que este sea replicado o la célula se divida, el daño en primera instancia debe ser detectado. En este sentido activación de vías de transducción de señales juega un papel importante al iniciar la inducción al arresto celular y la producción de proteínas específicas, un ejemplo de esto es la proteína IP3 que gracias a que durante el desarrollo de células tumorales es sobre expresada se ha convertido hoy en día en un marcador tumoral (Bartek, 2007). Y como esta existen muchas otras moléculas indicadoras de daño al ADN cuyas vías de señalización río abajo ya han sido determinadas, la manera en que interaccionan y se comunican con la célula aún está lejos de ser un asunto resuelto.

Por otra parte, así como dentro del núcleo a nivel de la cromatina ocurre la activación de mecanismos de reparación al daño del ADN mediante la activación de señales de transducción, estas mismas vías de señalización pueden ser activadas desde el exterior de la célula dando lugar a otro tipo de reconocimiento del daño celular.

Los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) son moléculas que activan la respuesta del sistema inmune innato de los organismos de manera indirecta que en contraste con los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) que indican la presencia de patógenos a través de la detección de proteínas específicas como el lipopolisacárido que forma parte de la membrana celular de bacterias Gram negativas (Farhana & Khan, 2023), las DAMPs indican el daño celular, ambas moléculas son de gran importancia pues permiten la adaptación del sistema inmune innato a respuestas mas rápidas, específicas y efectivas para reducir la severidad de enfermedades infecciosas (Jong & Dong, 2018). Moléculas como el ADN no metilado, proteínas de movilidad intracelulares, fibrinógeno, globulinas, proteínas asociadas a histonas entre otras desencadenan respuestas inmunitarias cuando se encuentran en el espacio extracelular, señalizando estrés celular y activando principalmente vías de señalización pro-inflamatorias (Barbero et al., 2016; Ferrusquía-Jiménez et al., 2021). Las moléculas DAMPs son detectadas mediante receptores de reconocimiento de patrones, varias familias de este tipo de receptores han sido identificadas y su principal función es reconocer moléculas asociadas al daño y moléculas asociadas a patógenos (Land, 2015). Como es el caso de los receptores tipo Toll (TLRs) que están presentes en la membrana extracelular de los

macrófagos y estimulan la fagocitosis mediante la activación de vías de señalización. Los TLRs son glicoproteínas transmembranales que se clasifican de acuerdo a su localización, están aquellas que se encuentran ubicadas en la superficie celular como lo son TLR 1, 2, 4, 5, 6 y 10 y también se pueden encontrar en membranas intracelulares como TLR 3, 7, 8, y 9 (Jong & Dong, 2018).

Al ser el ADN una molécula confinada dentro del núcleo celular, cuando es detectado de manera extracelular la célula lo interpreta como una señal de lisis celular o apoptosis (Ferrusquía et al., 2020). En diversos reportes se sugiere que el ADN homólogo o propio por sí mismo es capaz de fungir como un señalizador de daño y actúa como un patrón molecular asociado al daño (DAMP) extracelularmente (Vega-Muñoz et al., 2018; Duran-Flores et al., 2018). Se ha mostrado que este ADN propio extracelular tiene la capacidad de ser absorbido tanto por células eucariotas como procariontes y desempeña funciones de señalización que resultan en la producción y activación de enzimas antioxidantes relacionadas con la respuesta al estrés celular (Carteni et al., 2015; Ferrusquía-Jiménez et al., 2022; Mazzoleni et al., 2015; Solano-Alvarez et al., 2021).

El trabajo de Mazzoleni et al., 2015a mostró que el ADN fragmentado proveniente de la hojarasca en el suelo es capaz de actuar con un señalizador de estrés y desencadenar la inhibición del crecimiento y mejora la tolerancia a condiciones adversas en plantas, revelando así nuevo rol funcional del ADN de autotoxicidad.

La autotoxicidad es descrita por Mazzoleni et al., 2015a como un fenómeno comúnmente observado en los ecosistemas, especialmente en plantas, se manifiesta cuando una especie vegetal, en respuesta a situaciones de peligro o competencia interespecífica, ajusta sus procesos celulares y requerimientos nutricionales para asegurar su supervivencia, menguando su crecimiento en tamaño pero mejorando su resistencia y tasa de supervivencia. Modelos matemáticos y observaciones en la naturaleza sugieren la existencia de un mecanismo mediado por moléculas específicas que permite a las plantas adaptarse a condiciones adversas (Mazzoleni et al., 2010).

El estudio de Mazzoleni et al., 2015a, identificó al ADN, tanto propio como no propio, como la molécula responsable de orquestar la autotoxicidad observada. Extrayendo ADN de la hojarasca, se probó la hipótesis con 20 especies de plantas, incluyendo *Acanthus mollis*, *Alnus cordata* y *Castanea sativa*. Los resultados demostraron que el ADN propio fragmentado, especialmente moléculas pequeñas de 50 a 2000 pb, inhiben el crecimiento de las plantas de manera dependiente de la concentración y la especie, a diferencia del ADN no propio fragmentado (Mazzoleni et al., 2015a).

En investigaciones posteriores (Mazzoleni et al., 2015b), se amplió el análisis a hongos, bacterias, protozoarios, algas e insectos, confirmando que el ADN propio fragmentado tiene efectos inhibitorios en sistemas biológicos de diversos grupos taxonómicos. Este hallazgo sugiere que la autotoxicidad podría ser un mecanismo biológico de adaptación, planteando la posibilidad de utilizar el ADN como control biológico o elicitor (Mazzoleni et al., 2015b; Carteni et al., 2016). Este descubrimiento abre nuevas vías de investigación sobre los mecanismos moleculares subyacentes y genera nuevas preguntas.

Gracias a estas investigaciones, ahora sabemos que las moléculas de ADN extracelular propio pueden ser detectadas y absorbidas por células tanto procariotas como eucariotas (Carteni et al., 2015). Desencadenan respuestas de autotoxicidad en organismos de diversos grupos taxonómicos de manera dependiente de concentración (Mazzoleni et al., 2015 ab) además, que dentro del organismo, cumplen funciones específicas de señalización, activando la producción de enzimas para hacer frente al estrés (Ferrusquía-Jiménez et al., 2022; Mazzoleni et al., 2015; Solano-Alvarez et al., 2021).

III. JUSTIFICACIÓN

La planeación nacional del departamento de agricultura mexicana para el tomate espera un crecimiento en la demanda de exportación de 8.912 a 11.21 millones de toneladas para el año 2030, dentro de sus objetivos para la región número 23 que comprende a los estados de Querétaro, Nuevo León y San Luis Potosí, para mantener los niveles de producción dentro de la agro-industria señalan que se deben invertir fondos en generar una cultura de monitoreo para la identificación preventiva de plagas y enfermedades, incrementar el rendimiento y mejorar la calidad e inocuidad del producto mediante la introducción de paquetes tecnológicos y estrategias novedosas (Narvaez., 2017) . Lo cual implica un área de oportunidad para las propuestas innovadoras de agricultura.

La aplicación de ADN propio fragmentado como tratamiento no sugiere daños o alteraciones futuras en el ecosistema donde es aplicada, de manera contraria a los efectos que tiene el uso de productos químicos fertilizantes y pesticidas. Los microorganismos solubilizadores de fosfato prometen una mejor alternativa a este problema y a la obtención de mejores rendimientos al momento de la cosecha. Este proyecto permite indagar sobre una posible estrategia innovadora y amigable con el medio ambiente para la elicitación de las capacidades benéficas de la bacteria Bc-A que, como se ha revisado anteriormente en los trabajos de Solano-Alvarez et al., 2021 y Ferrusquía-Jiménez et al., 2022, podría brindar una nueva herramienta agrícola para integrarse en los programas de manejo integrado de enfermedades agrícolas, formando parte de los esquemas de biocontrol.

IV. HIPÓTESIS

La exposición de Bc-A a fragmentos de ADN promueve su capacidad bioestimulante, a través de la elicitación de su crecimiento, actividad enzimática antioxidante, solubilización de fosfatos y secreción de giberelinas.

V. OBJETIVOS

-Objetivo general

Determinar el efecto que tiene la exposición de Bc-A al ADN propio en su crecimiento, actividad antioxidante, solubilización de fosfatos y secreción de giberelinas.

-Objetivos individuales

Evaluar el efecto de aplicación del ADN propio *in vitro* sobre el crecimiento de la bacteria Bc-A.

Determinar el efecto del ADN propio de Bc-A para mejorar su capacidad de solubilización de fosfato de calcio.

Medir los efectos en la actividad antioxidante de Bc-A tras ser elicitada con ADN propio.

Determinar el efecto en la producción de giberelinas de Bc-A tras ser elicitada con ADN propio.

VI. METODOLOGÍA

Mantenimiento y crecimiento de Bc-A

El mantenimiento y crecimiento de la bacteria Bc-A involucró el cultivo de una alícuota del aislado Bc-A (Solano-Alvarez et al., 2021) en caldo Luria Bertani (LB) a 30°C durante 48 horas.

Tras obtener crecimiento de Bc-A en caldo LB tras la inoculación se realizó un precultivo de 250 mL de caldo LB inoculado con Bc-A y tras 48 hrs de incubación a 30°C se guardó en refrigeración para uso posterior.

Extracción de ADN propio de Bc-A

Para la extracción de ADN extracelular propio y no propio y la fragmentación del ADN, se recolectaron pellets del medio de cultivo de la bacteria, después de la centrifugación se pesó la cantidad de biomasa obtenida. Las extracciones se llevaron a cabo mediante el método de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), siguiendo el procedimiento descrito por Lee et al. en 1988. Inicialmente se aplicaron 500uL de buffer CTAB (50 mL Tris pH 8, 20mL EDTA pH 8, 140 mL NaCl, 10 gr CTAB, 5 gr polivinilpolipirrolidona (PVPP) y 2.5 mL 2-mercaptoetanol) por cada 100mg de muestra y se realizó una centrifugación durante 10 min a 10000 g a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo nuevo donde se agregó 1 vol de cloroformo alcohol isoamílico para centrifugar nuevamente ahora a 4°C, 10000 rpm durante 10 min, el nuevo sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo, al cual se le agregaron aproximadamente 9 mL de isopropanol al 70% frío y 1 volumen de acetato de potasio y se incubó a -20°C durante 15 min, posteriormente se realizó una centrifugación a 4°C, 12000 rpm durante 5 min, posteriormente se decantó el sobrenadante y realizar un lavado con etanol al 70% frío, este lavado con etanol fue repetido tres veces. Finalmente se dejó secar el etanol remanente completamente y el ADN recuperado fue resuspendido en 50 mL de agua inyectable. La pureza y concentración del ADN fue determina utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000. Finalmente, la integridad del ADN se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1%, utilizando el método de tinción Gel Red con buffer TAE a 80 V durante 30 min. La obtención de fragmentos del ADN extraído se realizó mediante sonicación, utilizando un sonotrodo Hielscher UP200Ht (200 W, 26 kHz), ajustado a 26 kHz, con pulsaciones de 10 W con una amplitud del 50% durante 10 min, siguiendo el método descrito por Ferrusquía-Jiménez et al. en 2022.

Determinación in vitro del efecto de la concentración de ADN propio en el crecimiento de Bc-A

El ensayo para determinar el crecimiento de Bc-A se realizó mediante una modificación a la metodología de Ferrusquía-Jiménez et al., 2022 y Mazzoleni et al., 2015. Se empleó una cepa activa de Bc-A cultivada previamente en caldo LB para realizar un subcultivo con 100 μ L del precultivo y 200 μ L de medio LB en una placa estéril de 24 pozos. Luego, se agregaron diferentes concentraciones de ADN propio (0, 0.5, 2, 5, 10 y 50 μ g/mL) en volúmenes de 0, 1.34, 5.38, 13, 26.9 y 135 μ L de ADN propio respectivamente, y se ajustó el volumen final a 1000 μ L con agua estéril inyectable. La placa de 24 pozos se incubó a 33°C, con tres réplicas por cada tratamiento más un control con 795 μ L de agua estéril inyectable, 200 μ L de medio LB estéril y 5.38 μ L de ADN propio sin Bc-A. Después de 24 horas de incubación, se tomó una lectura de absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nm con 200 μ L de cada tratamiento de subcultivo.

La recuperación del sobrenadante y células de Bc-A elicitadas por tratamiento se llevó a cabo en tubos Eppendorf, centrifugando durante 10 min a 10,000g, separando finalmente el sobrenadante de los pellets celulares y almacenándolos a -20°C para su uso futuro.

Prueba de solubilidad de fosfatos

Para este ensayo se contó con un total de cuatro grupos experimentales que fueron grupos tratados con 0, 2, 10 y 50 μ g/mL de ADN propio. Dentro de una placa estéril de 24 pozos se colocaron 200 μ L de medio, 100 μ L de precultivo de Bc-A, cuatro diferentes concentraciones de ADN propio diferentes (0, 5.38, 26.9 y 135 μ L) y se ajustó el volumen final a 1000 μ L con agua estéril inyectable, tal como se realizó en el ensayo para medir el crecimiento bacteriano cada grupo de tratamiento se realizó por triplicado, tras 24 horas de incubación a 33 °C se procedió a tomar 60 μ L por tratamiento, los cuales se sembraron en agar Pikovskaya. Previo a sembrar los tratamientos en el agar Pikovskaya se realizaron manualmente tres pozos separados en el agar con una punta de micropipeta, cada pozo con un diámetro aproximado de 15 mm. Una vez realizados los pozos en las placas de agar Pikovskaya se sembraron 20 μ L de cada tratamiento con Bc-A elicitada en cada uno. Este procedimiento se llevó a cabo en dos experimentos independientes, cada uno por triplicado. La solubilización se determinó midiendo el diámetro de las zonas transparentes en el halo de solubilización generado en el medio PVK utilizando una regla. La formación de zonas transparentes alrededor de las colonias bacterianas indicó la solubilización del fosfato inorgánico contenido en el agar PVK.

Cuantificación de las actividades enzimáticas de CAT y SOD

La cuantificación de las actividades enzimáticas de CAT y SOD implicó la obtención de extractos crudos de enzimas a partir del pellet bacteriano recuperado después de los tratamientos en la placa de 24 pozos con ADN propio. Se pesaron aproximadamente 500 mg de muestra y se homogeneizaron con 250 μ L de tampón de fosfato pH 7. El homogeneizado se sometió a sonicación durante 15 min a 10,000 rpm. El sobrenadante se recolectó como extracto enzimático y se almacenó en un nuevo tubo Eppendorf para su posterior análisis.

La actividad de la SOD se determinó mediante la reducción fotoquímica de la inhibición del azul de tetrazolio (NBT; Gao, 2006). La mezcla de la reacción contenía 15 μ L del extracto enzimático, 750 μ L de tampón de fosfato pH 7 a 0.05 M, 150 μ L de EDTA-Na₂ a 0.1 mM, 150 μ L de metionina a 0.13 M, 150 μ L de NBT a 0.75 mM, 150 μ L de riboflavina a 0.02 mM y 135 μ L de agua destilada, en un volumen total de 3 mL. Después de la exposición a la luz durante 15 min, el final de la reacción se indicó por un cambio de color, se midió la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm. Una unidad de SOD se consideró la cantidad de enzima que inhibe la tasa de reducción del NBT en un 50% bajo condiciones de ensayo.

La actividad de la CAD se determinó de manera similar a Beers and Size, 1952. La mezcla de reacción de absorbancia contenía 2.2 mL de tampón de fosfato pH 7, 200 μ L de H₂O₂ a 100 mM y 20 μ L del extracto de enzima. La lectura de absorbancia se realizó de 0 a 6 min en intervalos de 10 segundos en un espectrofotómetro a 240 nm. Una unidad de actividad de CAD se consideró como 1 μ mol de H₂O₂ degradado por minuto. La proteína total se determinó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976). La actividad enzimática se expresó en U/mg por proteína.

Determinación del efecto del ADN propio sobre la producción de Giberelinas (GA3)

En cuanto a la detección de GA3 mediante HPLC, se recolectaron muestras de 1.5 mL del sobrenadante después de la centrifugación de la Bc-A elicitada por los tratamientos en la prueba de crecimiento in vitro en una placa de 24 pozos. Estas muestras se trataron según lo descrito por Escamilla-Silva et al. en 1999. Medio LB no inoculado se utilizó como control experimental. Se utilizó una solución de GA3 (Sigma-Aldrich) como estándar para estos análisis. La cuantificación se realizó en un HPLC de la serie Agilent 1200, UV-VIS 6120 Quadrupole, utilizando una columna Eclipse plus C18 con un tamaño de partícula de 5 μ m. Todos los análisis se llevaron a cabo en triplicado.

La metodología utilizada con HPLC se apoya en el empleo de una fase móvil y otra estacionaria para la separación de los elementos en una mezcla. Una bomba de alta presión hace circular la fase móvil a través del sistema. Los elementos que tienen una mayor preferencia por la fase móvil se desplazarán más rápidamente a lo largo de la columna y tendrán menos interacción con la fase estacionaria.

Una vez que se han separado, un dispositivo detector evalúa la cantidad de los analitos y los transforma en señales eléctricas; la cantidad de cada componente está en proporción a la cantidad que fue separada de la columna.

Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico, se utilizó el software JMP.PRO 16. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para evaluar la tasa de crecimiento, a las 24 hrs la capacidad de solubilización de fosfato y los datos de SOD y CAT. Las medias se compararon mediante la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

VII. RESULTADOS

Evaluación del efecto del ADN propio sobre el crecimiento de Bc-A

Tras la aplicación de ADN propio como tratamiento a diferentes concentraciones (0, 0.5, 2, 5, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se determinó el crecimiento bacteriano a través de valores dados por densidad óptica obtenidos mediante un espectrofotómetro, lo cual es un método común para medir el crecimiento de una bacteria, mientras mayor sea la densidad óptica (DO) en la que se detecte la bacteria mayor es la densidad bacteriana e indica un mayor crecimiento. Se colocaron 200 μL de cada tratamiento por triplicado tras las 24 hrs de elicitación con ADN propio en una placa de 96 pozos y posteriormente se midió la DO a 600 nm. Para el tratamiento 0 donde no se aplicó ninguna concentración de ADN propio se observó una DO de 216 nm, siendo este el grupo que menor crecimiento tuvo. En el tratamiento con 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN propio se observó un incremento ligero en el crecimiento a una mayor DO un poco por encima al tratamiento de 0 con un valor promedio de DO de 336 nm, el tratamiento con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN propio aumentó su crecimiento considerablemente a una DO promedio de 536 nm, mientras que para el tratamiento con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN propio hubo una disminución en el crecimiento bacteriano con un valor promedio de DO de 438 nm, finalmente, para los tratamientos con 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN propio nuevamente se observó un aumento en el crecimiento bacteriano con valores promedio en DO de 531 nm y 641 nm, respectivamente. El análisis de varianza reveló que el crecimiento entre la mayoría de los tratamientos es diferente significativamente, excepto para los tratamientos con 2 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN propio, que fueron muy parecidos entre sí. En la Figura 1 se muestra como el crecimiento de Bc-A varía dependiendo de la concentración de ADN propio utilizada. Los tratamientos con 2, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN propio, donde se aplicó mayor concentración de ADN propio son también los tratamientos que indicaron mayores valores de DO promedio en crecimiento. De manera contraria, los tratamientos con menores concentraciones de ADN propio aplicadas que fueron 0 y 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN propio también reflejaron valores menores en crecimiento.

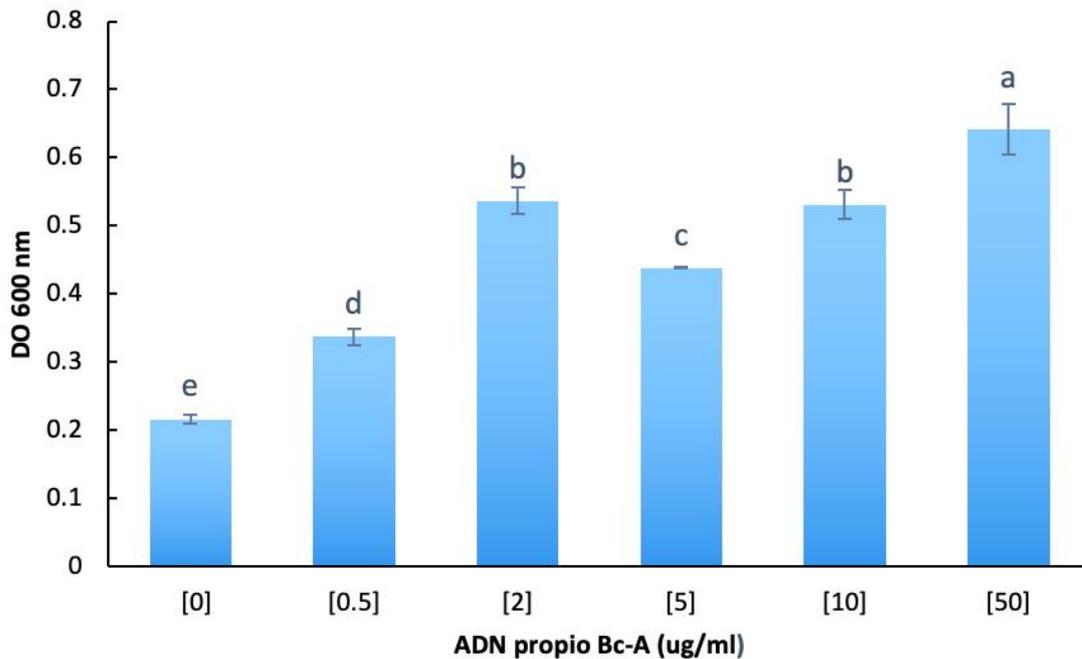


Figura 1. Crecimiento de Bc-A a diferentes concentraciones de ADN propio (0, 0.5, 2, 5, 10 y 50 µg/mL de ADN propio) tras 24hr de exposición en incubación a 30°C. Podemos observar que en una densidad óptica de 600 nm el crecimiento de los grupos fue diferente dependiendo de la concentración de ADN propio utilizada. Letras diferentes indican diferencia significativa. Análisis ANOVA-Tukey 95% de IC.

Determinación del efecto del ADN propio sobre la actividad específica de SOD

La actividad específica de SOD se presenta en unidades por miligramo en Bc-A elicitada a cuatro diferentes concentraciones de ADN propio que fueron con 0, 2, 10 y 50 µg/mL de ADN propio. Los valores promedio de actividad específica de SOD fueron los mostrados en la Tabla 1.

Después de realizar un análisis estadístico y la prueba de Tukey-Kramer, se destacan diferencias significativas en la actividad específica de SOD en los tratamientos con 2 y 10 µg/mL de ADN propio, ya que sobrepasó significativamente a los valores de los tratamientos con 0 y 50 µg/mL de ADN propio, además, entre los grupos de tratamiento con 0 y 50 µg/mL de ADN propio, también se vieron diferencias significativas indicando que en comparación con el grupo de tratamiento control, donde no se aplicó ninguna concentración de ADN propio. Los otros grupos de tratamiento con 2, 10 y 50 µg/mL de ADN propio mostraron una mayor actividad específica de SOD, lo que indica que existen procesos de respuesta al tratamiento utilizado. En resumen podemos observar en la Figura 2 que al utilizar concentraciones de entre 2 y 10 µg/mL de ADN propio se potencia la actividad específica de SOD, mientras que para concentraciones más elevadas de 50 µg/mL

de ADN propio pareciera producir el efecto contrario disminuyendo la actividad específica de SOD.

Tabla 1. Valores promedio de actividad específica de SOD obtenidos por tratamiento

Tratamiento $\mu\text{g/mL}$ de ADN propio	Actividad Específica promedio de SOD (U/mg)
0	0.0012
2	0.0109
10	0.0105
50	0.0051

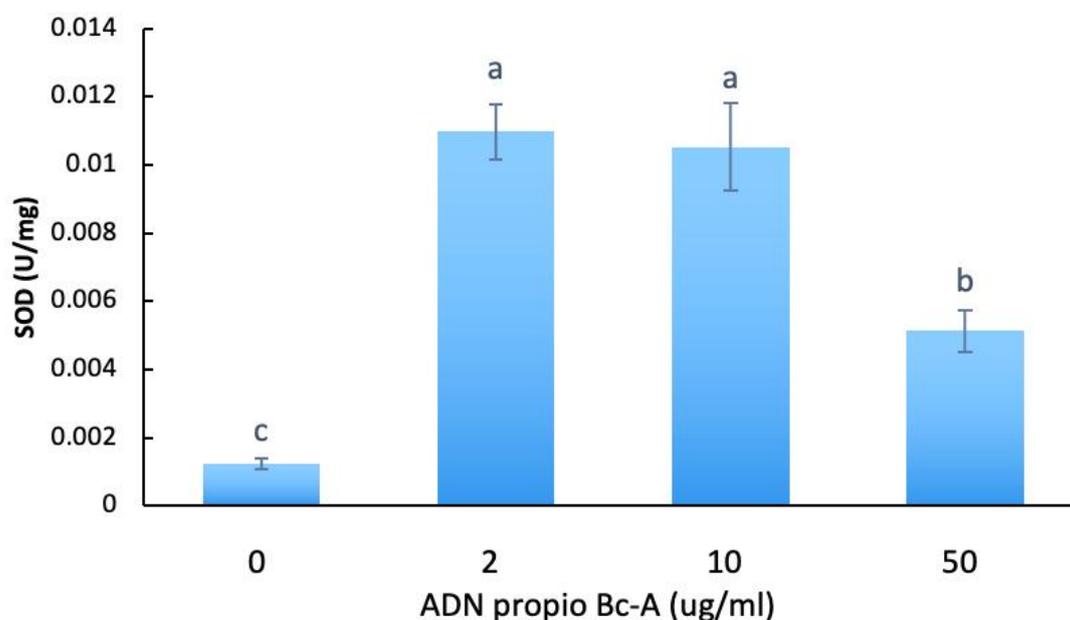


Figura 2. Actividad de la superóxido dismutasa en unidades sobre miligramo sobre Bc-A elicitada con ADN propio en cuatro grupos de tratamiento (0, 2, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN propio). Podemos observar diferencias significativas principalmente entre los tratamientos con 50 y 0 $\mu\text{g/mL}$ de ADN propio, siendo que los tratamientos con 2 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de ADN propio no tuvieron diferencias significativas. Letras diferentes indican diferencia significativa. Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC.

Determinación del efecto de la concentración del ADN propio sobre la actividad de la enzima CAT

En el tratamiento control con 0 µg/mL de ADN propio, donde no se aplicó ninguna concentración de ADN propio sobre Bc-A obtuvimos que la actividad enzimática de CAT promedio fue de 2.099 U/mg. El tratamiento 2 donde se aplicó una concentración de 2 µg/ml de ADN propio, y se observó una actividad de 1.983U/mg la cual tras la prueba de Tukey no mostró tener diferencias significativas en comparación con el tratamiento con 0 µg/mL de ADN propio, pero si en comparación con los tratamientos con 10 y 50 µg/mL de ADN propio. El tratamiento con 10 µg/mL de ADN propio mostró una actividad enzimática de CAT promedio de 2.454 U/mg, y finalmente el tratamiento con 50 µg/mL de ADN propio tuvo una actividad enzimática de CAT promedio de 2.727 U/mg. En la Figura 3 se muestra gráficamente como los tratamientos con 10 y 50 µg/mL de ADN propio con mayor actividad promedio de CAT y tras la prueba de Tukey ambos tratamientos demostraron ser significativamente diferentes entre sí y en comparación con los tratamientos con 0 y 2 µg/mL de ADN propio.

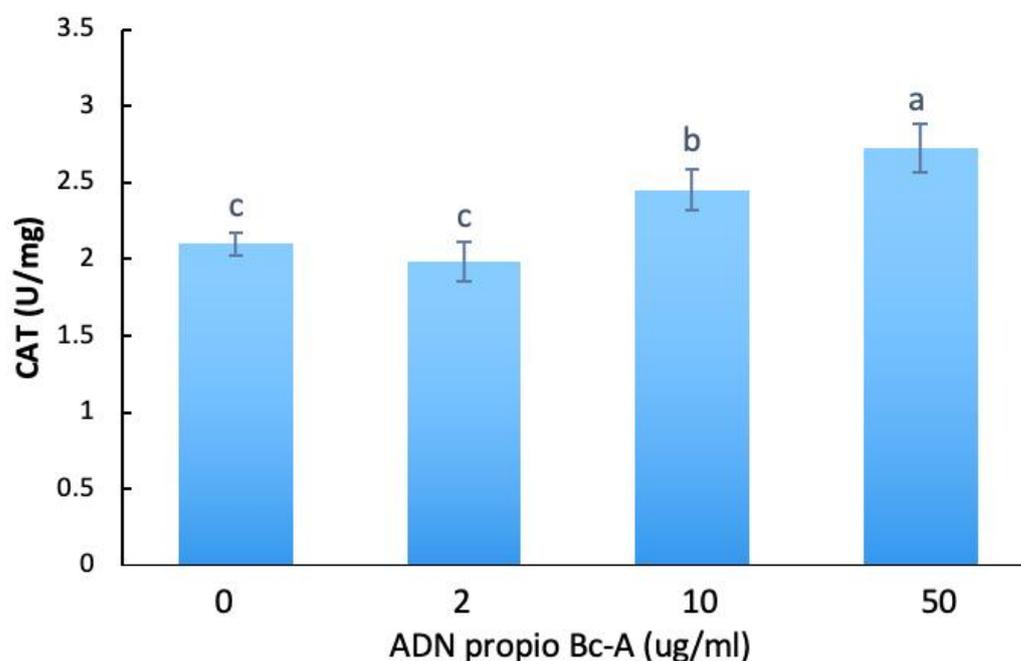


Figura 3. Actividad de la catalasa en Bc-A expresada en unidades sobre miligramo para cuatro grupos diferentes de tratamiento con concentraciones de 0, 2, 10 y 50 µg/mL de ADN propio. Letras diferentes indican diferencia significativa. Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC

Evaluación del efecto del ADN propio sobre la capacidad de solubilización de fosfato de calcio

Tras medir los diámetros de solubilización en las placas se observó un aumento en la capacidad de solubilización de fosfato de calcio de Bc-A tras los tratamientos con ADN propio. Sin embargo, este estudio no fue capaz de encontrar diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas de ADN propio. En resumen, se observa en la Figura 4 que los tratamientos con 2, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN propio incrementaron significativamente la capacidad solubilizadora de fosfato de calcio en Bc-A comparados con el grupo de tratamiento control de 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN propio.

Tras realizar el ANOVA de una vía, indicó que tratamiento con ADN propio explica/tiene un efecto de alrededor del 30% de la variación en la capacidad de solubilización de fosfato de calcio, lo cual nos indica que existe mayor grado de variación entre grupos que dentro de los mismos y adicionalmente, arrojó un valor de F crítico de 30.59. El valor de P asociado al F crítico resultó ser de $5\text{e-}9$, lo cual indica la existencia de diferencias fuertemente significativas entre los grupos. Se realizó la prueba de Tukey, la cual nos permite encontrar cuáles grupos son los que son diferentes entre sí. Finalmente, la prueba de Tukey, encontró una diferencia significativa, que fue entre el grupo control y el resto de los tratamientos.

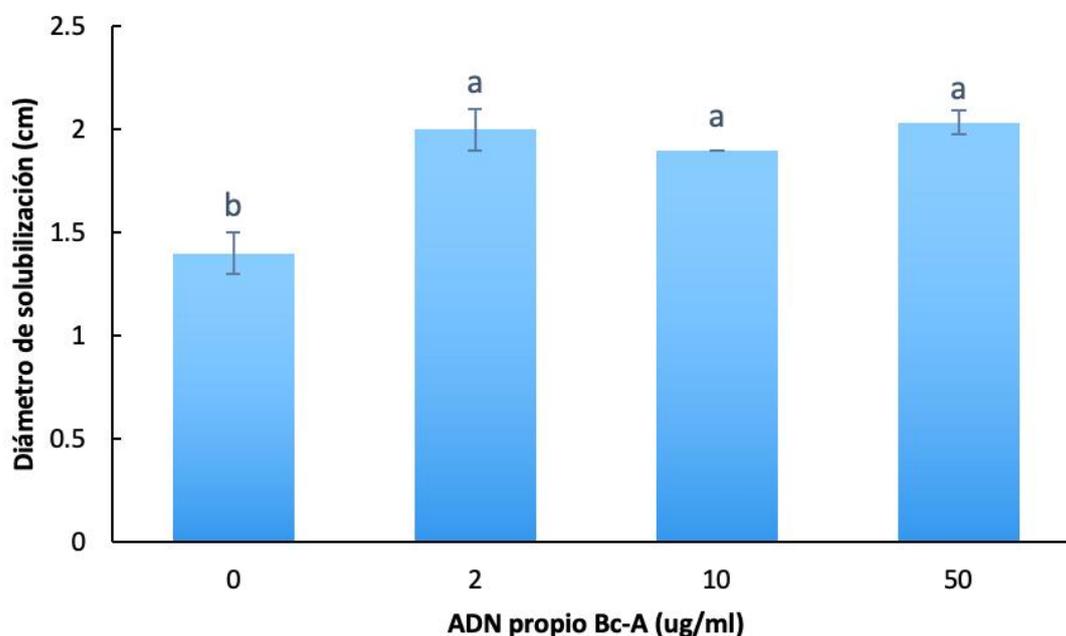


Figura 4. Prueba de solubilización de fosfato de calcio. En la gráfica se muestra que existe una diferencia significativamente menor entre el grupo control donde no se utilizó tratamiento con ADN con el resto de los tratamientos con 2, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN propio, sin embargo, entre los tratamientos con 2, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ADN

propio, no se muestra ninguna diferencia significativa. Letras diferentes indican diferencia significativa. Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC.

Determinación del efecto del ADN propio sobre la producción de Giberelinas (Gb3) en Bc-A

Tras la medición de la producción de Gb3, el análisis de varianza de una vía indica que existe una variabilidad significativa en la producción de las hormonas Gb3 entre los cuatro grupos de tratamiento que fueron con concentraciones de 0, 2, 10 y 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN propio. La prueba de Tukey-Kramer muestra que hay diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. Como se muestra en la Figura 5 el grupo de tratamiento con 50 $\mu\text{g/mL}$ de ADN mostró una producción significativamente mayor de Gb3 en comparación con los otros grupos de tratamiento. Los tratamientos con las concentraciones de 2 y 10 $\mu\text{g/mL}$ de ADN propio también difirieron significativamente en términos de producción de Gb3 del grupo control con 0 $\mu\text{g/mL}$ de ADN propio, donde no se aplicó ninguna concentración de ADN propio. Los resultados sugieren que los tratamientos con ADN propio alteraron la producción de esta hormona en comparación con las condiciones normales donde no hay ADN propio de manera extracelular. Sin embargo, dado que estos dos tratamientos no difieren significativamente entre sí, podrían estar relacionados de alguna manera o tener efectos similares en la producción de Gb3. El nivel de confianza del 95% en el intervalo de confianza tras el análisis de ANOVA-Tukey también refuerza la robustez de los resultados. En general, parece haber una tendencia en la producción de Gb3 a medida que aumenta la cantidad de tratamiento.

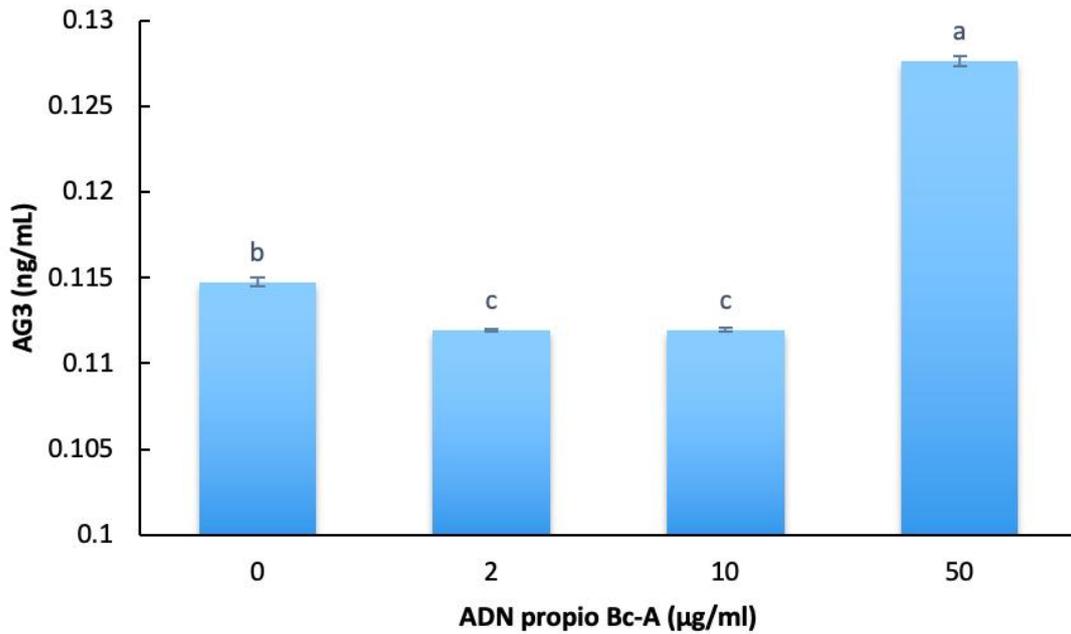


Figura 5. Producción de Gb3 en Bc-A. En la gráfica se muestra que existe una producción de la hormona Gb3 significativamente distinta entre los grupos analizados. El grupo con tratamiento con 50 µg/mL de ADN propio mostró una mayor producción de Gb3 en comparación con el resto de los grupos de tratamientos (0, 2 y 10 µg/mL de ADN propio. Los tratamientos con 2 y 10 µg/mL de ADN propio también mostraron diferencias significativas en comparación con el control, ambos mostraron una menor producción de Gb3 sin diferencias significativas entre sí. Letras diferentes indican diferencia significativa. Análisis ANOVA-Tukey con 95% de IC

VI. DISCUSIÓN

Los resultados demuestran que la aplicación de ADN propio como tratamiento tiene un efecto en potenciar el crecimiento de Bc-A tras 24 hrs de exposición a diferentes concentraciones de ADN propio, y especialmente a las concentraciones más altas utilizadas observa una clara relación de comportamiento dosis dependiente, a mayor concentración de ADN propio aplicada mayor es el crecimiento bacteriano. Sin embargo es posible que se llegue a una fase estática en el crecimiento y concentraciones mayores de ADN propio ya no sean relevantes en el crecimiento, posiblemente se pueda observar una curva hormética llegando a un máximo de elicitación y posteriormente una inhibición. Aunque en este estudio no se analizaron concentraciones más altas de ADN propio, las investigaciones de Mazzoleni et al., 2015 sostienen esta suposición ya que su estudio registró que concentraciones de 800 ppm de ADN propio tienen un efecto de inhibición en el crecimiento.

Similar fue el patrón de comportamiento tras analizar la producción de giberelinas tras el tratamiento con ADN propio en concentración 50 µg/ml. Estos resultados pueden ser de gran interés, ya que indican que este tratamiento en específico tuvo un impacto positivo en la producción de giberelinas y el crecimiento bacteriano. La producción de hormonas giberelinas es crucial para el crecimiento y desarrollo de las plantas, estimulando la elongación de raíces y hojas, y aumentando la producción de semillas. Entender cómo los tratamientos afectan esta producción es relevante para la agricultura y la biotecnología, ofreciendo posibilidades de mejora en el crecimiento y calidad de los cultivos en condiciones controladas. Sería interesante evaluar el efecto directo del tratamiento con 50 µg/mL de ADN propio en semillas y plantas de *Solanum Lycopersicum*, donde Bc-A ha mostrado beneficios previos en los cultivos. Una de las posibles causas que podrían estar ocurriendo es que, tal como se ha informado (Bonilla C., 2020), aquellas bacterias que activan cascadas de señalización relacionadas con la respuesta general al estrés mediante el factor de transcripción SigB -que codifica para la síntesis de más de 200 genes implicados en respuestas al estrés de todo tipo, tales como calor, osmoralidad, especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés mecánico- tienen un mayor valor adaptativo y persistencia dentro del ambiente en comparación con aquellas que no lo hacen (Bonilla C., 2020). Los resultados de este estudio sugieren que las concentraciones de 2 a 50 µg/mL de ADN propio en Bca-A señalizan la activación del factor SigB que activa respuestas a estrés general y da lugar a una regulación de la energía y síntesis de enzimas oxidativas que permiten una mayor adaptabilidad bacteriana al medio y por ende valores mayores en crecimiento tras las 24 hrs de tratamiento.

Los grupos que mostraron diferencias significativas en respuesta a los tratamientos con diferentes concentraciones de ADN propio aplicadas fueron los de 2, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en donde se observó que para las pruebas de fosfatos, CAT, SOD y giberelinas existe una relación positiva con el crecimiento, a excepción del grupo de tratamiento con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en donde se pudo observar una baja en la actividad enzimática de SOD, esto podría indicar que las concentraciones excesivas de ADN propio podrían inducir estrés oxidativo en la bacteria, llevando a Bc-A a reducir sus habilidades para combatirlo, un efecto de autotoxicidad como el reportado por Mazzoleni et al., 2015, aunado a esto existe la probabilidad de que al momento de cuantificar la proteína total en las muestras se pudo obtener un valor incorrecto debido a la aglutinación del colorante en las muestras, la primera explicación a este suceso podría ser que debido al contenido de giberelina en la muestra, la cual se ha reportado es un ácido (Brian P.W, 1966) causó una interferencia al mezclarse con el reactivo, ya que como es sabido, la presencia de ácidos y bases fuertes en una muestra para cuantificación de proteína puede producir interferencia y deben ser eliminados de la muestra para evitar datos erróneos (Noble, J. E., & Bailey, 2009). Sin embargo, las concentraciones intermedias de ADN propio utilizadas (2 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) parecen estimular la actividad específica de SOD en un nivel muy similar. Para el caso de la solubilización de fosfatos podemos decir que efectivamente existe un efecto del ADN propio en la capacidad de Bc-A para solubilizar el fosfato de calcio como fuente de nutriente, ya que en contraste con el grupo control sin tratamiento de ADN propio, los otros grupos que recibieron alguna concentración de ADN propio (2, 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) si fueron capaces de lograr halos de solubilización significativamente mayores, sin embargo, este experimento no fue capaz de distinguir diferencias entre las concentraciones utilizadas, y tampoco fue concluyente en tanto a la metodología para la medición de solubilización de fosfato, ya que en el trabajo de (Ibarra-Galeana et al., 2017) demostraron que la mejor manera de medir la capacidad de solubilización de fosfatos inorgánicos es mediante la cuantificación en medio líquido, en intervalos de tiempo y la utilización azul de molibdeno, al contrario del método aquí utilizado (medio sólido, sin ningún colorante indicador y medido una única vez tras 24 hrs de incubación). La medición de los halos de solubilización resultó complicada debido a la falta de perfección en los círculos. Para mejorar estos resultados, se sugiere repetir el experimento siguiendo la metodología descrita por (Ibarra-Galeana et al., 2017).

VII. CONCLUSIÓN

Los resultados destacan tres respuestas bacterianas al estrés: mayor producción de enzimas antioxidantes (catalasa y superóxido dismutasa), aumento en la tasa de crecimiento y mayor capacidad para solubilizar compuestos inorgánicos, como el fosfato de calcio, para usarlos como nutrientes alternativos. Este estudio confirma la autotoxicidad del ADN propio fragmentado, dependiente de la concentración, y muestra una notable producción de giberelinas en la cepa Bc-A cuando se la trata con su propio ADN, en comparación con bacterias no tratadas.

Estos hallazgos sugieren dos conclusiones clave. Primero, señalan el potencial de compuestos y sistemas biológicos como posibles biofertilizantes para plantas, destacando a Bc-A como un organismo modelo prometedor. La elicitación de Bc-A con su propio ADN podría mejorar el crecimiento o la supervivencia de las plantas tratadas en el campo.

En segundo lugar, estos datos no solo respaldan teorías sobre el papel del ADN propio en la autotoxicidad observada en varios grupos, favoreciendo la diversidad y resistencia en un ecosistema, sino que también sugieren aplicaciones en medicina y farmacología. La inhibición del crecimiento de cepas patógenas de *Bacillus cereus* después de la exposición a su propio ADN podría ser útil como alternativa a los antibióticos, dado su valor médico.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahemad, M., & Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth-promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University - Science*, 26(1), 1-20.
2. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2007). *Molecular Biology of the Cell* (5th ed.). W.W. Norton & Company. <https://doi.org/10.1201/9780203833445>
3. Alti, D., Sambamurthy, C., & Kalangi, S. K. (2018). Emergence of leptin in infection and immunity: Scope and challenges in vaccines formulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(MAY), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00147>
4. Anderson, R. L., Carr, J. G., & Bond, C. W. (1943). *Bacillus cereus* in Food Poisoning. *Journal of Bacteriology*, 46(2), 143-149.
5. Babalola, O. O. (2010). Beneficial bacteria of agricultural importance. *Biotechnology Letters*, 32(11), 1559–1570.
6. Barbero, F., Guglielmo, M., Capuzzo, A., & Maffei, M. E. (2016). Extracellular self-DNA (esDNA), but not heterologous plant or insect DNA (etDNA), induces plasma membrane depolarization and calcium signaling in lima bean (*Phaseolus lunatus*) and maize (*Zea mays*). *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10). <https://doi.org/10.3390/ijms17101659>.
7. Bartek J, Bartkova J, Lukas J. DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene*. 2007 Dec 10;26(56):7773-9. doi: 10.1038/sj.onc.1210881. PMID: 18066090.
8. Bhardwaj, D., Ansari, M. W., Sahoo, R. K., Tuteja, N. (2020). Biofertilizers function as key player in sustainable agriculture by improving soil fertility, plant tolerance and crop productivity. *Microbiological Research*, 235, 126439.

9. Bonilla, C. Y. (2020). Invited Review Generally stressed out bacteria: environmental stress response mechanisms in Gram-positive bacteria. <https://doi.org/10.1093/icb/icaa002/5733733>
10. Brian, P.W. (1966). [International Review of Cytology] Volume 19 || The Gibberellins as Hormones. , (), 229–266. doi:10.1016/S0074-7696(08)60569-0
11. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2021, November 2). auxin. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/auxin>
12. Cartení, F., Bonanomi, G., Giannino, F., Incerti, G., Vincenot, C., Chiusano, M., Mazzoleni, S., (2016). *Self-DNA inhibitory effects: Underlying mechanisms and ecological implications. Plant Signaling & Behavior*. doi:10.1080/15592324.2016.1158381.
13. Chaudhary P, Singh S, Chaudhary A, Sharma A, Kumar G. Overview of biofertilizers in crop production and stress management for sustainable agriculture. *Front Plant Sci*. 2022 Aug 23;13:930340. doi: 10.3389/fpls.2022.930340. PMID: 36082294; PMCID: PMC9445558.
14. Daniel AI, Fadaka AO, Gokul A, Bakare OO, Aina O, Fisher S, Burt AF, Mavumengwana V, Keyster M, Klein A. Biofertilizer: The Future of Food Security and Food Safety. *Microorganisms*. 2022 Jun 14;10(6):1220. doi: 10.3390/microorganisms10061220. PMID: 35744738; PMCID: PMC9227430.
15. Duran-Flores, D., & Heil, M. (2018). Extracellular self-DNA as a damage-associated molecular pattern (DAMP) that triggers self-specific immunity induction in plants. *Brain, Behavior, and Immunity*, 72, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2017.10.010>
16. Ehling-Schulz M, Lereclus D, Koehler TM. The *Bacillus cereus* Group: *Bacillus* Species with Pathogenic Potential. *Microbiol Spectr*. 2019 May;7(3):10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0032-2018. PMID: 31111815; PMCID: PMC6530592.

17. Farhana A, Khan YS. Biochemistry, Lipopolysaccharide. [Updated 2023 Apr 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK554414/>
18. Ferrusquía-Jiménez, N. I., Chandrakasan, G., Torres-Pacheco, I., Rico-García, E., Feregrino-Perez, A. A., & Guevara-González, R. G. (2021). Extracellular DNA: A Relevant Plant Damage-Associated Molecular Pattern (DAMP) for Crop Protection Against Pests—A Review. In *Journal of Plant Growth Regulation* (Vol. 40, Issue 2, pp. 451–463). Springer. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10129-w>
19. Ferrusquía-Jiménez, N. I., González-Arias, B., Rosales, A., Esquivel, K., Escamilla-Silva, E. M., Ortega-Torres, A. E., & Guevara-González, R. G. (2022). Elicitation of *Bacillus cereus*-Amazcala (B.c-A) with SiO₂ Nanoparticles Improves Its Role as a Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB) in Chili Pepper Plants. *Plants*, 11(24). <https://doi.org/10.3390/plants11243445>
20. Ferrusquía-Jiménez, N. I., Serrano-Jamaica, L. M., Martínez-Camacho, J. E., Sáenz de la O, D., Villagomez-Aranda, A. L., González-Chavira, M. M., Guerrero-Aguilar, B. Z., Torres-Pacheco, I., Feregrino-Pérez, A. A., Medina-Ramos, G., & Guevara-González, R. G. (2022). Extracellular self-DNA plays a role as a damage-associated molecular pattern (DAMP) delaying zoospore germination rate and inducing stress-related responses in *Phytophthora capsici*. *Plant Pathology*, 71(5), 1066–1075. <https://doi.org/10.1111/ppa.13545>
21. Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk P Jr. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *Int J Syst Bacteriol*. 1992 Jan;42(1):166-70. doi: 10.1099/00207713-42-1-166. PMID: 1371061.
22. Giglia-Mari G, Zotter A, Vermeulen W. DNA damage response. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Jan 1;3(1):a000745. doi: 10.1101/cshperspect.a000745. PMID: 20980439; PMCID: PMC3003462.
23. Hengge, Regine (2020). Linking bacterial growth, survival, and multicellularity a small signaling molecules as triggers and drivers. *Current Opinion in Microbiology*, 55(), 57–66. doi:10.1016/j.mib.2020.02.007.

24. Hoton, F. M. (2005). *The cereulide genetic determinants of emetic Bacillus cereus are plasmid-borne.* *Microbiology*, 151(7), 2121–2124. doi:10.1099/mic.0.28069-0
25. Igiehon, N. O., & Babalola, O. O. (2018). Rhizosphere microbiome modulators: Contributions of nitrogen fixing bacteria towards sustainable agriculture. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph15040574>
26. Johnson, J.S., Spakowicz, D.J., Hong, BY. *et al.* Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun* 10, 5029 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13036-1>.
27. Ju, S; Alexandrov, B; Gerstung, M; Martincorena, I; Nik-Zainal, S; Ramakrishna, M; Davies, H; Papaemmanuil, E; Gudem, G; Shlien, A; Bolli, N; Behjati, S; Tarpey, P; Nangalia, J; Massie, C; Butler, A; Teague, J; Vassiliou, G; Green, A; Du, M; Unnikrishnan, A; Pimanda, J; Teh, B; Munshi, N; Greaves, M; Vyas, P; El-Naggar, A; Santarius, T; Collins, V; Grundy, R; Taylor, J; Hayes, D; Malkin, D; Foster, C; Warren, A; Whitaker, H; Brewer, D; Eeles, R; Cooper, C; Neal, D; Visakorpi, T; Isaacs, W; Bova, G; Flanagan, A; Futreal, P; Lynch, A; Chinnery, P; McDermott, U; Stratton, M; Campbell, P (2014). *Origins and functional consequences of somatic mitochondrial DNA mutations in human cancer.* *eLife*, 3(), –. doi:10.7554/eLife.02935
28. Land WG. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases: Part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2015 May;15(2):e157-70. Epub 2015 May 28. PMID: 26052447; PMCID: PMC4450777.
29. McDowell RH, Sands EM, Friedman H. *Bacillus Cereus*. [Updated 2023 Jan 23]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459121/>
30. Maurya, R., Bhattacharya, P., Dey, R., & Nakhasi, H. L. (2018). Leptin functions in infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 9(NOV), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02741>

31. Matthew J. Longley; Maria A. Graziewicz; Rachelle J. Bienstock; William C. Copeland (2005). *Consequences of mutations in human DNA polymerase γ* , 354(none), 0–131. doi:10.1016/j.gene.2005.03.029
32. Mattioli, B., Straface, E., Matarrese, P., Quaranta, M. G., Giordani, L., Malorni, W., & Viora, M. (2020). Leptin as an immunological adjuvant: enhanced migratory and CD8⁺ T cell stimulatory capacity of human dendritic cells exposed to leptin. 2012–2022. <https://doi.org/10.1096/fj.07-098095>
33. Mazzoleni, Bonanomi, Incerti, Chiusano, Termolino, Mingo, Senatore, Giannino, Carteni, Rietkerk, Lanzotti (2015). *Inhibitory and toxic effects of extracellular self-DNA in litter: a mechanism for negative plant-soil feedbacks?*. *New Phytologist*, 205(3), 1195–1210. doi:10.1111/nph.13121
34. Mazzoleni S, Bonanomi G, Giannino F, Incerti G, Dekker SC, Rietkerk M. Modelling the effects of litter decomposition on tree diversity patterns. *Ecol Modell* 2010; 221:2784–92.
35. Mazzoleni, S., Carteni, F., Bonanomi, G., Senatore, M., Termolino, P., Giannino, F. et al. (2015b) Inhibitory effects of extracellular self DNA: a general biological process? *New Phytologist*, 206, 127–132. <https://doi.org/10.1111/nph.13306>
36. Mohammadi-Sichani, M. M., Assadi, M. M., Farazmand, A., Kianirad, M., Ahadi, A. M., & Ghahderijani, H. H. (2017). Bioremediation of soil contaminated crude oil by Agaricomycetes. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 15(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s40201-016-0263-x>
37. Nazari, M., & Smith, D. L. (2020). A PGPR-Produced Bacteriocin for Sustainable Agriculture: A Review of Thuricin 17 Characteristics and Applications. 11(July). <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00916>
38. Noble, J. E., & Bailey, M. J. A. (2009). Chapter 8 Quantitation of Protein. In *Methods in Enzymology* (Vol. 463, Issue C, pp. 73–95). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63008-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63008-1)
39. Solano-Alvarez, N., Valencia-Hernández, J. A., Rico-García, E., Torres-Pacheco, I., Ocampo-Velázquez, R. V., Escamilla-Silva, E. M., Romero-García, A. L., Alpuche-

- Solís, Á. G., & Guevara-González, R. G. (2021). A novel isolate of bacillus cereus promotes growth in tomato and inhibits clavibacter michiganensis infection under greenhouse conditions. *Plants*, 10(3), 1–13. <https://doi.org/10.3390/plants10030506>
40. Staerck, C., Gastebois, A., Vandeputte, P., Calenda, A., Larcher, G., Gillmann, L., Papon, N., Bouchara, J. P., & Fleury, M. J. J. (2017). Microbial antioxidant defense enzymes. In *Microbial Pathogenesis* (Vol. 110, pp. 56–65). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.015>
41. T. Nikitha, M. S., B. Sadhana, E. U. B. R., & Vani, S. S. (2017). Phosphorous and Phosphate Solubilising Bacteria and their Role in Plant Nutrition. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(4), 2133–2144. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.604.251>
42. Vega-Muñoz, I., Feregrino-Pérez, A. A., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (2018). Exogenous fragmented DNA acts as a damage-Associated molecular pattern (DAMP) inducing changes in CpG DNA methylation and defence-related responses in *Lactuca sativa*. *Functional Plant Biology*, 45(10), 1065–1072. <https://doi.org/10.1071/FP18011>
43. Wang, C.-J., Yang, W., Wang, C., Gu, C., Niu, D.-D., Liu, H.-X., ... Guo, J.-H. (2012). Induction of Drought Tolerance in Cucumber Plants by a Consortium of Three Plant Growth-Promoting Rhizobacterium Strains. *PLoS ONE*, 7(12), e52565. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052565>
44. Wolf, J.; Underhill, M. (2018). *Peptidoglycan recognition by the innate immune system*. *Nature Reviews Immunology*, (), -. doi:10.1038/nri.2017.136
45. Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. In *Annual Review of Plant Biology* (Vol. 59, pp. 225–251). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.59.032607.092804>
46. Zhang, L.-N., Wang, D.-C., Hu, Q., Dai, X.-Q., Xie, Y.-S., Li, Q., Liu, H.-M., & Guo, J.-H. (2019). Consortium of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria Strains Suppresses Sweet Pepper Disease by Altering the Rhizosphere Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 10(July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01668>

47. Zhang, J., Wang, H., Huang, Q., Zhang, Y., Zhao, L., Liu, F., & Wang, G. (2020). Four superoxide dismutases of *Bacillus cereus* 0–9 are non-redundant and perform different functions in diverse living conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36(1). <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2786-7>