



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química

Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp.,  
productoras de compuestos orgánicos volátiles con actividad  
antifúngica contra *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y  
*Fusarium oxysporum*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta:

I.B.I. Yomaiko Javier Martínez

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

Querétaro, Qro. a Diciembre de 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



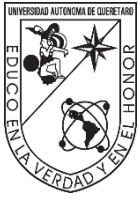
Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp., productoras de compuestos orgánicos volátiles con actividad antifúngica contra *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*

**por**

Yomaiko Javier Martínez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** FQMAC-309169



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencia y Tecnología Ambiental

Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus* spp.,  
productoras de compuestos orgánicos volátiles con actividad  
antifúngica contra *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y  
*Fusarium oxysporum*

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestro en Ciencia y Tecnología Ambiental

Presenta

I.B.I. Yomaiko Javier Martínez

Dirigido por:

Dr. Juan Campos Guillén

Dr. Juan Campos Guillén  
Presidente

Dr. Juan Ramiro Pacheco Aguilar  
Secretario

Dr. Miguel Angel Ramos López  
Vocal

M. en C. Erika Álvarez Hidalgo  
Suplente

Dr. Eloy Rodríguez de León  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario, diciembre del 2023  
México

## **Agradecimiento**

En primer lugar, agradezco a Dios por la oportunidad de estar en el programa de Maestría en Ciencias y Tecnología Ambiental, por medio de él, he logrado poder desarrollarme, crecer, mejorar ciertas áreas de mi vida que no me permitían seguir adelante. Me permitió estar con profesores capacitados en la elaboración de dicha tesis que presento. También, me ayudo a comprender mis flaquezas y debilidades de mi vida, y por medio de mi familia, maestros y compañeros, me hicieron ver y poder sobrepasar los límites que me impuse, desarrollando fortaleza y la diligencia de realizar un trabajo de esta calidad. En todo agradezco a Dios por esto.

También, quiero conmemorar a mis padres de apoyarme en mis decisiones de venir a Querétaro, a poder desarrollarme en la maestría, tanto económico, emocional, integridad, en mi carácter, entre otras más. Los consejos, apoyos y el esfuerzo que han dicho o hecho en mis momentos tan vulnerables o difíciles de soportar, son tan valiosos que las muchas riquezas del mundo, pues en ellas me fortalecí y me esfuerzo más. Han hecho un excelente trabajo, y lo quiero honrar con seguir en el éxito estoy siguiendo.

Quiero también agradecer a los profesores y mi director de tesis, por los consejos muy valiosos para mí, para llegar a metas que antes no podía alcanzar, los consejos son mejores que las piedras preciosas que hay en esta tierra. Agradezco la paciencia y dedicación, y el amor que tienen sobre su trabajo para compartir a otros sus conocimientos y enseñanzas, son de admirar. Por lo tanto, no olvidaré todo este proceso de la maestría.

Quiero añadir otro agradecimiento, a la institución de CONAHCYT, por el apoyo económico, por medio de una beca, que fue de sustento para enfocarme al 100% de mis estudios. Sin dejar a lado que necesitamos un sustento día a día, fue de gran apoyo para ejercer y desarrollar mis estudios de maestría.

## Índice

1. Introducción.....	10
2. Antecedentes .....	12
2.1. Características del género <i>Bacillus</i> .....	12
2.2. Distribución del género <i>Bacillus</i> .....	15
2.3. Hongos fitopatógenos y el control biológico de <i>Bacillus</i> .....	21
2.4. Mecanismos de control del género <i>Bacillus</i> .....	30
2.4.1. Producción de lipopéptidos.....	30
2.4.2. Producción de enzimas líticas .....	31
2.4.3. Producción de sideróforos .....	32
2.4.4. Respuesta sistemática inducida .....	33
2.4.5. Producción de compuestos orgánicos volátiles .....	34
3. Hipótesis.....	41
4. Objetivo general .....	42
4.1. Objetivos específicos .....	42
5. Metodología.....	43
5.1. Obtención de muestras de chile molido .....	43
5.2. Aislamiento de cepas de <i>Bacillus</i> de muestras de chile molido .....	43
5.3. Evaluación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i> de cepas aisladas de muestras de chile contra <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Alternaria alternata</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> .....	44
5.4. Identificación de los aislados bacterianos.....	45
5.5. Recolección y extracción de compuestos orgánicos volátiles con la técnica micro extracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME).....	46
5.6. Análisis de los compuestos orgánicos volátiles por la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) .....	46

5.7. Análisis estadístico.....	47
6. Resultados: .....	48
6.1. Aislamiento de <i>Bacillus</i> spp. en muestras de chile molido .....	48
6.2. Características de los aislados obtenidos .....	49
6.3. Identificación molecular de los aislados con actividad antifúngica.....	53
6.5. Análisis de los compuestos orgánicos volátiles del aislado <i>Bacillus pumilus</i> M12-5-1 .....	56
7. Discusión.....	61
8. Conclusión.....	67
9. Referencias bibliográficas .....	68

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Porcentaje de aislados bacterianos con actividad antifúngica contra <i>Sclerotium rolfsii</i> .....	49
<b>Tabla 2.</b> Identificación taxonómica de los aislados bacterianos. ....	56
<b>Tabla 3.</b> COV producidos por <i>Bacillus pumilus</i> M12-5-1 detectado por HS-SPME-GC-MS.....	60

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Ciclo vegetativo y esporulación del género de <i>Bacillus</i> (Villareal Delgado, et al., 2018).....	15
<b>Figura 2.</b> Evaluación de la actividad antifúngica de los 13 aislados bacterianos contra <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Alternaria alternata</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> . ....	52
<b>Figura 3.</b> Árbol filogenético de los aislados bacterianos, utilizando el método de Neighbor-Joining con el programa MEGA 11. ....	54
<b>Figura 4.</b> Efectos de los compuestos orgánicos volátiles producidos por M12-5-1, en <i>Sclerotium rolfsii</i> , <i>Alternaria alternata</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> . ....	56
<b>Figura 5.</b> Detección de COV de 24 h de incubación de <i>Bacillus pumilus</i> M12-5-1 usando HS-SPME-GC-MS. Abundancia y tiempo de retención es mostrado por cada pico. ....	58



## Resumen

El género *Bacillus* es conocido por su gran versatilidad metabólica y adaptabilidad a diversos ambientes. Diversas especies de este género bacteriano se han caracterizado por su gran capacidad de producir metabolitos con actividad antifúngica. Por lo tanto, existe un continuo interés por seguir caracterizando nuevas cepas, que muestren mayor actividad y rango de especificidad sobre hongos fitopatógenos, que atacan cultivos agrícolas de interés económico. En este sentido, los resultados generados en esta investigación mostraron que, a través de un escrutinio de 80 aislados bacterianos obtenidos de chile molido, doce aislados bacterianos pertenecientes al género *Bacillus* y uno al género *Mesobacillus*, demostraron capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, con porcentajes alrededor del 85%, 70% y 20%, respectivamente, a través de diversos compuestos orgánicos volátiles usando la técnica de placas intercaladas. Los aislados bacterianos que pertenecen al género *Bacillus* se identificaron a través del marcador molecular 16s rDNA relacionados a: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus velezensis* y *Mesobacillus jeotgali*. Entre estas cepas se seleccionó *B. pumilus* M12-5-1, por su capacidad de inhibir a los tres hongos fitopatógenos evaluados, para caracterizar el perfil de compuestos orgánicos volátiles producidos, a través del método de microextracción en fase sólida combinada con cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (HS-SPME-GC-MS). Los resultados mostraron 33 compuestos orgánicos volátiles identificados. Las clases químicas que se identificaron principalmente fueron: Alcoholes, Cetonas, Ésteres, Hidrocarburos, Pirazinas y Tioéteres. Entre los volátiles identificados y de particular interés fueron: 2-etil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 2-metilbutirato de etilo, 2,5-dimetil-pirazina y disulfuro de dimetilo, los cuales se han reportado por su capacidad de controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos. En conclusión, la cepa *B. pumilus* M12-5-1 aislada de chile molido es un candidato potencial para el biocontrol de hongos fitopatógenos.

**Palabras claves:** *Bacillus*, Chile molido, COV, actividad antifúngica, hongos fitopatógenos.

## **Abstract**

The *Bacillus* genus is known for its great metabolic versatility and adaptability to various environments. Various species of this bacterial genus have been characterized by their great capacity to produce metabolites with antifungal activity. Therefore, there is a continuous interest in continuing to characterize new strains that show greater activity and range of specificity on phytopathogenic fungi, which attack agricultural crops of economic interest. In this sense, the results generated in this research showed that, through a scrutiny of 80 bacterial isolates obtained from ground chili, twelve bacterial isolates belonging to the *Bacillus* genus and one to the *Mesobacillus* genus, demonstrated the ability to inhibit the mycelial growth of *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* and *Fusarium oxysporum*, with percentages around 85%, 70% and 20%, respectively, through various volatile organic compounds using the intercalated plate technique. The bacterial isolates belonging to the genus *Bacillus* were identified through the 16s rDNA molecular marker related with *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus velezensis* and *Mesobacillus jeotgali*. Among these strains, *B. pumilus* M12-5-1 was selected for its ability to inhibit the three phytopathogenic fungi evaluated, to characterize the profile of volatile organic compounds produced, through the headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS) method. The results showed 33 volatile organic compounds identified. The chemical classes that were mainly identified were Alcohols, Ketones, Esters, Hydrocarbons, Pyrazines and Thioether. Among the volatiles identified and of particular interest were 2-ethyl-1-butanol, 3-methyl-1-butanol, ethyl 2-methylbutyrate, 2,5-dimethyl-pyrazine and dimethyl disulfide, which have been reported by its ability to control the growth of phytopathogenic fungi. In conclusion, the *B. pumilus* M12-5-1 strain isolated from ground chili is a potential candidate for the biocontrol of phytopathogenic fungi.

**Keywords:** *Bacillus*, ground chili, VOC, antifungal activity, phytopathogenic fungi.

## 1. Introducción

El género *Bacillus* es muy conocido en el campo de la investigación por su amplia adaptabilidad y versatilidad metabólica. Producen una amplia gama de metabolitos con diversas funciones ecológicas, entre las más estudiadas son las que producen capacidad de promoción del crecimiento en plantas, actividad antimicrobiana y producción de enzimas con interés industrial. Por su capacidad de generar esporas durante su ciclo biológico, le permite diseminarse, prevalecer y resistir en diferentes tipos de estrés como, altas o bajas temperaturas, radiación, falta de nutrientes, entre otros, y estar en periodos largos de latencia hasta que encuentren condiciones óptimas de crecimiento, para germinación de la spora.

Entre las capacidades metabólicas que presenta este género bacteriano, la actividad antifúngica tiene un papel importante en el control biológico de hongos fitopatógenos en los sistemas agrícolas. Los hongos fitopatógenos son considerados importantes por su incidencia, severidad y las grandes pérdidas económicas en los cultivos. Entre los géneros de importancia son *Sclerotium*, *Alternaria* y *Fusarium*. Los hongos que pertenecen al género *Sclerotium*, son conocidos por causar enfermedades denominados pudrición basal de tallo y raíz, mal del esclerocio o tizón sureño, y son capaces de infectar a más de 180 cultivos. *Alternaria* spp., son causantes de la enfermedad llamada tizón temprano, causando debilitamiento y muerte celular en los tejidos. Los hongos que pertenecen al género *Fusarium*, son responsables de la enfermedad llamada marchitamiento vascular, putrefacción del tallo o del fruto. Para controlar dichas enfermedades se usan diferentes métodos, como el uso de químicos sintéticos, sin embargo, el uso discriminado ha resuelto resistencia en diferentes patógenos, a su vez, reportaron afectaciones a la salud humana y a diversos animales, e incluso hay otros métodos de control, pero no son eficientes. Por otro lado, el control biológico se destaca por el uso de agentes microbianos para el control de hongos fitopatógenos. Los agentes microbianos más usados son los hongos y bacterias, de los cuales géneros que se destacan son *Trichoderma*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Bacillus*, entre otros. Entre ellos, las especies de *Bacillus* son ampliamente usados como agentes de

biocontrol. Los mecanismos usados por los microorganismos son: por contacto, producción de compuestos y mecanismos indirectos. Entre estos mecanismos, se han estudiado la producción de compuestos orgánicos volátiles como, por ejemplo; alcoholes, cetonas, ésteres, pirazinas, entre otros. Ejemplos de compuestos volátiles con actividad antifúngica son: 3-metil-1-butanol, 2-metilbutirato de etilo, 2,5-dimetil-pirazina, tolueno, entre otros. En esta investigación evaluamos aislados bacterianos obtenidos de chile molido (*Capsicum annuum* L.), que mostraron capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Se identificaron 12 aislados pertenecientes al género *Bacillus* y uno al género *Mesobacillus*. Entre las cepas identificadas, *Bacillus pumilus* M12-5-1 mostró un gran potencial en el control de los 3 hongos fitopatógenos evaluados debido a que en el volatiloma se encontraron compuestos volátiles como: 3-metil-1-butanol, 1-butanol, 2-metilbutirato de etilo, 3-hidroxibutirato de etilo, metil-pirazina, 2,5-dimetil-pirazina, tolueno, disulfuro de dimetilo, los cuales se han reportado con capacidades de afectar el crecimiento de hongos fitopatógenos. Por lo que, la cepa *Bacillus pumilus* M12-5-1 tiene potencial para uso de control biológico de hongos fitopatógenos.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Características del género *Bacillus*

El género *Bacillus* es un grupo de bacterias que se caracterizan por tener una forma bacilar o bastón, algunas ligeramente curvadas y otras rectas, se pueden presentar en grupos de células o individuales, algunos forman una cadena o conglomeraciones (Logan & De Vos, 2015). En la mayoría cuentan con flagelos que le permiten ser móviles. Presentan un tamaño variables entre 0.5 a 10µm y son gram positivas (Logan & De Vos, 2015; Villareal Delgado, et al., 2018).

En gran parte de las bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, se desarrollan entre temperaturas de 30°C a 45°C y pH neutro (Tejera Hernández, et al., 2011; Logan & De Vos, 2015; Villareal Delgado, et al., 2018). Algunas especies son capaces de desarrollarse en lugares ácidos y alcalinos, en cambio, otros son psicrófilos y termófilos (Tejera Hernández, et al., 2011; Logan & De Vos, 2015).

También, presentan características de ser aeróbicas, aunque otros pueden desarrollar sin la necesidad de oxígeno (anaerobios facultativos) (Tejera Hernández, et al., 2011; Logan & De Vos, 2015). A su vez, presentan particularidades saprófitas, que tienen la capacidad de degradar la mayoría de sustrato orgánicos en descomposición derivados de plantas y animales, como la celulosa, almidón, pectina, proteínas, agar, hidrocarburos y entre otros (Tejera Hernández, et al., 2011; Logan & De Vos, 2015; Villareal Delgado, et al., 2018). Por otro lado, tienen la capacidad fisiológica de promover el crecimiento de plantas y de controlar microorganismos patógenos; además, de realizar la nitrificación, desnitrificación, fijación de nitrógeno, entre otros (Tejera Hernández, et al., 2011; Logan & De Vos, 2015; Villareal Delgado, et al., 2018).

Entre las especies de género *Bacillus*, puede haber diferencias entre ellas, por el lugar o la ecología que se encuentran, por su adaptación. El fenotipo y a nivel genético pueden ser divergentes debido a su ubicación. En un estudio de varias cepas de *Bacillus simplex*, obtenidas en diferentes hábitats, de suelos desiguales en tres cañones de Israel, en distintos puntos, con características diferentes, como

los nutrientes que tiene el suelo e intensidad de luz solar. Realizaron varias técnicas para la identificación como, la secuenciación ARNr 16S, y se distinguían usando técnicas de toma de huellas dactilares de ADN polimórfico amplificado aleatorio-PCR, lo cual podían distinguir perfiles genéticos distintos y la secuenciación de genes constitutivos. Después de lo anterior elaboraron perfiles fenotípicos midiendo la supervivencia a los rayos UV, las tasas de mutación y el crecimiento a alta temperatura para cada cepa. El resultado obtenido de la comparación de perfiles fenotípicos y genéticos mostró que las cepas en un estado ecológicas equivalentes, eran más similares entre sí que las cepas de áreas geográficas contiguos. Por ejemplo, las cepas que vivían en las laderas más cálidas orientadas al sur de cada uno de los tres cañones eran más similares entre sí, independientemente del cañón de origen, que las cepas en las laderas opuestas de sus respectivos cañones de origen (Sikorski & Nevo, 2005; Sikorski & Nevo, 2007). Por lo que, estos resultados muestran que, aunque todas las cepas de *B. simplex* comparten la misma secuencia de ADNr 16s, están adaptadas a ecologías muy diferentes, aunque hay similitud, de la secuenciación de una especie de *Bacillus*, puede tener diferencias en la adaptación de una especie en otra por la diferencia del ambiente en la cual se adaptó (Sikorski & Nevo, 2005; Sikorski & Nevo, 2007; Koeppel, et al., 2008).

Hay ejemplos de bacterias extremófilas como *Bacillus schlegelii* y *Bacillus tusciae*, dos termófilos, que han demostrado ser quimiolitautótrofas facultativas. Las especies de bacterias como, *Bacillus cereus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus sphaericus*, han demostrado tener la capacidad de ser fijadores de nitrógeno (Logan & De Vos, 2015).

La formación de colonias en medios de cultivo, de las bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, muestran una variedad amplia de características morfológicas, tanto dentro como entre especies, además, la composición del medio y otras condiciones de incubación, que atribuyen a la formación de la colonia. Sin embargo, las colonias de *Bacillus* en medios acostumbrados, no suelen ser difíciles de reconocer. Por ejemplo, en el caso de medios de agar sangre y agar nutritivo, entre 24 a 36h de incubación y una temperatura de 37°C, la especie de *Bacillus cereus*,

manifiesta bordes ondulados, crenados y fimbriados, y texturas mates o granulares; *Bacillus megaterium* revela colonias brillantes, redondas o irregulares, con costados enteros u ondulados; *Bacillus pumilus* presenta colonias arrugadas, irregulares y con bordes ondulados; *Bacillus thuringensis* muestra colonias circulares a irregulares con costados enteros u ondulados y texturas superficiales de mate a granular (Logan & De Vos, 2015).

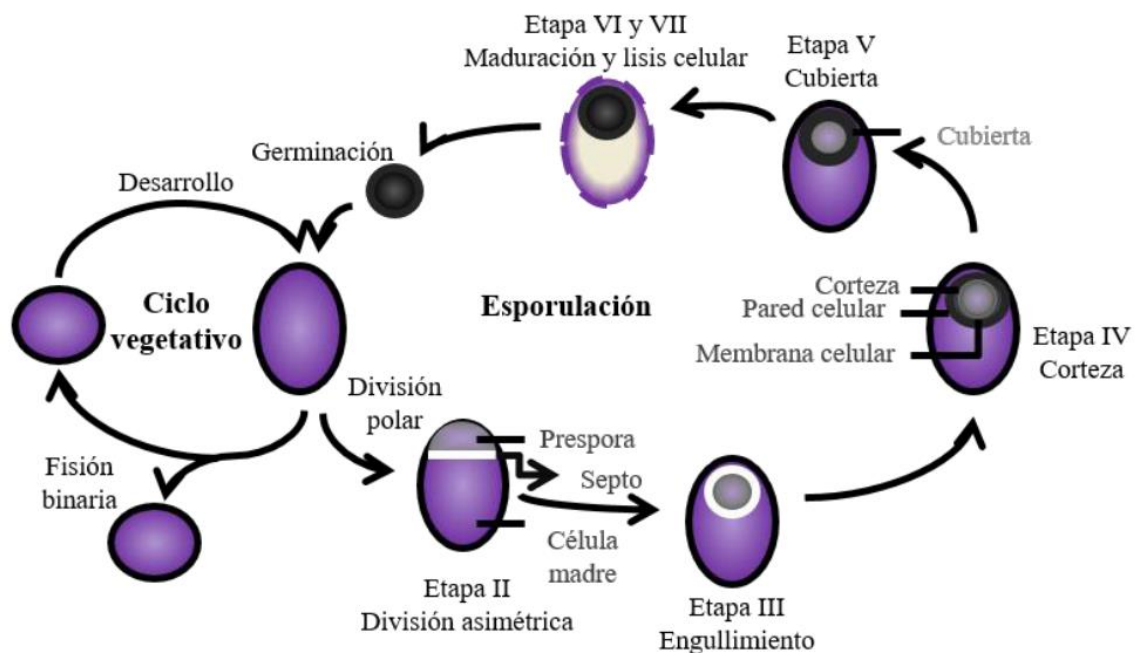
El género *Bacillus* pertenece al Reino Bacteria; Filo *Firmicutes*; Clase *Bacilli*; Orden *Bacillales* y Familia *Bacillaceae* (Maughan & Van der Auwera, 2011). Las especies del género incluyen más de 336 especies, en lo cual se han clasificado de diferentes formas, por ejemplo, se puede clasificar por grupos según por los estilos de desarrollo de las especies, la producción bioquímica, el crecimiento en diferentes sustratos y entre otros. Por ejemplo, algunos pertenecen a un grupo asociado a la patogenicidad, que incluye a *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus thuringensis*; otro grupo se consideran ambientales, porque se han encontrado en plantas, suelos y cultivos, que incluyen *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, entre otros; otro grupo de bacterias que pertenecen en ecosistemas acuáticos, en los cuales incluyen *Bacillus coahuilensis*, *Bacillus halodurans*, entre otros grupos más (Alcaraz, et al., 2010; Villareal Delgado, et al., 2018).

Otra característica del género es de generar esporas. La formación de esporas se le confiere a la familia *Bacillaceae*, es una estructura formada por capas de peptidoglicano y proteínas, que le permite diseminar, prevalecer y resistir en diferentes tipos de estrés, por ejemplo, en altas o bajas temperaturas, falta de nutrientes, densidad alta de población, entre otros (Errington, 2003; Logan & De Vos, 2015; Villareal Delgado, et al., 2018). Los géneros que pertenecen a la familia son: *Amphibacillus*, *Exiguobacterium*, *Halobacillus*, *Oceanobacillus*, *Bacillus*, entre otros (Errington, 2003; Logan & De Vos, 2015).

El ciclo de vida de las bacterias del género *Bacillus*, está dividida por dos fases, una fase vegetativa y la fase de esporulación, como se puede observar en la Figura 1. La fase vegetativa es el desarrollo normal de la bacteria por fisión binaria, en



condiciones favorables para su crecimiento. La fase de esporulación es la formación de la endospora, en lo cual se activa cuando se presenta en condiciones de estrés para su sobrevivencia, y solo se puede formar una espora por célula. Primeramente, para el desarrollo de la endospora, realiza una división celular asimétrica, formando dos compartimientos, una célula inicial y una preespora. Posteriormente, la preespora es engullida, formando un ovalo dentro de la célula y recubriéndose de capas protectoras. La última etapa de la célula se lisa mediante la muerte programada, liberando la endospora. La espora puede permanecer viable en el ecosistema hasta que las condiciones son favorables para iniciar sus procesos metabólicos y generar una célula vegetativa (Errington, 2003; Tejera Hernández, et al., 2011; Logan & De Vos, 2015; Villareal Delgado, et al., 2018).



**Figura 1.** Ciclo vegetativo y esporulación del género de *Bacillus* (Villareal Delgado, et al., 2018).

## 2.2. Distribución del género *Bacillus*

El género *Bacillus* se encuentra en diversos ecosistemas, la mayoría de las especies son aislados del suelo, o de ambientes previamente contaminados directa o indirectamente. También, se han localizado especies asociados en plantas,

animales y seres humanos, otros en condiciones extremas, por ejemplo, en lugares ácidos, alcalinos, cálidos, fríos, desérticos, altas y bajas temperaturas, acuáticos, e incluso en alimentos (Maughan & Van der Auwera, 2011; Logan & De Vos, 2015; Villareal Delgado, et al., 2018).

El suelo es considerado principalmente una fuente de la mayor variedad de microorganismos que se pueden encontrar, por la presencia de altas concentraciones de nutrientes. Los géneros más comunes de bacterias en los suelos son *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Paenibacillus*, *Bacillus*, entre otros (Vargas Ayala, et al., 2000; McSpadden Gardener, 2004; López Fernández, et al., 2016). Este último se ha visto que algunas especies tienen interacciones con ciertas plantas, dando lugar a efecto positivo sobre el desarrollo a través de mecanismos que involucran la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de patógenos (Tejera Hernández, et al., 2011; de Souza, et al., 2015; Villareal Delgado, et al., 2018; Rabbee, et al., 2023).

Los recuentos cultivables de bacterias del género *Bacillus* en suelos, oscilan alrededor de log 5 células por gramo de peso fresco de suelo, y suelen aumentar en la rizósfera. Los aislamientos de este género se encuentran especies filogenéticamente y fenotípicamente similares a *Bacillus subtilis* y *Bacillus cereus*. Otras especies encontradas en los suelos son: *Bacillus Mojavensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus gladioli*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, entre otros. La mayoría de las especies pueden sobrevivir como saprófitos en el suelo, y dicho lugar, se considera como principal reservorio de estas bacterias; por otro lado, la mayoría de las células viables probablemente se presenten como esporas inactivas en un momento dado (Vargas Ayala, et al., 2000; McSpadden Gardener, 2004; Selim, et al., 2016).

Las bacterias del género *Bacillus* pueden alojarse en las plantas, y pueden ubicarse en distintas partes de la planta, como en las hojas, frutos, tallos, raíces, entre otros, y tienen distintas proximidades como son las endófitas, simbióticas o asociativas. Las bacterias endófitas se encuentran en contacto con los tejidos de

las plantas o dentro de los tejidos, entre célula a célula. Las bacterias simbióticas se encuentran dentro de las células de la planta. Las bacterias asociativas se encuentran externas de los tejidos, existe cierta cercanía a los tejidos o grados de proximidad, estos se muestran libres en el suelo, por lo que el tejido más cercano es en la raíz, y existe cierta interacción entre planta-bacteria (de Souza, et al., 2015; Santos, et al., 2018; Rabbee, et al., 2023).

Mayormente en las raíces, hojas y los frutos de las plantas, se encuentran estas interacciones mencionadas anteriormente. Primeramente, para ubicarse en los diferentes tejidos de la planta, pasa por una serie de procesos para poder hospedar en la barrera de la endodermis. Las bacterias alcanzan el sistema vascular atravesando la corteza de la raíz, donde podrán transportarse en los diferentes tejidos de las plantas y posteriormente prosperar como endófitos (de Souza, et al., 2015; López Fernández, et al., 2016; Selim, et al., 2016; Santos, et al., 2018).

Por otro lado, para la prosperidad de las bacterias endófitas, la planta manifiesta condiciones ambientales a través de la secreción, en lo cual consiste una amplia gama de compuestos, de acuerdo con la situación nutrimental y las circunstancias del suelo. Esta acción se le llama exudación radicular, que incluye iones, oxígeno libre y agua, enzimas, mucosa y una amplia versatilidad de metabolitos primarios y secundarios que contienen carbono. Esta acción interfiere con la interacción planta-bacteria y es un factor importante que contribuye a la eficiencia de las cepas de bacterias (de Souza, et al., 2015; Santos, et al., 2018).

La colonización de las bacterias en la planta hospedadora se han observado su capacidad para adaptarse en estos nichos ecológicos específicos, además, resulta una interacción específica sin dañar a la planta. Además, la exudación radicular varía con la edad y el genotipo de la planta, y como resultado solo ciertos microorganismos específicos responden e interactúan con diferentes plantas hospedadoras. Por lo tanto, los inoculantes generalmente están destinados a la única planta específica de la que se aisló la bacteria (de Souza, et al., 2015; Santos, et al., 2018).

Las especies de *Bacillus* son habitantes comunes, en los tejidos internos de las plantas, donde desempeñan un papel importante en la protección y la promoción del crecimiento, por lo que las plantas necesitan de las bacterias y viceversa, generando una relación mutualista (de Souza, et al., 2015; Santos, et al., 2018). Estas diversidades de especies se han mostrado tanto en la carga bacteriana en las plantas y la identificación de ellas, como en el caso de la composición microbiana en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense*), se reportó que la carga microbiana en plantas juveniles, flor, y del fruto es de  $1 \times 10^6$  UFC/g,  $1 \times 10^7$  UFC/g y  $1 \times 10^6$  UFC/g, respetivamente, entre los cuales se han encontrado *Bacillus* en mayor proporción (T. A., et al., 2019). Las cepas mayormente representadas del género como bacterias endófitas son: *B. cereus*, *B. insolitus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, entre otros, son generalmente bacterias que presentan propiedades de protección y promotor de crecimiento de la planta (Santos, et al., 2018). En trabajos como Reva et al. (2002) estudiaron la diversidad de bacterias endófitas promotores de crecimiento en los tejidos internos de plantas de algodón sanas (*Gossypium sp. Dushanbe*), caracterizaron fenotípicamente un total de 76 cepas y la mayoría de ellas se identificaron como *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *B. subtilis*, entre otros, y este último fue el más abundante de las cepas aisladas, que obtuvieron un total de 43 cepas. Por otra parte, Rudrappa et al. (2008) encontraron una especie llamada *Bacillus subtilis* FB17, en la que es atraído por el ácido L-málico, secretado por las raíces de *Arabidopsis thaliana*, en la cual la bacteria forma una bio-película que permite colonizar en la raíz de la planta.

Añadiendo lo anterior, las bacterias de este género han tenido una relación simbiótica en el fruto, e incluso en las semillas de la planta. Esto se debe a que las bacterias les proporciona protección contra amenazas de hongos y bacterias fitopatógenos, además de promover el desarrollo de la semilla. Por ello, la planta asimila bacterias, formando una microbiota dentro de los tejidos como en fruto y semillas (de Souza, et al., 2015; Santos, et al., 2018). Por lo que, se pueden encontrar en nuestros alimentos, como es el caso de chile molido (*Capsicum annuum*), ya que no se realiza un tratamiento previo, y pueden establecerse como

esporas o un medio donde se transportan, o también puede deberse a la contaminación que puede estar presente el género *Bacillus*.

Estas bacterias que pertenecen al género *Bacillus*, ciertas especies están asociados con los animales y seres humanos, las cuales son *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, e incluso se han encontrado otras especies, por ejemplo, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus shaericus*, entre otras más. Por ejemplo, en animales marinos se ha encontrado *Bacillus mycoides*; *Bacillus sphaericus* se ha encontrado en mosquitos del género *Aedes*; y *Bacillus cereus* en polillas del género *Achroia*, *Galleria*, *Ephestia*, entre otras; también en cucarachas que pertenecen al género *Periplaneta*, *Gromphadorina*, entre otros (Tejera Hernández, et al., 2011; Logan & De Vos, 2015; Villareal Delgado, et al., 2018).

De igual importancia, sobre este género, son capaces de estar en ambientes inhóspitos, gracias a su adaptabilidad o por la formación de espora. Se ha encontrado en medios acuáticos, columnas de agua caliente en el mar, depósitos del fondo de agua dulces y marinas, también se han encontrado en lugares con alta acidez, neutros y alcalinos, e incluso de lugares cálidos a fríos y de fértiles a desérticos (Tejera Hernández, et al., 2011; Logan & De Vos, 2015; Villareal Delgado, et al., 2018). Algunas especies parecen ser contaminantes ubicuos del hombre, de los animales, por el agua, de forma natural, doméstico, industrial, entre otros (Tejera Hernández, et al., 2011; Logan & De Vos, 2015). En parte, su amplia distribución se debe en parte a la extraordinaria longevidad de sus esporas, que demuestran una resistencia a diferentes agentes físicos y químicos, como el calor, el frío, la desecación, la radiación, los desinfectantes, los antibióticos y otros agentes tóxicos, o también puede tener la capacidad de habitar y desarrollarse las bacterias del género *Bacillus*, debido a su amplia versatilidad metabólica (Errington, 2003; Tejera Hernández, et al., 2011; Logan & De Vos, 2015; Villareal Delgado, et al., 2018). Aunando lo anterior, hay ejemplos de dichas bacterias, como *Bacillus subterraneus*, que fue aislado de la Gran Cuenca Artesiana de Australia, un acuífero termal de hasta 2km de profundidad (Kanso, et al., 2002); *Bacillus thuringiensis* ha

sido aislado del continente Antártico (Logan & De Vos, 2015); en estudios del aire y polvos, abundan las especies de *Bacillus* cultivables o siendo una gran parte de ella (Al Dagal & Fung, 1993; Venkateswaran, et al., 2001); *Bacillus fumarioli* ha sido aislado en la isla Candlemas, en el archipiélago de Sandwich del sur, y en volcanes situados a unos 5,600km de distancia en la Antártida continental, donde se encontró como espora y células vegetativas en sitios geotérmicos donde las temperaturas del suelo oscilaban entre 3.4°C y 62.5°C, las proporciones de células esporuladas tendían a ser mayores en las temperaturas extremas y menores en temperaturas cercanas a la temperatura óptima de crecimiento del organismo, la cual es de 50°C (Logan, et al., 2000; De Clerck, et al., 2004).

Por otro lado, en algunos alimentos, son el hábitat de especies de *Bacillus*, tanto en alimentos frescos como el chile, lechuga, fresas, plátanos, entre otros, como en los productos ya elaborados industrialmente, como por ejemplo en la leche pasteurizada se han encontrado: *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus smithii*, *Bacillus sporothermodurans*, *Bacillus weihenstephanensis*, entre otros. Se sabe que las especies pueden estar también, en la producción de alimentos tradicionales basados en hojas, semillas y fruto, y frecuentemente se encuentra *Bacillus subtilis* (Logan & De Vos, 2015).

De este modo, Hernández et al. (2022), mostraron que, el chile en polvo obtenidas en ciertas regiones geográficas en México, les resultaron, en base al análisis de ARNr 16S, un alto porcentaje de especies microbianas que pertenecen a la familia *Bacillaceae*, un recuento de aproximadamente  $1 \times 10^5$  UFC/g bacterias mesófilas, de entre las cuales el 98%, pertenecen al género *Bacillus*. Esto se podría deberse a diversos factores, por ejemplo, durante la pre-cosecha, las bacterias podrían haberse alojado en la planta, debido a que son asimiladas en los tejidos; durante las prácticas agrícolas, podría haberse contaminado por medio de las herramientas y maquinaria para la producción o el agua y el suelo usado; otro sería, los factores ambientales, como la lluvia, el viento, entre otros. Por lo que se ha visto previamente, la capacidad de las especies de bacterias de *Bacillus*, de ser adaptables, versátiles, con una extensa distribución geográfica, entre otras

características, surge un especial interés, para el uso como control biológico de microorganismos patógenos, por su diversidad de metabolitos bioactivos como antimicrobianos, conservantes de alimentos, promotoras de crecimiento, entre otras más. De este modo, al encontrar cepas del género *Bacillus* en chile molido (elaborados con *Capsicum annuum* L.), capaces de desarrollarse en dichas condiciones, a su vez, siendo versátiles en controlar hongos fitopatógenos, son considerados como potenciales agentes de control de patógenos en los cultivos.

### **2.3. Hongos fitopatógenos y el control biológico de *Bacillus***

La agricultura es una de las actividades más importantes, debido a que las poblaciones se desarrollan en las áreas económicas, sociales y ambiental, ya que constituye el 80% de los alimentos que se consumen (Villareal Delgado, et al., 2018; Rashad & Moussa, 2020).

No obstante, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), estimó pérdidas entre el 20 y 40% de la producción agrícola anual, debido a las plagas y enfermedades que atacan a las plantas, como los insectos, nematodos, virus, bacterias y hongos, siendo estos las principales causantes de dicha pérdida (Tejera Hernández, et al., 2011; Villareal Delgado, et al., 2018; Rashad & Moussa, 2020; FAO, 2023). Los microorganismos fitopatógenos se comprenden desde nematodos, virus, bacterias, protozoos y hongos, que generan enfermedades en las plantas por medio de la secreción de enzimas, toxinas, fitorreguladores y otras sustancias, capaces de irrumpir el desarrollo normal de la planta (Morath, et al., 2012; Macías Rubalcava, et al., 2018; Dobrzynski, et al., 2023; Rabbee, et al., 2023). Los daños provocados por los fitopatógenos son irremediables en la calidad de los cultivos y en la producción; dejando como consecuencia importantes pérdidas económicas a los agricultores. Además, mientras que la población incrementa a través de los años, también aumenta la demanda de alimentos y por lo tanto se necesita optimizar la producción (de Souza, et al., 2015; Macías Rubalcava, et al., 2018; Dobrzynski, et al., 2023).

Las enfermedades generadas por los microorganismos, globalmente, se estima que daña a más del 15% de los cultivos desprotegidos; de ese porcentaje el 70% son provocados por los hongos fitopatógenos, resultando pérdidas económicas y biológicas (Chatterjee, et al., 2016; Liu, et al., 2017; Asad, 2022). En México, los hongos fitopatógenos son considerados como significativos por su incidencia, severidad y las grandes pérdidas económicas, que ocasionan en los ecosistemas agrícolas (Hernández Gómez, et al., 2016).

Los hongos fitopatógenos generalmente pertenecen al género *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium Vertillicum*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Alternaria* y *Fusarium* (Djonovic, et al., 2007; Hernández Gómez, et al., 2016; Zhang, et al., 2016; Doehlemann, et al., 2017; Krylov, et al., 2018; Li & Chen, 2019; Tyskiewicz, et al., 2022). En la mayoría de los hongos son fitopatógenos, pueden desarrollarse a temperaturas de 20 a 30°C, en pH de entre 4 a 7 y en humedades relativas arriba de 60%. Los síntomas pueden ser morfológicos como clorosis, necrosis, marchitez, pudriciones secas o húmedas, disolución de tejido y crecimiento anormal; histológicos como vacuolisis, plasmólisis, citolisis, hipertrofia e hiperplasia; y fisiológicos como reducción o aumento en la fotosíntesis o respiración, incremento en la transpiración, inmovilización de nutrientes, hormonas o precursores de vías metabólicas. De la misma forma, los síntomas pueden ser localizados que se produce en zona específica u órgano de la planta como: clorosis y halos cloróticos, necrosis, agallas, acucharamientos, verrugas, escobas de bruja y llagas y chancros; también síntomas sistémicos que se visualiza en una zona y extenderse al resto del órgano o en toda la planta, por ejemplo, pudriciones, mal del talluelo, marchitez, muerte descendente, tizón y muerte progresiva (Harlton, et al., 1995; Djonovic, et al., 2007; Hernández Gómez, et al., 2016; Zhang, et al., 2016; Doehlemann, et al., 2017; Krylov, et al., 2018; Li & Chen, 2019; Tyskiewicz, et al., 2022).

Por otro lado, pueden desarrollar estructuras reproductivas o de dispersión en el tejido dañado, los cuales se le denomina signos. Los signos son capaces de infectar e infestarse a través de agua, aire, equipo de trabajo de los agricultores por medio de la formación de las esporas que posteriormente, entran en contacto con la



cosecha, generando de esta forma la enfermedad, causando pérdidas generadas durante la pre y post cosecha de diversos cultivos (Harlton, et al., 1995; Djonovic, et al., 2007; Hernández Gómez, et al., 2016; Zhang, et al., 2016; Doehlemann, et al., 2017; Krylov, et al., 2018; Li & Chen, 2019; Tyskiewicz, et al., 2022).. Entre los géneros de hongos fitopatógenos se pueden destacar, de entre los principales, *Sclerotium*, *Alternaria* y *Fusarium*.

El género *Sclerotium* es un hongo fitopatógeno habitante del suelo con más de 500 hospederos, en dicho género hay una especie que se le puede llamar de dos formas, esa es *Sclerotium rolfsii*, también llamado *Athelia rolfsii* (Hernández Jiménez, et al., 2004; Hameeda, et al., 2010; Xu, et al., 2010; Zhong, et al., 2016; Kumari, et al., 2021; Tejaswini, et al., 2022). Su distribución es mundial, con mayor presencia en las regiones *tropicales* y *subtropicales*. El rango de temperatura en la que sobreviven es de 8°C a 40°C, para su crecimiento óptimo y la formación de esclerocios oscila entre 27°C a 30°C. El género *Sclerotium* tienen la capacidad de formar esclerocios que son unas estructuras de resistencia que le permite sobrevivir en condiciones desfavorables para el micelio e incluso lo protege de fungicidas. Crece en una variedad notablemente amplia de fuentes de carbono y puede utilizar numerosos compuestos orgánicos e inorgánicos. Los síntomas producidos por este género de hongos son ahogamiento de las plántulas, canchros del tallo, tizón de la corona y las pudriciones de la raíz, corona, bulbos, tubérculos y frutos (Hernández Jiménez, et al., 2004; Hameeda, et al., 2010; Xu, et al., 2010; Zhong, et al., 2016; Kumari, et al., 2021; Tejaswini, et al., 2022).

El hongo puede infectar y crecer con una fuente mínima de nutrientes y humedad del suelo, afectado en la parte de la raíz de la planta. El desarrollo de la infección tiene lugar entre el contacto micelial con el huésped. La muerte del tejido ocurre antes de la penetración de las hifas debido a la producción de ácido oxálico, además de una serie de enzimas extracelulares como celulasa, pectina metilesterasa, cutinasa, arabanasa, galactanasa, mananasa, xilanasas, glucosidasas y poligalacturonasas. Ataca desde las plántulas de las plantas, raíces carnosas, bulbos o frutos en contacto con el suelo. Se considera importante en el sureste de

Estados Unidos por los daños a cultivos de algodón (*Gossypium hirsutum* L.), cacahuate (*Arachis hypogaea* L.), jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), y remolacha (*Beta vulgaris* L.). En México sólo existen reportes de su importancia en la costa de Hermosillo, Sonora, en donde se encontraron huertos de manzano (*Malus domestica* Borkh.) con 33% y 64% de árboles dañados. Recientemente en Morelos, se detectó en cebolla (*Allium cepa* L.) afectando la producción en aproximadamente 30%; en Sinaloa ha cobrado importancia en el cultivo de soya (*Glycine max* Merr.) (Hernández Jiménez, et al., 2004; Hameeda, et al., 2010; Xu, et al., 2010; Zhong, et al., 2016; Kumari, et al., 2021; Duarte Leal, et al., 2020; Tejaswini, et al., 2022).

El género *Alternaria*, es un hongo fitopatógeno pigmentado negro, colores oscuros que van desde el gris hasta verde oliva o marrón oliva, capaz de formar rápidamente colonias que provoca una serie de trastornos en plantas y cuyas esporas se encuentran en diversos cultivos. El hongo es capaz de permanecer viable con los restos vegetales del suelo y sus esporas requieren un clima seco, ventoso y cálido, para ser transportados por el aire y diseminarse. *Alternaria alternata* sobrevive a temperaturas de 25°C a 32°C, su crecimiento óptimo es alrededor de 20°C. La forma en que el hongo penetra en la hoja dependerá del hospedante y las condiciones ambientales, en la mayoría realiza la penetración a través de las estomas. La enfermedad afecta a ramas jóvenes, frutos y hojas, causando síntomas como manchas necróticas y tizones foliares de color marrón a negro rodeadas por un halo amarillo, también puede provocar ahogamiento de plántulas, pudriciones del cuello, frutos y tubérculos. Los conidióforos emergen a través de las lesiones y estomas de las hojas infectadas, que permanecen en el árbol o han caído al suelo de la arboleda. Los conidios formados por el género *Alternaria* pueden ser simples o formando cadenas, y su tamaño pueden ser simples y grandes. Se dispersan por lluvias o cambios en la humedad relativa, corrientes de viento, en los frutos y semillas (Pavón, et al., 2015; DeMers, 2022; Wang, et al., 2022; Bacha, et al., 2023).

*Alternaria* spp. puede invadir los cultivos vegetales antes y después de la recolección y es responsable de considerables pérdidas económicas, debido a que reduce el rendimiento de las cosechas y produce alteraciones en los vegetales durante su almacenamiento. Se han reportado alteraciones provocadas por *Alternaria* spp. en una gran variedad de cereales, hortalizas y cultivos frutales, tanto leñosos como herbáceos (Pavón, et al., 2015; DeMers, 2022; Wang, et al., 2022; Bacha, et al., 2023).

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos distribuidos por el suelo y plantas, crece en temperaturas alrededor de los 37 °C, y son considerados oportunistas cuando se encuentra en sus condiciones favorables. Pueden diseminarse a través del agua, por lo que el riego de los cultivos aumenta la incidencia de infección, también se distribuye en semillas, incluso en cultivos infectados e invernaderos pueden servir como reservorios para el hongo (Ma, et al., 2013; Rana, et al., 2017; Summerell, 2019).

El género *Fusarium* tiene la capacidad de producir clamidosporas que le permite sobrevivir por largo tiempo y resistentes a altas temperaturas, su formación está relacionada con factores de estrés, como la ausencia del hospedante, agotamiento de nutrientes y condiciones desfavorables, a su vez, pueden formar macroconidios para la diseminación aérea, agua y semilla de plantas o cultivos y son causantes de síntomas severos en las plantas (Ma, et al., 2013; Rana, et al., 2017; Summerell, 2019).

La enfermedad causada por *Fusarium* se conoce como marchitez vascular. Las plantas infectadas muestran un color amarillento en las hojas, el tallo adquiere un color oscuro o pardo oscuro. El hongo es capaz de sobrevivir en el suelo, usando los nutrientes de restos vegetales, manteniéndose viable hasta 10 años. Cuando una planta sana crece en suelo infectado, el contacto con las raíces induce su germinación y el micelio o la espora penetra directamente por el ápice de las raíces o en las heridas. La especie *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* provoca marchitez o pudrición de tallo, ya que ataca en la plántula, permitiendo que el patógeno alcance a los vasos del xilema, causando la destrucción y el colapso del

tejido. La enfermedad causada por *Fusarium* ha causado grandes pérdidas en una amplia gama cultivos como el maíz (*Zea mays* L.), trigo (*Triticum* spp.), avena (*Avena sativa* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Ma, et al., 2013; Rana, et al., 2017; Summerell, 2019; Villalobos Arámbula, et al., 2020). En México, la producción de trigo (*Triticum aestivum* L.) del ciclo primavera-verano 2012, fue de 184 mil ton obtenidas en una superficie de 86 mil ha, con rendimiento de 2.17 ton/ha, que se concentró en 28 municipios que produjeron el 72% del total nacional. Los principales estados productores de trigo son: Tlaxcala, Oaxaca, Guanajuato, Jalisco, Zacatecas, Puebla, Durango, Michoacán, Morelos, Hidalgo y Estado de México (Mejía Bautista, et al., 2015; Rana, et al., 2017; Summerell, 2019; Villalobos Arámbula, et al., 2020).

Aunando lo anterior, se ha buscado métodos para el control de las pérdidas generadas por los hongos fitopatógenos. Uno de los métodos usados es el uso de químicos sintéticos en los sistemas agrícolas, para la protección de la calidad y rendimiento contra dicho problema (Villareal Delgado, et al., 2018). De esta manera, para combatir las enfermedades en los cultivos, se utilizan compuestos químicos como fungicidas. Sin embargo, el uso indiscriminado o excesivo de productos químicos ha resultado resistencia en diferentes patógenos, a su vez, se reportaron afectaciones a la salud humana y a diversos animales (Jáquez Matas, et al., 2022). Además, algunos plaguicidas sintéticos contaminan las aguas subterráneas y se acumulan en las cadenas alimentarias, empeorando la problemática de contaminación (Villareal Delgado, et al., 2018; Jáquez Matas, et al., 2022). Un ejemplo de ello, es el captan, un fungicida utilizado en México, y se prohibió en distintos países por su efecto cancerígeno (Villareal Delgado, et al., 2018). Por lo tanto, es importante considerar el desarrollo de nuevos métodos de control, que sean capaces de disminuir o mitigar el impacto que generan los productos químicos en la salud y ambiente.

Por otra parte, la incidencia de hongos fitopatógenos puede ser reducida por el uso de prácticas culturales, así como, la rotación de cultivos y sistemas de siembra

por parcelas separadas; en cambio, éstas son deficientes para el control de hongos fitopatógenos (Sainju, et al., 2016).

Por otro lado, en el uso de control biológico, es considerado como una alternativa, en lo cual, se usan hongos y bacterias benéficas, que producen una amplia variedad de metabolitos secundarios, con la capacidad de generar un efecto antagonista en los patógenos. Dentro de estos grupos de hongos y bacterias, están los endófitos y tienen un potencial para usarse como agentes de biocontrol, debido a que sus metabolitos son los causantes de inhibir el crecimiento de los patógenos (Guédez, et al., 2008; Gutiérrez Ramírez, et al., 2013; Villareal Delgado, et al., 2018).

El Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIPE) fundamenta en el uso de todas las técnicas adecuados para combatir las plagas, por ejemplo, métodos químicos, culturales y biológicos. Por consiguiente, es una opción indispensable en el desarrollo de una agricultura sustentable que garantiza la seguridad alimentaria (Baddi, et al., 2001; Reyes Tena, et al., 2015).

En el MIPE se enfatiza el uso de agentes de control biológico como una alternativa sustentable para mitigar los efectos negativos en la productividad y calidad de los cultivos por distintos microorganismos patógenos, permitiendo la producción de alimentos inocuos (Baddi, et al., 2001; Reyes Tena, et al., 2015).

El control biológico en hongos fitopatógenos ha sido estudiado extensivamente, para la consideración de una alternativa con relación al control químico. Al involucrar la utilización de microorganismos antagónicos nativos para mejorar la salud y protección de la planta (Tejera Hernández, et al., 2011; de Souza, et al., 2015; Villareal Delgado, et al., 2018; Rabbee, et al., 2023). Se ha visto el papel que ejecuta dichos microorganismos, por ejemplo, los microorganismos que habitan en la raíz, son considerados como microorganismos rizosféricos, que son representados como la primera línea de defensa de la planta de los microorganismos patógenos, evitando la infección de estos en la raíz (de Souza, et al., 2015; Rabbee, et al., 2023). La mayoría de los microorganismos antagónicos, ya son usados como biopesticidas, algunos géneros como son: *Trichoderma* spp., *Pseudomonas* spp.,

*Streptomyces* spp., *Bacillus* spp., entre otros (Sánchez Fernández, et al., 2013; Rodríguez Mendoza, et al., 2021; Asad, 2022; Tyskiewicz, et al., 2022). Entre ellos, las especies de *Bacillus* son ampliamente usados como agentes de biocontrol (de Souza, et al., 2015; Villareal Delgado, et al., 2018; Rabbee, et al., 2023). Añadiendo lo anterior, como los microorganismos (incluso, especialmente las especies del género *Bacillus*) están en todos los hábitats, debido a su flexibilidad y adaptabilidad metabólica, para su sobrevivencia y desarrollo, por lo que es un buen prospecto para su uso e investigaciones sobre ellas (Logan & De Vos, 2015; Villareal Delgado, et al., 2018; Rodríguez Mendoza, et al., 2021; Rabbee, et al., 2023).

Los agentes de control biológico tienen múltiples mecanismos para inhibir el crecimiento celular de los microorganismos, irrumpir los procesos metabólicos del patógeno, detener el desarrollo de metabolitos generados por el patógeno y el avance de la infección de dichos microorganismos, entre estos mecanismos se enfatizan: A) mecanismos de contacto con el patógeno como, parasitismo y depredación (Chen, et al., 2016); B) la producción de compuestos moleculares con efecto directo sobre el patógeno como antibióticos (lipopéptidos cíclicos), enzimas que causan lisis en la estructura celular del patógeno (quitinasas, glucanasas, proteasas), moléculas que se consideran como residuos no regulados (amoníaco, cianuro de hidróxido) y compuestos orgánicos volátiles (alquenos, alcoholes, cetonas, terpenos, bencenoides, pirazinas, ácidos y ésteres) (Liu, et al., 2011; Zhang, et al., 2016; Mohd Jaaffar, et al., 2017; Piechulla, et al., 2017; Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023) y c) mecanismos indirectos por competencia de espacio y por nutrientes (producción de sideróforos e inducción a la respuesta sistémica en plantas mediante la producción de fitohormonas) (Pal & Gardener, 2006; Yu, et al., 2011; Chowdhury, et al., 2015; Dobrzynski, et al., 2023). Estos mecanismos de acción se observan en cepas microbianas, entre las cuales, el género *Bacillus* se ha estudiado debido a que se encuentran diversas especies en diferentes ecosistemas (suelo, agua y planta), estando presente en mayor proporción en comparación a otros géneros microbianos, y además por sus diversas capacidades metabólicas (Baddi, et al., 2001; Tejera Hernández, et al., 2011; Selim, et al., 2016;

Villareal Delgado, et al., 2018). Las macromoléculas producidas por el metabolismo microbiano incluyen antibióticos, toxinas, sideróforos y moléculas que actúan como señales de comunicación; y son compuestos comunes liberados para estructurar comunidades y poblaciones en hábitats respectivos (Tejera Hernández, et al., 2011; Selim, et al., 2016; Villareal Delgado, et al., 2018).

En el género *Bacillus*, en su evaluación del genoma, ha revelado un porcentaje significativo que tiene relación con la producción de ciertos compuestos o metabolitos secundarios para el control de organismos fitopatógenos, por ejemplo, el 8.5% del genoma de la cepa *B. amyloliquefaciens* FZB42 y el 4% de la cepa *B. subtilis* 168, están relacionados con la producción de lipopéptidos que inhiben a una gran diversidad de hongos fitopatógenos (Raaijmakers & Mazzola, 2012). Además, estas especies que se encuentran en el género *Bacillus*, son usados ampliamente como agentes de control biológico en enfermedades que afectan los cultivos.

Considerando con lo que se mencionó sobre los tres géneros de hongos fitopatógenos (*Sclerotium*, *Alternaria* y *Fusarium*), el género *Bacillus* tienen la capacidad de inhibir dichos hongos. En el caso del género *Sclerotium*, sus antagonistas son *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. velezensis*, *B. atrophaeus*, entre otros (Xu, et al., 2020; Kumari, et al., 2021; Alleluya, et al., 2023). En el género *Alternaria*, *Bacillus vallismorfis* R2 tiene la capacidad de producir lipopéptidos cíclicos capaz de inhibir a *Alternaria alternata*, al igual que, *Bacillus amyloquefaciens* tiene la capacidad de inhibirlo con enzimas líticas, mientras que *Bacillus subtilis* ZD01 tiene la capacidad de inhibir a *Alternaria solani* con compuestos orgánicos volátiles (Kaur, et al., 2016; Zhang, et al., 2020; Kazerooni, et al., 2021). En otro caso, las especies *B. subtilis*, *B. pumilus* y *B. licheniformis* tienen la capacidad de inhibir al género *Fusarium* (Khan, et al., 2017; Khan, et al., 2018).

Por ello, los investigadores tratan de entender, reproducir y optimizar los efectos protectores, que los microorganismos beneficiosos ofrecen a las plantas. Entre los mecanismos más usados son la producción de compuestos, por las cuales estas cepas evitan establecerse en las plantas y el progreso de los hongos fitopatógenos, además lo hacen por medio de secreción de lipopéptidos o

antibióticos, enzimas líticas, sideróforos, induciendo la resistencia sistemática de la planta (RSI) y compuestos orgánicos volátiles (COV) (Chowdhury, et al., 2015; Villareal Delgado, et al., 2018; Zhao, et al., 2022). En particular, entre ellos se destacan los COV, ya que, exhiben propiedades biológicas beneficiosas para la salud de las plantas como: inducir la resistencia contra el estrés abiótico y biótico, mejorar el crecimiento de la planta e inhibir el crecimiento de una gran variedad de hongos y bacterias fitopatógenos (Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023).

## **2.4. Mecanismos de control del género *Bacillus***

### **2.4.1. Producción de lipopéptidos**

El género *Bacillus* tiene la versatilidad de producir ciertos metabolitos con actividad antagónica contra hongos fitopatógenos, lo cual una de ellas es la producción de antibióticos no ribosomales, que está conformada principalmente péptidos de menor masa molecular como los lipopéptidos cíclicos. Los lipopéptidos cíclicos están estructurados con un anillo peptídico unido a un ácido graso, y se puede clasificar en tres grupos (iturinas, fengicinas y surfactinas). Estas moléculas son procesados por diversas enzimas, que se le conoce como sintetetasas de péptidos no ribosomales, las cuales son aparte del RNA mensajero (Valenzuela Ruiz, et al., 2021). La actividad antimicrobiana de dichos compuestos lipopéptidos tiene interacciones con la membrana citoplasmática de las bacterias o de los hongos fitopatógenos, provocando poros o perforaciones y, a su vez, un desbalance osmótico, provocando la muerte de la célula (Tejera Hernández, et al., 2011; Villareal Delgado, et al., 2018). Touré et al. (2004) demostraron que diversos lipopéptidos producidos por *B. subtilis* GA1, en los cuales se conservaban en medios de cultivo líquidos, se probaron en frutos de manzano contaminados con *Botrytis cinerea*, obteniendo inhibiciones significativos en dicho hongo. Además, lograron identificar lipopéptidos que pertenecen a la familia fengicinas e iturinas, son los responsables de inhibir al hongo fitopatógeno. Li et al. (2014) mutaron la cepa *B. amyloliquefaciens* SQR9, inhibiendo el gen de la fosfopanteteína transferasa (sfp), que es la responsable de producir sintetetasas de péptidos no ribosomales, y



así mismo, impidieron la producción de lipopéptidos. En la mutación reflejó una cepa carente de actividad inhibitoria contra distintos hongos fitopatógenos como *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia Sclerotium*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, entre otros.

#### **2.4.2. Producción de enzimas líticas**

*Bacillus* también tienen la capacidad de producir enzimas hidrolíticas como quitinasas, celulasas, lipasas y proteasas, que son degradadores de la pared celular de microorganismos fitopatógenos. La pared celular de los hongos está estructurada por ciertos compuestos de proteínas, carbohidratos y ácidos grasos, y pueden depender de la especie fúngica. Por ejemplo, el porcentaje de polisacáridos de la pared celular de los hongos es de un 80%, aproximadamente. Entre los polisacáridos, se encuentran la quitina y el glucano, que se puede encontrar aproximadamente en un 15% y 55%, respectivamente, en la estructura celular de los hongos fitopatógenos, debido a esto, hay bacterias que al detectar la presencia de una especie fúngica patógena, liberan enzimas líticas como quitinasas y glucanasas, para degradar la estructura celular del hongo (Bowman & Free, 2006). Estos polímeros que contienen en la estructura de los hongos fitopatógenos son esenciales, debido a que forman redes de enlaces glucosídicos, permitiendo así ser rígidos y una estructura estable. Por lo tanto, las enzimas al interferir estos enlaces, causan la deterioración de la pared celular de los hongos fitopatógenos, provocando lisis y la muerte celular (Liu, et al., 2011; Tejera Hernández, et al., 2011; Villareal Delgado, et al., 2018).

Por lo anterior, se han usado bacterias que tengan esta capacidad para el control de hongos fitopatógenos, por ejemplo, Liu et al. (2011) demostraron la actividad enzimática de la quitinasa producida por *B. subtilis* SL-13, para el control de *Rhizoctonia solani*, y purificaron la enzima para evaluar directamente su actividad inhibitoria contra el mismo patógeno. Huang et al. (2005) clonaron el gen chiCW (gen usado para la producción de enzimas quitinolítica) de *B. cereus* 28-9 en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  para observar la actividad inhibitoria de la enzima, y resultó

que tiene una alta actividad inhibitoria sobre las esporas de *Botrytis elliptica*, rompiendo la estructura y así evitando su germinación. Por otro lado, estudios enfocados a optimizar la producción y mejorar la actividad antifúngica de algunas especies del género *Bacillus*, lograron insertar genes codificantes de enzimas líticas, de una especie a otra especie, por ejemplo, el gen ChiA de *B. subtilis* F29-3 fue insertado en *B. circulans*, obteniendo una cepa más agresiva contra *Botrytis elliptica* (Chen, et al., 2016).

### **2.4.3. Producción de sideróforos**

Los sideróforos son metabolitos secundarios compuestos de péptidos no ribosómicos que actúan como quelantes de metales, con bajo peso molecular y con alta afinidad. El hierro (Fe) es un nutriente importante para el buen funcionamiento de los procesos metabólicos de diversos microorganismos, por medio de ella pueden realizar reacciones redox de las proteínas con cofactores (Fe-S), también para el transporte de electrones y realizar reacciones enzimáticas (Villareal Delgado, et al., 2018). El Fe se encuentra, en mayor proporción en la naturaleza, de la forma férrica ( $Fe^{3+}$ ), en lo cual, tiene baja solubilidad, perturbando su aplicación en algunos seres vivos. Debido a esto, ciertos microorganismos han desarrollado mecanismos para la asimilación de este micronutriente (Thyagarajam, et al., 2017). Los sideróforos tienen la función de ser quelantes del  $Fe^{3+}$ , para hacerlos solubles y ser aprovechados por organismos, además, se pueden clasificar en: hidroxamatos, catecolatos, carboxilatos, fenolatos, y pueden estar presentes dos o más de estos grupos (Wilson, et al., 2016). Una amplia gama de especies bacterianas es capaz de controlar el crecimiento de hongos fitopatógenos con los sideróforos, debido a que las bacterias, reducen la concentración de hierro formado quelatos de  $Fe^{3+}$ -sideróforo, obteniendo ellos primero los nutrientes esenciales en el medio y dejando un medio carente de hierro. Dicha actividad han sido observadas mayormente en bacterias del género *Bacillus*, para el control de hongos fitopatógenos cuyo crecimiento depende de nutrientes esenciales para su crecimiento (Villareal Delgado, et al., 2018).

#### **2.4.4. Respuesta sistemática inducida**

Las plantas a través de los años han sido amenazadas constantemente por la exposición de patógenos, debido a ello, desarrollaron mecanismos de defensa para su protección. Dichos mecanismos se encuentran reservados en la planta, y pueden ser inducidos por estímulos en la interacción con microorganismos patógenos. A esto se le conoce como resistencia sistémica adquirida (RAS) (Pieterse, et al., 1998; Pieterse, et al., 2014).

RAS es activado por medio de dos receptores, las cuales son: los receptores de reconocimiento de patrón (RRP) y repetición rica en leucina de unión a nucleótidos (RRL-UN) (Pieterse, et al., 1998; Pieterse, et al., 2014). Los patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PMAP o PMAM) son componentes celulares como quitina fúngica o flagelina, lo cual, al percibirlo la planta se desencadena la primera línea de defensa, conocida como PAMP-inmunidad desencadenada (PMAP-ID). Ciertos patógenos utilizan mecanismos para evadir a PMAP-ID, sin embargo, la planta puede desencadenar una segunda línea de defensa, la cual es actividad al percibir proteínas efectoras de virulencia mediante receptores RRL-UN (Pieterse, et al., 1998; Pieterse, et al., 2014). Resistencia sistemática adquirida es dependiente de ciertos compuestos que funcionan como señaladores, por ejemplo, el ácido salicílico (AS) activa genes relación patogénica (RP) codificando varias proteínas RP con actividad antimicrobiana (RP1). Del mismo modo, RAS puede ser inducida al manipular la concentración o presencia de los compuestos para inducir a dicha respuesta sistémica en plantas, y se le denomina como resistencia sistemática inducida (RSI), dichas señales químicas (elicitors) pueden ser producidas por microorganismos benéficos (Pieterse, et al., 1998; Pieterse, et al., 2014). No obstante, la resistencia sistemática adquirida y respuesta sistemática inducida son mecanismos similares, con la diferencia de que la respuesta sistemática inducida es dependiente de algunos compuestos como el ácido jasmónico y etileno (Pieterse, et al., 1998; Pieterse, et al., 2014).

#### **2.4.5. Producción de compuestos orgánicos volátiles**

Los compuestos orgánicos volátiles (COV) son metabolitos secundarios caracterizado por ser compuestos pequeños y baja masa molecular, solubles debido a su polaridad, con ciertos olores particulares, alta presión de vapor, punto de ebullición bajo y una fracción lipófilica (Morath, et al., 2012; Macías Rubalcava, et al., 2018; Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023). Estas propiedades facilitan su vaporización, difusión y dispersión a través del suelo, por sus poros. Los volátiles microbianos se clasifican en diferentes grupos, como en alquenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, terpenos, bencenoides, pirazinas, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, ácidos, ésteres, compuestos nitrogenados y azufre (Morath, et al., 2012; Macías Rubalcava, et al., 2018; Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023). Dichos compuestos muestran propiedades beneficiosas para la salud de las plantas como: inducir la resistencia contra el estrés abiótico y biótico, mejorar el desarrollo de la planta y la protección de microorganismos patógenos (Morath, et al., 2012; Macías Rubalcava, et al., 2018; Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023).

Dichos compuestos volátiles, producidos por cada microorganismo, pueden estar presentes en una mezcla amplia de diversas clases químicas. A esa mezcla se le puede llamar volatilomas, puede variar según el productor tanto de la misma especie como otras especies, y las condiciones en que se desarrolla, por ejemplo, las condiciones del medio, composición o nutrientes que pueden obtener, la etapa de crecimiento, humedad, temperatura, presencia de oxígeno y dióxido de carbono, e interacciones con otros organismos (Almeida, et al., 2023).

Los COV tiene diversas funcionalidades y, por lo que se menciona anteriormente, permite ser una alternativa viable para el bio-control de sinfín de patógenos, además se han reportado que no son tóxicos para los agricultores y ayudará a disminuir los productos químicos que se usan para controlar a hongos fitopatógenos (Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023).

Las plantas, los insectos, los hongos y las bacterias tienen esta capacidad de producir dichos compuestos. Sin embargo, los de mayor interés agrícola, son los compuestos orgánicos volátiles usados para el control de hongos fitopatógenos, que

es su mayoría, los producen plantas, hongos y bacterias (Davis, et al., 2013; Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023). Los COV provienen del metabolismo primario y también, a partir del metabolismo secundario (Korpi, et al., 2009; Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023). Algunas de las vías que se producen dichos compuestos son: A) Vía de la glucosa, implica la síntesis de compuestos aldehídos, alcoholes y cetonas (Korpi, et al., 2009; Tyc, et al., 2017; Veselova, et al., 2019; Ullah, et al., 2020); B) El ciclo de Krebs, donde la energía almacenada es liberada a través de la oxidación del acetil-CoA de los carbohidratos, lípidos y proteínas (Korpi, et al., 2009; Tyc, et al., 2017; Veselova, et al., 2019; Ullah, et al., 2020); C) Vía metileritrol fosfato (MEP), implica la síntesis de isoprenoides y está presente en bacterias y hongos (Korpi, et al., 2009; Tyc, et al., 2017; Veselova, et al., 2019; Ullah, et al., 2020); D) Ácido mevalónico, se ha encontrado en plantas generando isoprenos, para su protección de altas temperaturas, también se ha mostrado que en bacterias les permite producir COV como terpenos, isoprenos y cetonas (Korpi, et al., 2009; Tyc, et al., 2017; Veselova, et al., 2019; Ullah, et al., 2020); y E) Vía del shikimato participa en la síntesis de compuestos aromáticos en bacterias y hongos (Korpi, et al., 2009; Tyc, et al., 2017; Veselova, et al., 2019; Ullah, et al., 2020).

Entre los hongos que pueden producir COV son: *Candida sake* que demostró inhibición con compuestos volátiles contra *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* (Arrarte, et al., 2017); en el caso de *Trichoderma gamsii* mostró inhibición contra *Phoma herbarum*, *Fusarium flocciferum*, *Scytalidium lignicola* y *Epicocum nigrum* (Chen, et al., 2016); *Muscodor crispans* que mostró la capacidad de inhibir a *Pythium ultimum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Sclerotinia Sclerotium* y *Mycosphaerella fijensis* (Mitchell, et al., 2010).

Las levaduras también son capaces de producir COV con actividad antifúngica como *Aureobasidium pullulans*, que ha mostrado inhibición en *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, entre otros (Chen, et al., 2018); *Saccharomyces cerevisiae* mostró inhibición contra *Botrytis cinerea*, entre otros (Chen, et al., 2018); otra levadura que produce volátiles con actividad inhibitoria es *Hanseniaspora*

*uvarum*, y ha sido capaz de inhibir *Botrytis cinerea* (Qin, et al., 2017; Guo, et al., 2019).

Los hongos y las levaduras no son los únicos que son capaces de controlar hongos fitopatógenos, a su vez, se han mostrado el potencial de las bacterias de producir COV que controlan diferentes enfermedades de las plantas, además en las bacterias se pueden encontrar diversidad de géneros y especies (Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023). Por ejemplo, algunas especies del género *Pseudomonas*, mostraron capacidad de inhibir *Athelia rolfsii*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, entre otros (Sheron, et al., 2015; Ossowicki, et al., 2017; Rojas Solís, et al., 2018; Reverchon, et al., 2019); otro género de bacterias es *Lysobacter*, como la especie *Lysobacter capsici* es capaz de inhibir *Pythium ultimum* y *Sclerotinia minor* (Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023); en el género *Enterobacter*, podemos encontrar la especie *Enterobacter cloacae*, que es capaz de inhibir *Exserohilum turcicum* y *Magnaporthe oryzae* (Vlassi, et al., 2020); en el caso del género *Bacillus*, hay una gran variedad de especies que son candidatos excelentes como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos, como por ejemplo, *Bacillus pumilus* es capaz de inhibir a *Alternaria alternata*, *Alternaria brassicae*, *Alternaria solani*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia Sclerotium*, entre otros más, en el caso de *Bacillus subtilis* puede inhibir a *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Botrytis mali*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, entre otros (Liu, et al., 2008; Morita, et al., 2019; Almeida, et al., 2023). Otras especies que presentaron inhibición en hongos fitopatógenos con COV son: *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus mycoides*, entre otros (Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023). Añadiendo a lo anterior, en este género es capaz de habitar diversos lugares y conociendo que las producciones de los compuestos volátiles pueden ser influenciados por muchos factores, dicho género podría ser importante estudiar el género y combinar diversas condiciones (Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023).

Añadiendo lo anterior, los géneros de hongos considerados como fitopatógenos que se mencionó anteriormente, entre las más importantes, que son *Sclerotium*, *Alternaria* y *Fusarium*, hay reportes sobre microorganismos capaces de inhibir con COV. Por ejemplo, en el caso de *Sclerotium rolfsii*, sabiendo que también se puede llamar *Atheli rolfsii*, las especies *Bacillus megaterium*, *Burkholderia tropica* y *Pseudomonas putida*, producen COV que inhiben al dicho hongo (Tenorio Salgado, et al., 2013; Sheoran, et al., 2015; Munjal, et al., 2016), incluso en México, en la industria QUIMIA, ha desarrollado un producto comercializado que contiene esporas suspendidas de *Bacillus subtilis* Q11, que ha mostrado antagonismo con COV contra *Sclerotium rolfsii*, con una inhibición del 100% en 48 horas (Hernández Gómez, et al., 2016). Las especies que pueden inhibir con COV son: *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, y *Burkholderia ambifaria* pueden inhibir a la especie *Alternaria alternata*; *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis* y *PeaniBacillus polymyxa*, inhiben a *Alternaria solani*, al igual que, *Alternaria brassicae* (Chaurasia, et al., 2005; Liu, et al., 2008; Groenhagen, et al., 2013; Asari, et al., 2016; Morita, et al., 2019; Myo, et al., 2019). En el caso del género *Fusarium*, las especies que pueden inhibir con COV son: *Bacillus pumilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Lysinibacillus* sp., *PeaniBacillus polymyxa*, entre otros más (Liu, et al., 2008; Yuan, et al., 2012; Che, et al., 2017; Gao, et al., 2017); *Bacillus velezensis* inhibe a la especie *Fusarium redolens* (Cheffi, et al., 2019); *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus acidiceler*, *Bacillus aerius*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus stratosphericus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Lysinibacillus* sp., entre otros más, inhiben a la especie *Fusarium solani* (Li, et al., 2015; Che, et al., 2017; Guevara Avendaño, et al., 2019).

Por lo anterior, se ha estudiado la actividad antifúngica por cada compuesto del volatiloma de diversos microorganismos, para observar la efectividad de su función. Por lo que, podemos encontrar de los volátiles, diferentes clases químicas que se mencionaron anteriormente, por ejemplo, en la clase de alcoholes podemos ver a 2-etil-1-hexanol capaz de inhibir a *Colletotrichum acutatum*, *Peronophythora litchii*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia Sclerotium*; otro alcohol que presenta

inhibición es el 3-metil-1-butanol contra *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*, *Fusarium oxysporum*, *Molillina fructicola*, *Molillina fructigena*, *Phytophthora crispans*, entre otros; otro compuesto del grupo de alcoholes que muestra actividad antifúngica es 1-butanol, producido por *Bacillus subtilis* SV75-1, que inhibió el 33% del micelio de *Fusarium oxysporum* (Dilantha Fernando, et al., 2005; Chaves López, et al., 2015; Di Francesco, et al., 2015; Che, et al., 2017; Di Francesco, et al., 2017; Guo, et al., 2019; Syed-Ab-Rahman, et al., 2019; Zheng, et al., 2019; Di Francesco, et al., 2020; Almeida, et al., 2023).

Otra clase química de interés son los ésteres, en los cuales, hay gran variedad con propiedades antifúngicas, por ejemplo, 2-metilbutirato de etilo puede inhibir a *Colletotrichum lindemuthianum* y *Botrytis cinerea*; 3-hidroxibutirato de etilo es capaz de inhibir a *Botrytis cinerea*; acetato de etilo puede inhibir a *Botrytis cinerea* y *Phyllosticta citricarpa*; propionato de etilo inhibe a *Botrytis cinerea* (Guo, et al., 2019; Martins, et al., 2019).

Otros compuestos con actividad antifúngica de importancia son: de la clase de pirazinas están metil-pirazina (también llamada 2-metil-pirazina) que es capaz de inhibir *Athelia rolfsii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Giberella moliniformis*, *Magnaporthe oryzae*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, entre otros, y 2,5-dimetil-pirazina también tienen una amplia gama de inhibición sobre hongos fitopatógenos, por ejemplo, *Athelia rolfsii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Giberella moliniformis*, *Magnaporthe oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia Sclerotium*, entre otros (Munjaj, et al., 2016; Agisha, et al., 2019). En la clase de los aromáticos podemos encontrar el tolueno, que tiene la capacidad de inhibir a *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* y *Sclerotinia sclerotiorum* (Raza, et al., 2015; Wu, et al., 2015; Raza, et al., 2016); otro compuesto de esta clase es el fenol que mostró inhibición contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Raza, et al., 2015). Los tioéteres como el disulfuro de dimetilo es otra clase de compuestos que presenta antagonismo contra hongos fitopatógenos, por ejemplo, *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Phytium aphanidermatum*, *Phytium ultimum*, *Rhizoctonia solanis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Athelia rolfsii*, *Colletotrichum*



*gloeosporioides*, *Giberella moliniformis*, *Magnaporthe oryzae*, entre otros (Dilantha Fernando, et al., 2005; Raza, et al., 2016; Ossowicki, et al., 2017; Huang, et al., 2018; Rojas Solís, et al., 2018; Guevara Avendaño, et al., 2019).

Por otro lado, también se han observado la efectividad de los compuestos en conjunto, por ejemplo, la mezcla de 1,3,5-tricloro-2-metoxibenceno (benzenoide), el metil butanoato (éster), 3-octanona (cetona), metil 2-metilpentanoato (éster) y metil 3-metilpentanoato (éster), producidos por especies de *Streptomyces*, inhibieron el 100% al fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Cordovez, et al., 2015). Otra mezcla de compuestos volátiles, producidos por *Saccharomyces cerevisiae*, las cuales son etanol (alcohol), acetato de etilo (éster), 2-metil-1-butanol (alcohol), 3-metil-1-butanol (alcohol), 2-feniletanol (alcohol) y octanoato de etilo (éster), fueron capaces en conjunto inhibir el crecimiento hasta un 100% a *Phyllosticta citricarpa* (Toffano, et al., 2017). Hay diversos reportes de que, en combinación de los COV, podría ser más efectiva la inhibición de los hongos fitopatógenos, por lo que es conveniente usar el agente microbiano o usar sus compuestos bioactivos.

De la misma forma, han observado los efectos que provocan los COV en la morfología y en la fisiología de los fitopatógenos. En los cambios morfológicos podemos ver cambios en la morfología de la colonia del fitopatógeno, pérdida de componentes intracelulares, vacuolización y ruptura de hifas o de sus células. En los cambios fisiológicos o moleculares son interferencia en las regulaciones del metabolismo, estrés oxidativo, inhibir los factores de virulencia y en los transportadores de casete de unión de ATP (ABC) (Almeida, et al., 2023). Por ejemplo, *Burkholderia tropica* al producir volátiles contra *Fusarium oxysporum*, modificaron sus células, cambiaron de la forma media luna a formaciones esféricas, degradación de las paredes celulares, rotura de las células, fuga de sustancias, entre otras (Tenorio Salgado, et al., 2013).

Por lo anterior sería importante el aislamiento y caracterización de bacterias del género *Bacillus* a partir de chile molido y determinar su actividad antagónica contra hongos fitopatógenos a través de compuestos orgánicos volátiles. Esto se debe a que existen diferencias en la producción de COV entre las especies, e

incluso puede haber diferencias de la misma especie, según en el hábitat que se desarrolla, adaptación, su genética y fenotipo, dando así, diversas cepas importantes, con la capacidad de producir amplia gama de compuestos volátiles con actividad antifúngica en diferentes condiciones de desarrollo de cada cepa encontrada.

### **3. Hipótesis**

Las bacterias del género *Bacillus* obtenidas del chile molido (*Capsicum annuum* L.), tienen la capacidad de producir compuestos orgánicos volátiles con actividad antifúngica contra *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.

#### **4. Objetivo general**

Evaluar la actividad antifúngica de los aislados de *Bacillus* spp., obtenidos del chile molido a través de la producción de compuestos orgánicos volátiles, contra *Sclerotium rolfii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.

##### **4.1. Objetivos específicos**

- ▶ Determinar la actividad antifúngica de aislados bacterianos obtenidos de chile molido contra *Sclerotium rolfii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.
- ▶ Identificar los aislados bacterianos que presenten actividad antifúngica contra *Sclerotium rolfii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.
- ▶ Analizar el perfil de los compuestos orgánicos volátiles producidos por las cepas de *Bacillus* que presentan actividad antifúngica contra *Sclerotium rolfii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.

## 5. Metodología

### 5.1. Obtención de muestras de chile molido

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de biología molecular de microorganismos, ubicado en la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

Las muestras de chile molido elaborado de *Capsicum annuum* L. fueron obtenidas de diferentes proveedores del estado de Querétaro y Zacatecas. Muestra M10 es un chile en polvo obtenido de un mercado local en la ciudad de Querétaro, México. Muestra M11 y M13 es un chile en polvo obtenido de productores del estado de Zacatecas, México. Muestra M12 es un chile en polvo de productor local del estado de Querétaro, México. Para cada muestra son 250g de chile molido donde se colectaron en frascos de Schott estériles y mantenidos a una temperatura de 10°C.

### 5.2. Aislamiento de cepas de *Bacillus* de muestras de chile molido

El aislamiento se realizó, tomando 10g de cada muestra en tubos de ensayo de vidrio con tapa hermética (FALCON), y se suspendió en 90mL de agua peptona (0.1%) y se sometió a 80°C por 15min para la eliminación de bacterias no esporuladas, para obtener esporas de *Bacillus*. A continuación, se realizó una dilución seriada, a su vez, se sembraron por medio de la técnica extendido en placa, en cajas petri de poliestireno con agar triptona de soja (Difco Laboratories; Detroit, MI. USA). La incubación se mantuvo en condiciones aeróbicas a 30°C por 24h. Se seleccionaron aislados bacterianos con fenotipo diferentes (por medio de la formación de la colonia) y se sembró por medio de la técnica siembra por estría para obtener colonias aisladas, en cajas petri con agar triptona de soja y se incubaron en condiciones aeróbicas a 30°C por 24h. Su almacenamiento se realizó en un sistema de cultivo que incluye caldo triptona de soja (Difco Laboratories; Detroit, MI. USA) y glicerol al 25%, y en una temperatura de -10°C.

### 5.3. Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de cepas aisladas de muestras de Chile contra *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*

Las cepas bacterianas se suspendieron en 500 µL de agua peptona, a una concentración de  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>, se sembró 100 µl en cajas de petri con agar triptona de soja, en extensión en placa. Por otro lado, se colocaron un disco de 5mm de micelio de cada patógeno por separado sobre placas de petri con agar papa dextrosa (Difco Laboratories; Detroit, MI. USA). Las cepas de hongos fitopatógenos (*S. rolfsii*, *A. alternata* y *F. oxysporum*) y cepa de control positivo (*Bacillus subtilis* Q11), esta cepa se conoce que produce compuestos orgánicos volátiles con actividad antifúngica, y se utilizó para seleccionar y comparar las bacterias aisladas con actividad antifúngica similares o mayor porcentaje de inhibición (Hernández Gómez, et al., 2016), los cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de plantas y biotecnología agrícola de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro. La técnica de placas intercaladas se usó para evaluar la actividad antagónica de los COV producidos por los aislados de bacterias, en la cual consiste en que la caja de petri con agar de soya triptona de soya, se coloca en la parte inferior con el aislado de bacteriano, y en la parte superior la caja con agar papa dextrosa con un disco de 8 mm del hongo y ambas partes de las cajas se sellaron con parafilm (PAPEL PARAFILM® 100MM X 75M, NATURAL) (Dennis & Webster, 1971). Se incubaron a 28 °C durante 8 días y se midió el diámetro del crecimiento micelial por cada 24 h para calcular el porcentaje de inhibición. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$I \% = \frac{C - T}{C} \times 100\%$$

Donde C es el diámetro (mm) de crecimiento del control y T es el diámetro (mm) del crecimiento del hongo expuesto a cada uno de los tratamientos.

Los residuos biológicos de cepas de *Bacillus*, *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* serán manejados de acuerdo a la norma NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 y de acuerdo al convenio de residuos peligrosos que tiene la Facultad de Química con una empresa privada.

#### **5.4. Identificación de los aislados bacterianos**

La identificación de los aislados que presentaron la capacidad de inhibir *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*, se llevó a cabo la amplificación del gen 16s rDNA para cada uno de ellos. Los oligos utilizados para esta amplificación fue: FD1: 5´- CCG AAT TCG TCG ACA ACA GAG TTT GAT CCT GGC TCA G y RD1: 5´- CCC GGG ATC CAA GCT TAA GGA GGT GAT CCA GCC (Invitrogen) (Weisburg, et al., 1991) que amplifican un segmento del gen de aproximadamente 900pb. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen total de 30µl usando la mezcla Platinum PCR Supermix High Fidelity (Invitrogen) y 1µl de cada primer FD1 y RD1 (10pmoles). El programa de PCR se llevó a cabo en un C1000 Thermal Cycler Bio-Rad bajo las siguientes condiciones: 94°C por 2min; 30 ciclos de 94°C por 30s, 45°C por 40s, y 72°C por 2min; y una extensión final de 5min a 72°C.

Una vez finalizada la reacción de PCR, se procedió a verificar los productos en un gel de agarosa al 2%. Para la purificación del producto de PCR se utilizó el DNA Clean Concentrator -5 kit (Zymo Research). Se mandaron a Macrogen. Las secuencias fueron comparadas con la base de datos de Ribosomal Database Project (RDP) en la sección de classifier (Wang, et al., 2007) con el fin de determinar el género bacteriano al que corresponden las secuencias. Además, se analizaron las secuencias con el banco de datos del NCBI mediante el software Blast (<http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) buscando homología con secuencias de organismos ya reportados. Dicho alineamiento fue importado por el programa MEGA X (Tamura, et al., 2007) para la construcción del árbol filogenético, utilizando el método Neighbor Joining (NJ), con valores de bootstrap de 1000 unidades. (Letunic & Bork, 2007).

### **5.5. Recolección y extracción de compuestos orgánicos volátiles con la técnica micro extracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME)**

La cepa de mayor actividad antifúngica se sembró en cajas petri con agar triptona de soja por 24 h, después se inoculó en frascos de 100 mL con tapa septum de teflón/silicón con 40 mL caldo de triptona de soja durante 48 h con una agitación de 180 rpm. La muestra inoculada se calentó a 50 °C durante 1 h para su extracción con fibra de microextracción en fase sólida de 2 cm compuesta por PDMS/DVB/CAR (Supelco, Sigma Aldrich, California, EUA) (He, et al., 2020).

### **5.6. Análisis de los compuestos orgánicos volátiles por la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)**

Se utilizó una columna capilar Hp-5MS (60m x 250 µm de diámetro, 0.25 µm de espesor de fase, Agilent Technologies Inc., California, EUA). En cuanto al programa de temperatura del horno se estableció las siguientes condiciones: 40 °C por 3 min, para luego incrementar a 180 °C con una velocidad de 5 °C min<sup>-1</sup>, un último incremento a 260 °C, fue aplicado con una velocidad de 20 °C/min donde se mantuvo por 5 min. El gas de arrastre utilizado fue Helio (ultra alta pureza, 99.999%), a flujo constante de 1 mL min<sup>-1</sup> (He, et al., 2020).

El detector de espectrometría de masas se utilizó en modo de impacto electrónico a 70 eV, con un Gain Factor de 1 y con temperaturas de línea de transferencia, fuente de ionización y cuadrupolo de 280 °C, 230 °C y 150 °C respectivamente, y un rango de masas de 33 a 500 uma. La fibra fue desorbida térmicamente a 250 °C en el puerto de inyección en modo splitless de un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent Technologies, Inc., California, EUA), acoplado a un detector de espectrometría de masas cuadrupolar modelo 5975C (Agilent Technologies, Inc., California, EUA). El gas de arrastre fue de Helio (pureza 99.999%), a flujo constante de 1 mL/min. La identificación de los compuestos volátiles se realizó a partir de su espectro de masas, comparando con los espectros



la base de datos NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library, versión 2017, USA (He, et al., 2020).

### **5.7. Análisis estadístico**

La evaluación de la actividad antifúngica de cepas aisladas de muestras de Chile molido contra *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* se realizaron por triplicado por cada cepa de *Bacillus* por cada hongo fitopatógeno, con un control positivo (*Bacillus subtilis* Q11) y un control negativo, se analizaron mediante software Minitab 19 y se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) de una vía y una prueba de LSD (Least significant difference) de Fisher con un nivel de confianza de  $p < 0.05$  para identificar diferencias estadísticas.

## 6. Resultados:

### 6.1. Aislamiento de *Bacillus* spp. en muestras de chile molido

Un total de 80 aislados bacterianos fueron obtenidos de 4 muestras de chile molido. La distribución de los aislados se muestra en la Tabla 1 y se describe de la siguiente manera: 20 aislados bacterianos obtenidos de la muestra M10, 20 aislados bacterianos obtenidos de la muestra M11, 18 aislados bacterianos obtenidos de la muestra M12 y 27 aislados bacterianos obtenidos de la muestra M13. Para evaluar su capacidad antagónica, se hizo un escrutinio de los aislados bacterianos contra el hongo *Sclerotium rolfsii*. Este hongo tiene un crecimiento micelial radial con un promedio  $2.13 \text{ cm día}^{-1}$ , y por lo tanto se puede obtener resultados en poco tiempo.

Los resultados mostraron que el 40% de los aislados de la muestra M10 presentaron un porcentaje de inhibición del crecimiento radial entre el 50% y 90% comparado con el control, mientras que el resto de aislados presentaron un porcentaje de inhibición debajo del 50%. Por otro lado, el 40% de los aislados de la muestra M11 presentaron porcentajes de inhibición del crecimiento radial entre 50% y 85% comparado con el control, mientras que el resto de los aislados presentaron un porcentaje de inhibición debajo del 50%. Por otra parte, el 40% de los aislados de la muestra M12 presentaron porcentajes de inhibición del crecimiento radial entre 50% y 90% comparado con el control, mientras que el resto de aislados presentaron un porcentaje de inhibición abajo del 50%. Sin embargo, el 15% de los aislados de la muestra M13 presentaron porcentajes de inhibición del crecimiento radial entre 30% y 40% comparado con el control, mientras que el resto de los aislados presento un porcentaje de inhibición por debajo del 30%.

Sitio de la muestra	Código de la muestra	Número de aislados	Porcentaje de aislados con actividad antifúngica (%)
Mercado local en la ciudad de Querétaro, México.	M10	20	40
Productor local en el estado de Zacatecas, México.	M11	20	40
Productor local en el estado de Querétaro, México.	M12	18	40
Productor local en el estado de Zacatecas, México.	M13	27	15

**Tabla 1.** Porcentaje de aislados bacterianos con actividad antifúngica contra *Sclerotium rolfsii*.

## 6.2. Características de los aislados obtenidos

En base los resultados obtenidos previamente, se seleccionaron 11 aislados bacterianos con mayor actividad antifúngica contra *S. rolfsii*, los cuales son: M10-11, M10-13, M10-16-1 y M10-16-2 de la muestra M10; M11-1-1, M11-1-2, M11-2 y M11-18-1 de la muestra M11; M12-5-1, M12-5-2 y M12-7 de la muestra M12. Los porcentajes de inhibición se muestran en la Figura 2A, y se describen de la siguiente manera: Los 4 aislados bacterianos seleccionados de la muestra M10, sus porcentajes de inhibición contra *S. rolfsii* son: M10-16-2 con 81% de inhibición, M10-16-1 con 66% de inhibición, M10-13 con 57% de inhibición y M10-11 con 50% de inhibición, de los cuales estadísticamente presentan porcentajes de inhibición similares con *Bacillus subtilis* Q11 (control positivo). Los 4 aislados bacterianos seleccionados de la muestra M11, sus porcentajes de inhibición contra *S. rolfsii* son: M11-1-2 con 84% de inhibición, M11-18-1 con 81% de inhibición, M11-2 con 62% de inhibición y M11-1-1 con 55% de inhibición, del cual M11-1-2 presentó mayor

porcentaje de inhibición comparado con el control positivo, y el resto de los aislados bacterianos seleccionados de la muestra M11, presentaron porcentajes de inhibición estadísticamente similares al control positivo. Los 3 aislados bacterianos seleccionados de la muestra M12, sus porcentajes de inhibición contra *S. rolfsii* son: M12-5-1 con 90% de inhibición, M12-5-2 con 85% de inhibición y M12-7 con 62%, del cual M12-5-1 presentó mayor porcentaje de inhibición comparado con el control positivo, y el resto de los aislados bacterianos seleccionados de la muestra M12, presentaron porcentajes de inhibición estadísticamente similares al control positivo.

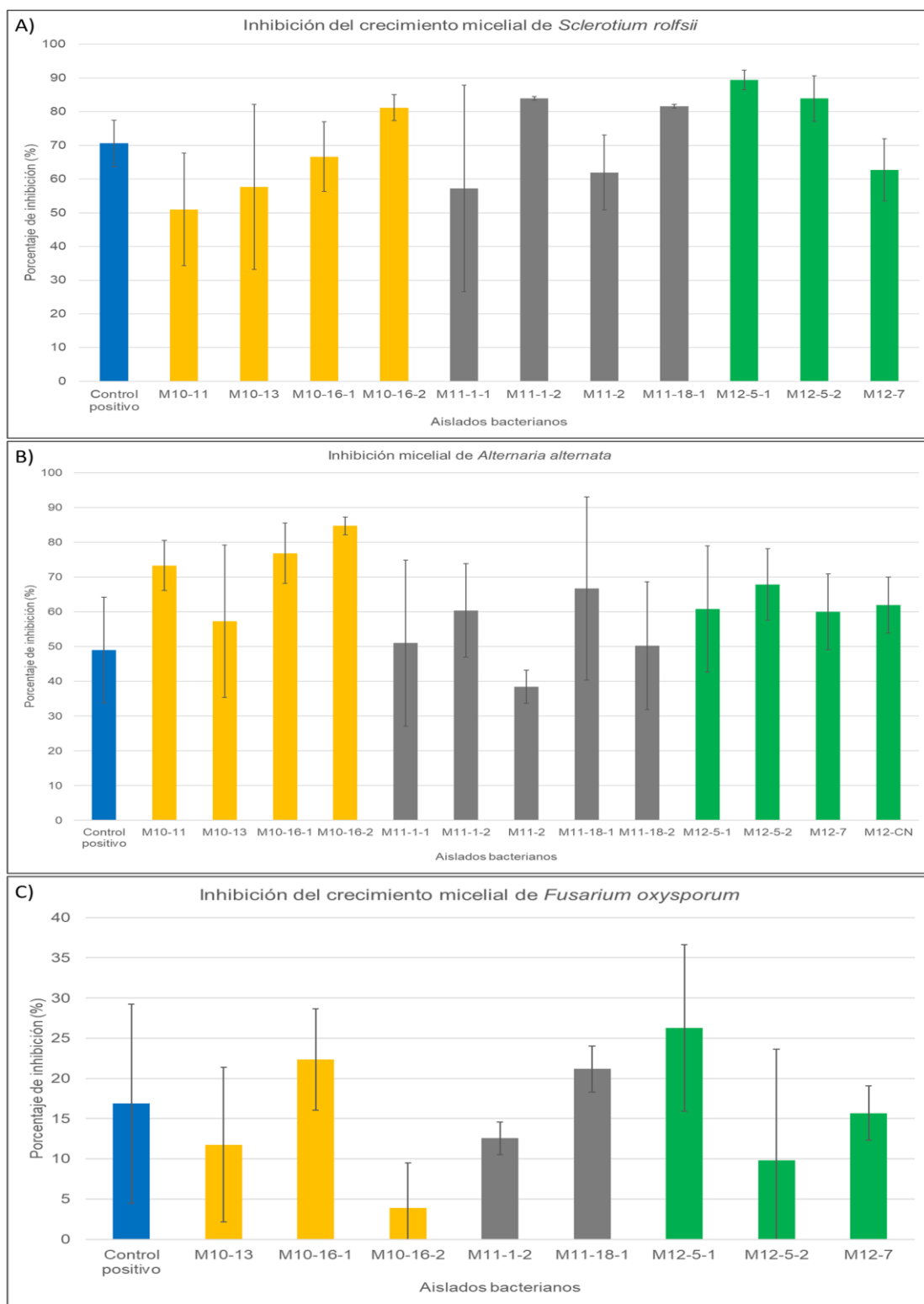
Basándose en lo anterior, además de los 11 aislados bacterianos selectos, se seleccionaron 2 aislados bacterianos, que no presentaron inhibición contra *S. rolfsii*, pero que fueron seleccionados para evaluar la actividad antagónica contra otros hongos fitopatógenos. Los 2 aislados bacterianos seleccionados son: M11-18-2 obtenido de la muestra M11 y M12-CN obtenido de la muestra M12, lo cual resulta un total de 13 aislados bacterianos seleccionados, que se distribuye de la siguiente manera: M10-11, M10-13, M10-16-1 y M10-16-2, 4 aislados bacterianos de la muestra M10; M11-1-1, M11-1-2, M11-2, M11-18-1 y M11-18-2, 5 aislados bacterianos de la muestra M11; y M12-5-1, M12-5-2, M12-7 y M12-CN, 4 aislados bacterianos de la muestra M12. Los 13 aislados bacterianos seleccionados se realizó la evaluación de la inhibición del crecimiento micelial radial con los hongos *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.

Los resultados obtenidos de la inhibición del crecimiento micelial de *A. alternata*, se muestran en la Figura 2B y se describen de la siguiente manera: Los 4 aislados bacterianos seleccionados de la muestra M10, mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial radial de *A. alternata*, y sus porcentajes de inhibición son: M10-16-2 con 85% de inhibición, M10-16-1 con 76% de inhibición, M10-11 con 74% de inhibición y M10-13 con 56% de inhibición, de los cuales M10-16-2 y M10-11 presentaron mayores porcentajes de inhibición comparado con el control positivo. Los 5 aislados bacterianos seleccionados de la muestra M11, mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial radial de *A. alternata*, y sus porcentajes de inhibición son: M11-18-1 con 66% de inhibición, M11-1-2 con 60%

de inhibición, M11-1-1 con 51% de inhibición, M11-16-2 con 50% de inhibición y M11-2 con 39% de inhibición, los cuales presentaron porcentajes de inhibición estadísticamente similares al control positivo. Los 4 aislados bacterianos de la muestra M12, mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial radial de *A. alternata*, y sus porcentajes de inhibición son: M12-5-2 con 68% de inhibición, M12-CN con 62% de inhibición, M12-5-1 con 61% de inhibición y M12-7 con 60% de inhibición, de los cuales presentaron porcentajes de inhibición estadísticamente similares al control positivo.

Los 13 aislados bacterianos que se seleccionaron anteriormente, solo 8 aislados bacterianos mostraron actividad antagónica contra *F. oxysporum*, los cuales son: M10-13, M10-16-1 y M10-16-2, 3 aislados bacterianos de la muestra M10, M11-1-2 y M11-18-1, 2 aislados bacterianos de la muestra M11 y, M12-5-1, M12-5-2 y M12-7, 3 aislados bacterianos de la muestra M12. Los resultados obtenidos de la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum*, se muestra en la Figura 2C y se describe de la siguiente manera: De los 4 aislados bacterianos seleccionados, 3 aislados bacterianos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial radial de *F. oxysporum*, y sus porcentajes son: M10-16-1 con 22.5% de inhibición, M10-13 con 12% de inhibición y M10-16-2 con 4% de inhibición, de los cuales presentaron porcentajes de inhibición estadísticamente similares al control positivo. De los 5 aislados bacterianos seleccionados de la muestra M11, 2 aislados bacterianos mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial radial de *F. oxysporum*, y sus porcentajes de inhibición son: M11-18-1 con 21.5% de inhibición y M11-1-2 con 12.5% de inhibición, de los cuales presentaron porcentajes de inhibición estadísticamente similares al control positivo. De los 4 aislados bacterianos seleccionados de la muestra M12, 3 aislados mostraron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial radial de *F. oxysporum*, y sus porcentajes de inhibición son: M12-5-1 con 26.5% de inhibición, M12-7 con 16% de inhibición y M12-5-2 con 10% de inhibición, de los cuales presentaron porcentajes de inhibición estadísticamente similares al control positivo.

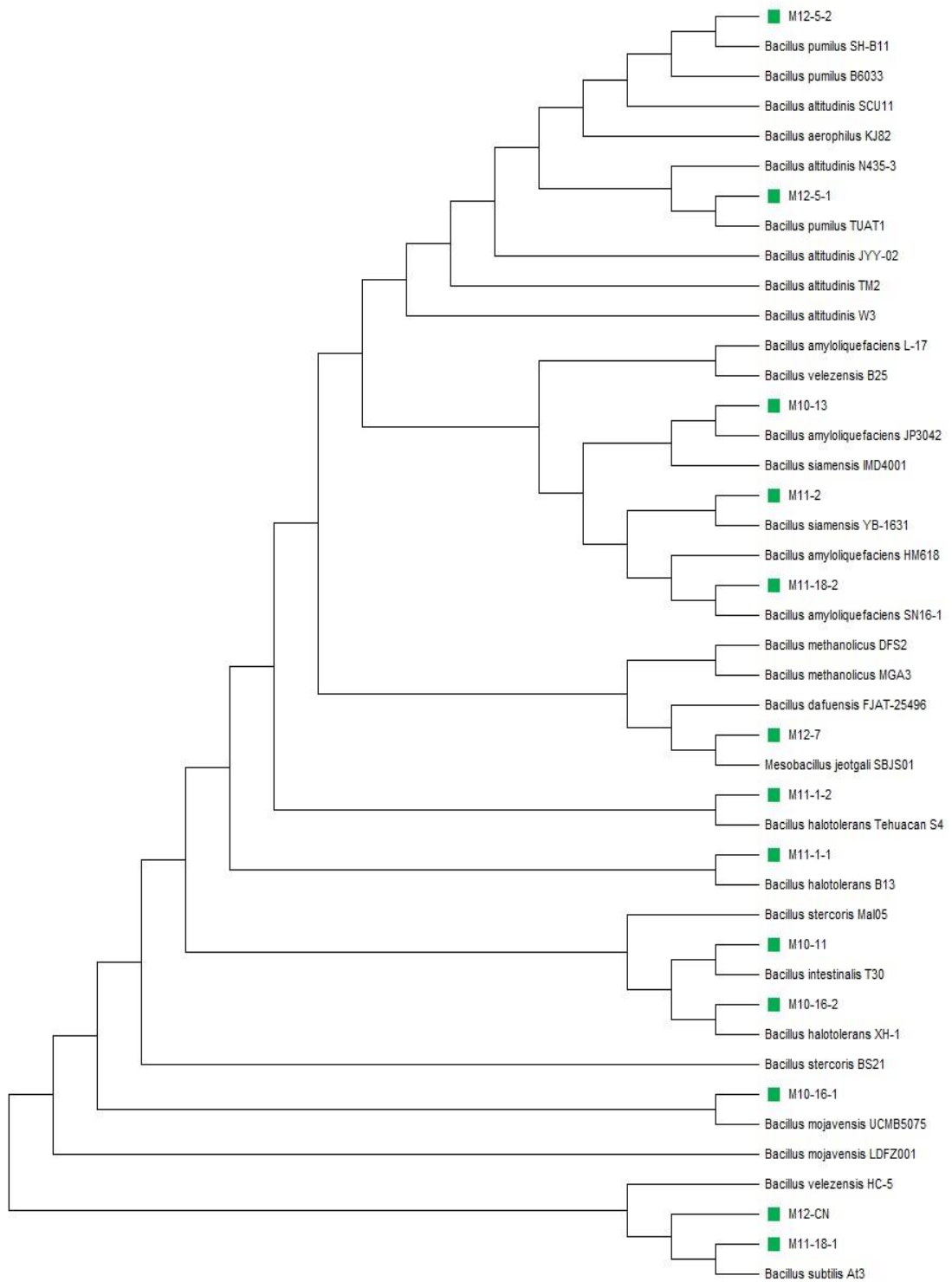
**Figura 2.** Evaluación de la actividad antifúngica de los 13 aislados bacterianos contra *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.



### **6.3. Identificación molecular de los aislados con actividad antifúngica**

Los 13 aislados bacterianos se lograron identificar a través de la secuenciación de 16S rDNA. Se puede observar en la Figura 3 y Tabla 2 que la relación filogenética mostrada fue la siguiente: el aislado M10-11 está relacionado con *Bacillus intestinalis*, M10-13 con *Bacillus amyloliquefaciens*, M10-16-1 con *Bacillus mojavenensis*, M10-16-2 con *Bacillus halotolerans*, M11-2 con *Bacillus siamensis*, M11-1-1 y M11-1-2 con *Bacillus halotolerans*, M11-18-1 con *Bacillus subtilis*, M11-18-2 con *Bacillus amyloliquefaciens*, M12-5-1 y M12-5-2 con *Bacillus pumilus*, M12-7 con *Mesobacillus jeotgali*, M12-CN con *Bacillus velezensis*.

**Figura 3.** Árbol filogenético de los aislados bacterianos, utilizando el método de Neighbor-Joining con el programa MEGA 11.





Código del aislado	Vecino cercano	Porcentaje de similitud (%)	Identidad final
M10-11	<i>Bacillus intestinalis</i> T30	99.21	<i>Bacillus intestinalis</i>
M10-13	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JP3042	96.98	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
M10-16-1	<i>Bacillus mojavensis</i> UCMB5075	98.75	<i>Bacillus mojavensis</i>
M10-16-2	<i>Bacillus halotolerans</i> XH-1	98.71	<i>Bacillus halotolerans</i>
M11-1-1	<i>Bacillus halotolerans</i> B13	98.58	<i>Bacillus halotolerans</i>
M11-1-2	<i>Bacillus halotolerans</i> Tehuacan S4	96.86	<i>Bacillus halotolerans</i>
M11-2	<i>Bacillus siamensis</i> YB- 1631	96.55	<i>Bacillus siamensis</i>
M11-18-1	<i>Bacillus subtilis</i> At3	98.92	<i>Bacillus subtilis</i>
M11-18-2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> SN16-1	97.35	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>
M12-5-1	<i>Bacillus pumilus</i> TUAT1	99.76	<i>Bacillus pumilus</i>
M12-5-2	<i>Bacillus pumilus</i> SH- B11	97.27	<i>Bacillus pumilus</i>
M12-7	<i>Mesobacillus jeotgali</i> SBJ501	93.24	<i>Mesobacillus jeotgali</i>

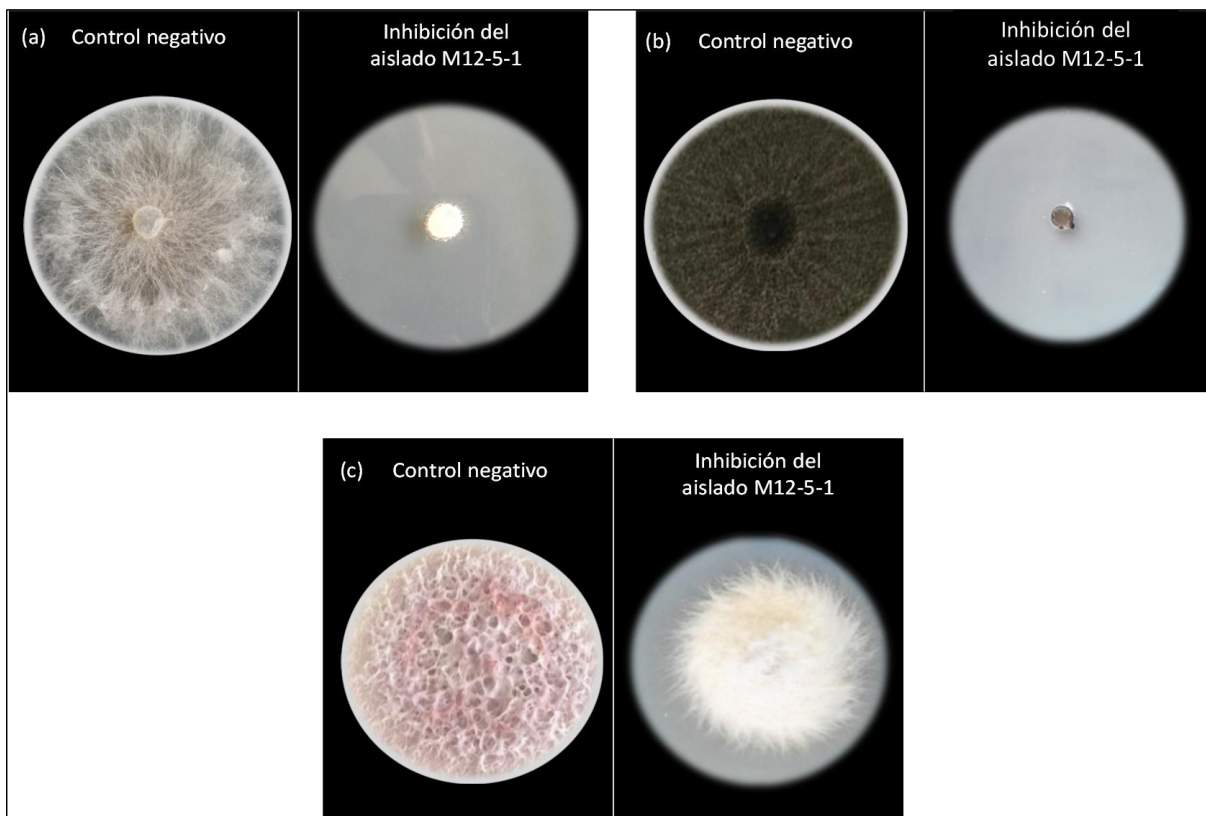
M12-CN	<i>Bacillus velezensis</i> HC-5	98.58	<i>Bacillus velezensis</i>
--------	------------------------------------	-------	----------------------------

**Tabla 2.** Identificación taxonómica de los aislados bacterianos.

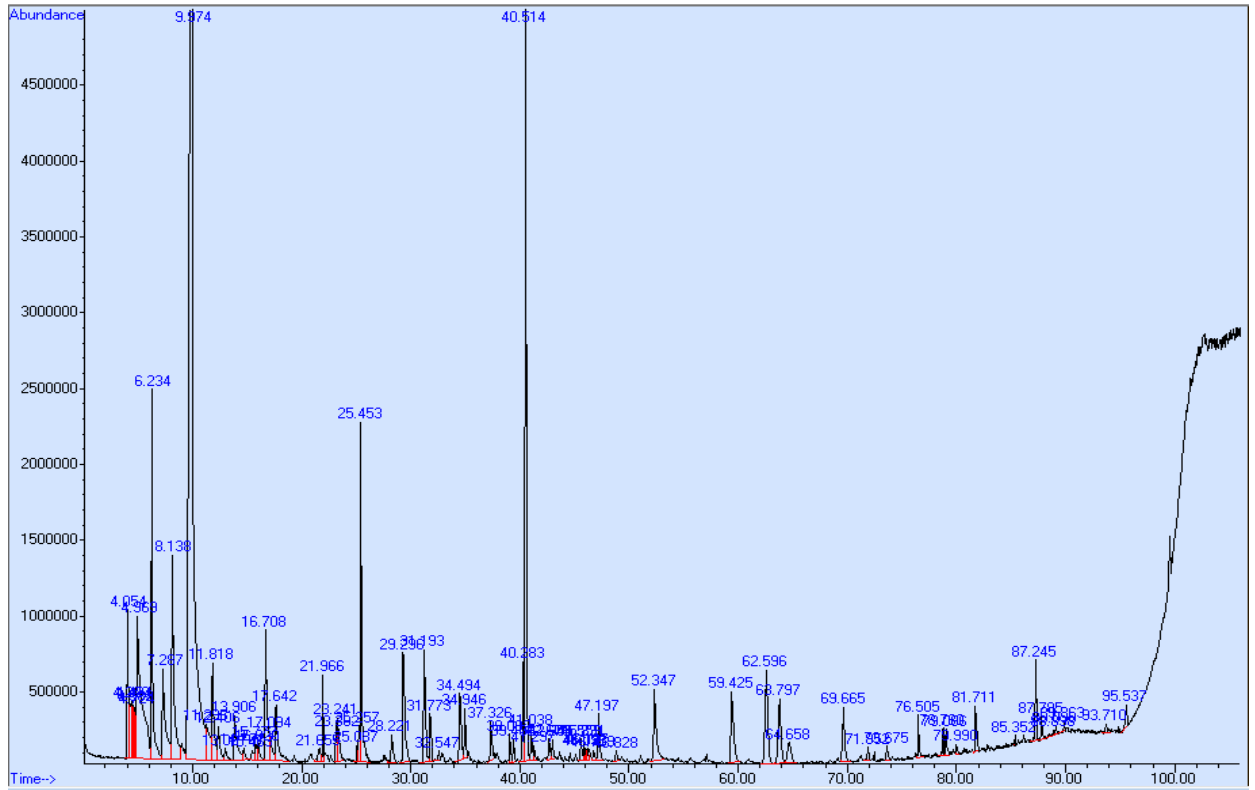
### 6.5. Análisis de los compuestos orgánicos volátiles del aislado *Bacillus pumilus* M12-5-1

El análisis de los compuestos orgánicos volátiles se realizó en la cepa con mayor actividad antifúngica en los 3 hongos fitopatógenos. Por lo tanto, este análisis fue en la cepa *Bacillus pumilus* M12-5-1 (Figura 4). En general, se detectaron 33 compuestos volátiles y fueron identificadas por la comparación de los espectros de la base de datos NIST/EPA/NIH *Mass Spectra Library*. El análisis del HS-SPME-GC-MS del volatiloma de la cepa *Bacillus pumilus* M12-5-1 se muestran en la Figura 5 y en la Tabla 3 se muestra la identificación de cada compuesto volátil. La clase química detectados fueron: Ácidos (11), Alcoholes (5), Aromáticos (3), Carbohidrato (1), Cetona (1), Ésteres (2), Hidrocarburo (2), Organoclorados (2), Oxima (1), Pirazinas (3), Tioéter (1) y Tiol (1). Como está indicado por porcentaje de área del perfil HS-SPME-GC-MS, los 15 compuestos con porcentaje de área más alto de cada grupo funcional fueron: Hexanoato de alilo (1.24 %), propionato de etilo (1.39 %), 3-metilbutirato de etilo (1.64 %), 2-metilpropionato de etilo (2.31%), butirato de etilo (2.62 %), 2-metilbutirato de etilo (2.81 %), 3-hidroxitirato de etilo (8.17 %); 3-metil-1-butanol (4.74 %), Etanol (45.54 %); .beta.-D-ribopiranosido, metilo (1.70 %); Acetona (4.43 %); Acetato de etilo (4.82 %); Heptano (6.98 %); Oxima (1.74 %) y 2,5-dimetil-pirazina (2.09 %). A pesar de que, individualmente o la mezcla de los compuestos no fueron evaluados entre los hongos fitopatógenos algunos de ellos son similares de los compuestos detectados en otras bacterias con actividad inhibitoria contra hongos fitopatógenos.

**Figura 4.** Efectos de los compuestos orgánicos volátiles producidos por M12-5-1, en *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*.



**Figura 5.** Detección de COV de 24 h de incubación de *Bacillus pumilus* M12-5-1 usando HS-SPME-GC-MS. Abundancia y tiempo de retención es mostrado por cada pico.



Compuesto	Tiempo retención	Área %	Clase química
Éter etílico	4.484	0.56	Éster
1,4-pentadieno	4.582	0.64	Hidrocarburo
Metanotiol	4.724	0.71	Tiol
Heptano	4.969	6.98	Hidrocarburo
Acetona	6.234	4.43	Cetona
Acetato de etilo	8.138	4.82	Éster
Etanol	9.974	45.54	Alcohol
Propionato de etilo	11.296	1.39	Ácido
2-metilpropionato de etilo	11.818	2.31	Ácido
Tricloroetileno	13.031	0.27	Organoclorado
Bromodiclorometano	14.701	0.25	Organoclorado
Tolueno	15.463	0.22	Aromático
Butirato de etilo	15.772	0.36	Ácido
2-metilbutirato de etilo	16.708	2.81	Ácido
Dimetilo-disulfuro	17.094	0.76	Tioéter
3-metilbutirato de etilo	17.642	1.64	Ácido
Pentanoato de etilo	21.655	0.37	Ácido
1-butanol	21.966	0.92	Alcohol
Pirazina	25.257	0.47	Pirazina
3-metil-1-butanol	25.453	4.74	Alcohol
Metil-pirazina	28.221	0.56	Pirazina
2,5-dimetil-pirazina	31.193	2.09	Pirazina
S-2-hidroxiopropanoato de etilo	32.547	0.08	Ácido
Hexanoato de alilo	34.494	1.24	Ácido
2-etil-1-hexanol	39.408	0.28	Alcohol
3-hidroxi-butirato de etilo	40.514	8.17	Ácido
3-furanmetanol	46.197	0.13	Aromático

Oxima-,metoxi-fenil-	52.347	1.74	Oxima
.beta.-D-ribopiranosido, metilo	59.425	1.70	Carbohidrato
Butirato de n-butilo	62.596	2.62	Ácido
Fenol	71.952	0.20	Aromático
2, 4, 7, 9-tetrametil-5-decin-4,7-diol	78.78	0.67	Alcohol
Éster isobutílico de hex-2-in-4-il del ácido ftálico	95.537	0.32	Ácido

**Tabla 3.**COV producidos por *Bacillus pumilus* M12-5-1 detectado por HS-SPME-GC-MS.

## 7. Discusión

Los resultados en este trabajo demuestran que el chile molido contiene bacterias de la familia *Bacillaceae* con capacidades metabólicas para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Se obtuvieron 12 cepas del género *Bacillus* y solo una del género *Mesobacillus*. Los 12 aislados mostraron cercanías filogenéticas a especies como *Bacillus intestinalis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus mojavensis*, *Bacillus halotolerans*, *Bacillus siamensis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus velezensis* y *Bacillus pumilus*. En el caso de *Bacillus intestinalis* T30, se ha aislado de intestinos de personas, y algunas cepas relacionadas muestran resistencia a los antibióticos tunicamicina, fosfomicina y bleomicina y betalactamasas de clase A y B, y a su vez contiene factores de virulencia (Tetz & Tetz, 2017).

Por otro lado, los aislados M10-13 y M11-18-2 relacionados filogenéticamente con *Bacillus amyloliquefaciens* JP3042, es una cepa aislada del suelo de viñedos y SN16-1 fue aislada de plantas de tomate, respectivamente (Wan, et al., 2018; Palumbo, et al., 2022). La especie *B. amyloliquefaciens* ha mostrado su potencial en el control de nematodos, bacterias y hongos patógenos que amenazan los cultivos y también ser responsable de promover el crecimiento de las plantas (Wan, et al., 2018; Palumbo, et al., 2022; Zhao, et al., 2022). También, ha mostrado capacidad de inhibir por medio de enzimas hidrolíticas a *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*, y modificar la carga microbiana de los suelos que se encuentran las raíces de las plantas (Wan, et al., 2018; Palumbo, et al., 2022; Zhao, et al., 2022). Además, se ha reportado su capacidad de producir COV, con actividades antifúngicas, contra *Fusarium oxysporum* (Wan, et al., 2017).

El aislado M10-16-1 mostró cercanía filogenética con *Bacillus mojavensis* UCMB5075, la cual fue aislada del suelo cultivado con papa, y evaluaron su capacidad promotora de crecimiento (Reva, et al., 2004; Kesaulya, et al., 2017). Esta especie también se ha reportado tener capacidad promotora de crecimiento en plantas de diversos cultivos, favoreciendo su crecimiento y protección de hongos patógenos (Reva, et al., 2004; Kesaulya, et al., 2017). Son capaces de producir lipopéptidos y enzimas que inhiben a ciertos hongos como a *Candida albicans*,

*Alternaria alternata* y distintas especies de *Fusarium* (Reva, et al., 2004; Kesaulya, et al., 2017). Además, la especie *Bacillus mojavensis* I4 fue capaz de inhibir hongos del hongo *Fusarium* con compuestos orgánicos volátiles (Ghazala, et al., 2022).

Los aislados M10-16-2 y M11-1-2 cercanos filogenéticamente a *B. halotolerans* XH-1 y Tehuacan S4. Dichas especies se han encontrado mayormente en las rizósferas, con capacidades de promoción de crecimiento de diversas plantas y diversos mecanismos para inhibir hongos fitopatógenos (Jiménez Gómez, et al., 2020; Wang, et al., 2021; Yuan, et al., 2023).

El aislado M11-2 es cercano filogenéticamente a *Bacillus siamensis* YB-1631, una cepa aislada de la rizosfera de trigo, con capacidad promotora de crecimiento y habilidad para afectar crecimiento de *Fusarium pseudograminearum*, por medio de enzimas y sideróforos (Dong, et al., 2023).

El aislado M11-18-1 es cercano filogenéticamente a *Bacillus subtilis* At3. Esta especie de *Bacillus* ha sido investigado ampliamente por la capacidad de producir diversos metabolitos (Hashem, et al., 2019; Su, et al., 2020; Mahapatra, et al., 2022). Se ha aislado de diferentes sitios, principalmente de plantas y dentro de sus tejidos (Hashem, et al., 2019; Su, et al., 2020; Mahapatra, et al., 2022). Es capaz de producir diversos metabolitos con actividad antifúngica como sideróforos, lipopéptidos, enzimas hidrolíticas e incluso compuestos volátiles que inhiben variedad de hongos fitopatógenos (Hashem, et al., 2019; Su, et al., 2020; Mahapatra, et al., 2022). Se ha usado en la agricultura y están en formulaciones en forma de spora, por ejemplo, *Bacillus subtilis* Q11, lo cual ha mostrado sus mecanismos de acción (Hernández Gómez, et al., 2016). Esta especie se han encontrado reportes de su control en *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* por medio de compuestos orgánicos volátiles (Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023).

Los aislados M12-5-1 y M12-5-2 son cercanos filogenéticamente a *Bacillus pumilus* TUAT1 y SH-B11, respectivamente. La cepa TUAT1 fue aislada en suelo de campo de investigación de una universidad de Tokio, mostró capacidad de promover el desarrollo en cultivos de arroz y ha sido comercializado como



biofertilizante. Es capaz de producir ácido indol-3-acético, sideróforos y acetoína, que permiten a una planta mejorar su desarrollo (Ngo, et al., 2019; Win, et al., 2020; Dobrzynski, et al., 2022). La cepa SH-B11 fue aislada de hojas de *Citrus aurantifolia*, con actividad antifúngica contra *Fusarium oxysproum* (Zam, et al., 2016; Jannah, et al., 2018; Fu, et al., 2021). Esta especie bacteriana ha mostrado su gran capacidad de producir COV, con actividad contra *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, entre otros (Chakraborty, et al., 2016; Morita, et al., 2019; Xu, et al., 2020; Dobrzynski, et al., 2023).

El aislado M12-CN es cercano con *Bacillus velezensis* HC-5. Esta especie se ha encontrado principalmente en plantas como bacteria endófitas (Cui & He, 2022; He, et al., 2022), y se ha reportado su papel en la protección de cultivos contra hongos fitopatógenos, por medio de la producción de lipopéptidos como; fengicina, bacilomicina D, surfactina, micosubtilina y bacilibactina (Cui & He, 2022; He, et al., 2022); además producción de enzimas como fibrinogenasas y quitinasas, y producción de compuestos orgánicos volátiles como benzotiazol, 2,3,6-trimetilfenol y 2,5-dimetil-pirazina con actividad antifúngica y otros compuestos volátiles que inducen a la resistencia sistemática para resistir ciertos patógenos, los COV son 2,3-butanodiol y acetoína (Gao, et al., 2017; Cheffi, et al., 2019; Myo, et al., 2019; Palumbo, et al., 2022; Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023; Rabbee, et al., 2023).

El aislado M12-7 es cercano a *Mesobacillus jeotgali* SBJS01. Es interesante encontrar este género bacteriano en muestras de chile molido con capacidades antifúngicas, y en un caso similar fue en el estudio de González et al. (2023), donde encontraron *Kosakonia cowanii* Ch1 con capacidades antifúngicas contra *Sclerotium rolfsii* y *Alternaria alternata* por medio de COV. Por lo que esta especie de *Mesobacillus*, puede también tener propiedades de actividad antifúngicas a través de COV. Esta especie de *Mesobacillus*, se ha aislado de alimentos como en mariscos fermentados y aguas profundas, son gram-positivas, son anaerobios facultativos, son mesófilas y contienen flagelos (Yoon, et al., 2001; Imada, et al., 2005; Pérez Ibarra, et al., 2007; Yamamura, et al., 2007; Patel & Gupta, 2020).

Actualmente, es la primera vez que se ha investigado que dicha especie, muestre mecanismos de actividad antifúngica, con compuestos orgánicos volátiles.

Entre las especies identificadas se destacan *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus velezensis*, por ser reconocidos en el campo de investigación, por la gran capacidad de producir metabolitos secundarios y por tener una interacción mutualista con las plantas, promover el crecimiento y la protección contra patógenos (Gao, et al., 2017; Cheffi, et al., 2019; Myo, et al., 2019; Palumbo, et al., 2022; Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023; Rabbee, et al., 2023).

Los compuestos orgánicos volátiles han mostrado su potencialidad como compuestos que tienen actividad antifúngica y proteger a las plantas durante su desarrollo (Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023). Hay diversidad de compuestos volátiles en diferentes clases químicas como: alquenos, alcoholes, aldehídos, cetonas, terpenos, bencenoides, pirazinas, hidrocarburos aromáticos y alifáticos, ácidos, ésteres, compuestos nitrogenados y azufre (Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023). Además, se han caracterizado los efectos producidos en los fitopatógenos como la modificación morfológica y fisiológica, por ejemplo, cambios morfológicos de colonia del fitopatógeno, pérdida de componentes intracelulares, vacuolización, ruptura de hifas o de sus células, con interferencia en las regulaciones del metabolismo, estrés oxidativo, inhibir los factores de virulencia y en los transportadores de casete de unión de ATP (ABC) (Zhao, et al., 2022; Almeida, et al., 2023). Por otro lado, en este estudio solo se identificó el volatiloma de una cepa, *Bacillus pumilus* M12-5-1, debido a que presento su capacidad de inhibir a los tres hongos fitopatógenos (*Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*). De 33 compuestos volátiles, 15 mostraron mayor abundancia relativa, sin embargo, en conjunto con otros de baja abundancia relativa pudieran favorecer la inhibición de los hongos fitopatógenos. De igual manera, las condiciones en que se desarrolla la bacteria es importante para la producción de COV (Almeida, et al., 2023).

De los 33 compuestos, 11 ya han sido reportadas por tener actividad antifúngica, por ejemplo: 2-etil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-butanol, 2-metilbutirato de etilo, 3-

hidroxibutirato de etilo, propionato de etilo, metil-pirazina, 2,5-dimetil-pirazina, tolueno, fenol y disulfuro de dimetilo. Por lo que justifica su capacidad de inhibir a los tres hongos fitopatógenos usados en esta investigación.

Por otro lado, la producción de 2-etil-1-hexanol, 3-metil-1-butanol y 1-butanol, han sido detectados en *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus pumilus*, mostrando actividad inhibitoria contra *Fusarium oxysporum*, *Moniliophthora perniciosa*, *Colletotrichum acutatum*, *Peronophythora litchii*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotinia Sclerotium*, entre otros hongos (Dilantha Fernando, et al., 2005; Chaves López, et al., 2015; Di Francesco, et al., 2015; Che, et al., 2017; Di Francesco, et al., 2017; Guo, et al., 2019; Syed-Ab-Rahman, et al., 2019; Zheng, et al., 2019; Di Francesco, et al., 2020; Almeida, et al., 2023).

En la clase de los ésteres están 2-metilbutirato de etilo, 3-hidroxibutirato de etilo y propionato de etilo, los cuales pueden ser producidas por géneros como *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Bacillus*, entre otros, y han mostrado inhibiciones contra *Colletotrichum lindemuthianum*, *Botrytis cinerea*, entre otros microorganismos patógenos (Guo, et al., 2019; Martins, et al., 2019).

En la clase de pirazinas están metil-pirazina y 2,5-dimetil-pirazina, estos compuestos se han encontrado que pueden inhibir a hongos como *Athelia rolfsii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Giberella moliniformis*, *Magnaporthe oryzae*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* (Munjal, et al., 2016; Agisha, et al., 2019).

En los aromáticos encontramos tolueno y fenol, que pueden inhibir a *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia Sclerotium*, su producción se ha encontrado en ciertas especies de bacterias y hongos (Raza, et al., 2015; Wu, et al., 2015; Raza, et al., 2016).

En la clase de tioéter está el disulfuro de dimetilo, que ha mostrado inhibición contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, *Phytium aphanidermatum*, *Phytium ultimum*, *Rhizoctonia solanis*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Athelia rolfsii*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Giberella moliniformis* y *Magnaporthe oryzae*. Este compuesto lo puede producir géneros como *Streptomyces*, *Pseudomonas* y *Bacillus* (Dilantha

Fernando, et al., 2005; Raza, et al., 2016; Ossowicki, et al., 2017; Huang, et al., 2018; Rojas Solís, et al., 2018; Guevara Avendaño, et al., 2019).

## 8. Conclusión

De los 80 aislados bacterianos de las muestras de chile molido (*Capsicum annuum* L.), se obtuvieron 13 cepas bacterianas que producen compuestos orgánicos volátiles con capacidades antifúngicas contra *Sclerotium rolfsii*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Las cepas se identificaron como especies del género *Bacillus* y una cepa al género *Mesobacillus*. Entre las especies de *Bacillus*, se consideró a *Bacillus pumilus* M12-5-1 para el análisis e identificación de los compuestos orgánicos volátiles. En la mezcla de compuestos volátiles está presente 2-etil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 1-butanol, 2-metilbutirato de etilo, 3-hidroxi-butirato de etilo, metil-pirazina, 2,5-dimetil-pirazina, tolueno y fenol, los cuales se ha reportado que tienen la capacidad de inhibir hongos fitopatógenos. Sin embargo, se necesitan más estudios para entender la función de cada compuesto presente en el volatiloma de *Bacillus pumilus* M12-5-1 sobre su efecto en los hongos fitopatógenos. También la secuenciación de su genoma podría permitir entender las rutas metabólicas empleadas en la generación de estos compuestos, así como sus accesorios genéticos para entender otras funciones ecológicas.

## 9. Referencias bibliográficas

- Agisha, V. N. y otros, 2019. Broad-spectrum antimicrobial activity of volatile organic compounds from endophytic *Pseudomonas putida* BP25 against diverse plant pathogens. *Biocontrol Science and Technology*, 29(11), pp. 1069-1089.
- Al Dagal, M. & Fung, D. Y. C., 1993. Aeromicrobiology: An assessment of a new meat research complex. *Journal of Environmental Health*, 56(1), pp. 7-14.
- Alcaraz, L. D. y otros, 2010. Understanding the evolutionary relationships major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BCM Genomics*, 11(332), pp. 1-17.
- Alleluya, V. K. y otros, 2023. *Bacillus* lipopeptide-mediated biocontrol of peanut stem rot caused by *Athelia rolfsii*. *Frontiers in Plant Science*, 14(1069971), pp. 1-12.
- Almeida, O. A. C. y otros, 2023. The power of the smallest: The inhibitory activity of microbial volatile organic compounds against phytopathogens. *Frontiers in Microbiology*, 13(951130), pp. 1-31.
- Arrarte, E. y otros, 2017. Volatile organic compounds produced by Antarctic strains of *Candida sake* play a role in the control of postharvest pathogens of apples. *Biological Control*, Volumen 109, pp. 14-20.
- Asad, S. A., 2022. Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases - A review. *Ecological Complexity*, 49(100978).
- Asari, S. y otros, 2016. Multiple effects of *Bacillus amyloliquefaciens* volatile compounds: plant growth promotion and growth inhibition of phytopathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(6), pp. 1-11.
- Bacha, S. A. S. y otros, 2023. Comprehensive review on patulin and *Alternaria* toxins in fruit and derived products. *Frontier plant Science*, Volumen 14, pp. 1-32.

- Baddi, M. H., Flores, A. E. & Galán Wong, L. J., 2001. Fundamentos y perspectivas de control biológico.. *Ciencia Universidad Autónoma de Nuevo León.*, pp. 226-228.
- Baddi, M. H., Flores, A. E. & Galán Wong, L. J., 2001. Fundamentos y perspectivas de control biológico. *Ciencia UANL*, 4(002), pp. 226-228.
- Bowman, S. M. & Free, S. J., 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*, pp. 799-808.
- Chakraborty, B., Chakraborty, U., De, U. K. & Chakraborty, A. P., 2016. Induction of resistance in *Camellia sinensis* against *Sclerotium rolfsii* by dual application of *Rhizophagus fasciculatus* and *Bacillus pumilus*. *Archives of phytopathology and plant protection*, pp. 1-16.
- Chatterjee, S. y otros, 2016. Interactions among filamentous fungi *Aspergillus niger*, *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea*: fungal biomass, diversity of secreted metabolites and fumonisin production. *BMC Microbiology*, 16(83), pp. 1-13.
- Chaurasia, B. y otros, 2005. Diffusible and volatile compounds produced by an antagonistic *Bacillus subtilis* strain cause structural deformations in pathogenic fungi *in vitro*. *Microbiological Research*, 160(1), pp. 75-81.
- Chaves López, C. y otros, 2015. Diversity of food-borne *Bacillus* volatile compounds and influence on fungal growth. *Journal of Applied Microbiology*, Volumen 119, pp. 487-499.
- Cheffi, M. y otros, 2019. *Olea europaea* L. Root Endophyte *Bacillus velezensis* OEE1 Counteracts Oomycete and Fungal Harmful Pathogens and Harbours a Large Repertoire of Secreted and Volatile Metabolites and Beneficial Functional Genes. *Microorganisms*, 7(9), pp. 1-29.
- Che, J. y otros, 2017. Volatile organic compounds produced by *Lysinibacillus* sp. FJAT-4748 possess antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Biocontrol Science and Technology*, 27(12), pp. 1349-1362.

- Chen, J. L. y otros, 2016. Endophytic *Trichoderma gamsii* YIM PH30019: a promising biocontrol agent with hyperosmolar, mycoparasitism, and antagonistic activities of induced volatile organic compounds on root-rot pathogenic fungi of *Panax notoginseng*. *Journal of Ginseng Research*, 40(4), pp. 315-324.
- Chen, P. H., Chen, R. Y. & Chou, J. Y., 2018. Screening and Evaluation of Yeast Antagonists for Biological Control of *Botrytis cinerea* on Strawberry Fruits. *Microbiology*, 46(1), pp. 33-46.
- Chen, Y. Y., Chen, P. C. & Tsay, T. T., 2016. The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsici*. *Biological control*, pp. 34-42.
- Chowdhury, S. P., Hartmann, A., Gao, X. & Borriss, R., 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review. *Frontiers in microbiology*, pp. 1-11.
- Cordovez, V. y otros, 2015. Diversity and functions of volatile organic compounds produced by *Streptomyces* from a disease-suppressive soil. *Frontiers in Microbiology*, 6(1081), pp. 1-13.
- Cui, W. & He, P., 2022. Genome Sequence Resource of *Bacillus velezensis* Strain HC-8, a Native Bacterial Endophyte with Biocontrol Potential Against the Honeysuckle Powdery Mildew Causative Pathogen *Erysiphe Ionicerae* var. *Ionicerae*. *MPMI*, 35(8), pp. 719-722.
- Davis, T. S., Crippen, T. L., Hofstetter, R. W. & Tomberlin, J. K., 2013. Microbial volatile emissions as insect semiochemicals. *Journal of chemical ecology*, 39(7), pp. 840-859.
- De Clerck, E. y otros, 2004. enomic and phenotypic comparison of *Bacillus fumarioli* isolates from geothermal Antarctic soil and gelatine. *Research in microbiology*, 155(6), pp. 483-490.
- de Souza, R., Ambrosini, A. & Passaglia, L. M. P., 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*, 38(4), pp. 401-419.



- DeMers, M., 2022. *Alternaria alternata* as endophyte and pathogen. *Microbiology*, 168(001153), pp. 1-15.
- Dennis, C. & Webster, J., 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *ELSEVIER*, pp. 41-48.
- Di Francesco, A., Di Foggia, M. & Baraldi, E., 2020. *Aureobasidium pullulans* volatile organic compounds as alternative postharvest method to control brown rot of stone fruits. *Food Microbiology*, Volumen 87, pp. 1-11.
- Di Francesco, A., Milella, F., Mari, M. & Roberti, R., 2017. A preliminary investigation into *Aureobasidium pullulans* as a potential biocontrol agent against *Phytophthora infestans* of tomato. *Biological Control*, Volumen 114, pp. 144-149.
- Di Francesco, A., Ugolini, L., Lazzeri, L. & Mari, M., 2015. Production of volatile organic compounds by *Aureobasidium pullulans* as a potential mechanism of action against postharvest fruit pathogens. *Biological Control*, Volumen 81, pp. 8-14.
- Dilantha Fernando, W. G., Ramarathnam, R., Krishnamoorthy, A. S. & Savchuk, S. C., 2005. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(5), pp. 955-964.
- Djonovic, S., Vittone, G., Mendoza Herrera, A. & Kenerley, C. M., 2007. Enhanced biocontrol activity of *Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing  $\beta$ -1,3- and  $\beta$ -1,6-glucanase genes. *Molecular Plant Pathology*, 8(4), pp. 469-480.
- Dobrzynski, J., Jakubowska, Z. & Dybek, B., 2022. Potential of *Bacillus pumilus* to directly promote plant growth. *Frontiers in Microbiology*, Volumen 13, pp. 1-6.
- Dobrzynski, J. y otros, 2023. Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. *Microbiology*, 14(1194606), pp. 1-12.

- Doehlemann, G., Okmen, B., Zhu, W. & Sharon, A., 2017. Plant Pathogenic Fungi. *Microbiology Spectrum*, 5(1), pp. 1-23.
- Dong, Q. y otros, 2023. Isolation and Genome-Based Characterization of Biocontrol Potential of *Bacillus siamensis* YB-1631 against Wheat Crown Rot Caused by *Fusarium pseudograminearum*. *Journal of Fungi*, 9(547), pp. 1-19.
- Duarte Leal, Y., Martínez Coca, B., Café Filho, A. C. & Bassay Blum, L. E., 2020. Caracterización fisio-cultural y compatibilidad micelial de aislamientos de *Sclerotium* sp. procedentes de siete hospedantes. *Revista de protección vegetal*, pp. 1-10.
- Errington, J., 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, pp. 117-126.
- FAO, 2023. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. <https://www.fao.org/news/story/es/item/1398821/icode/#:~:text=L a%20FAO%20estima%20que%20entre,las%20plagas%20de%20las%20plantas.> [Último acceso: 12 Mayo 2021].
- Fu, X. y otros, 2021. *Bacillus pumilus* Group Comparative Genomics: Toward Pangenome Features, Diversity, and Marine Environmental Adaptation. *Frontiers in Microbiology*, Volumen 12, pp. 1-16.
- Gao, Z. y otros, 2017. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, Volumen 105, pp. 27-39.
- Ghazala, I., Chiab, N., Saidi, M. N. & Gargouri Bouzid, R., 2022. Volatile organic compounds from *Bacillus mojavenensis* I4 promote plant growth and inhibit phytopathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, Volumen 121.
- González Espinosa, J. y otros, 2023. *Kosakonia cowanii* Ch1 Isolated from Mexican Chili Powder Reveals Growth Inhibition of Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms*, 11(5), pp. 1-15.

- Groenhagen, U. y otros, 2013. Production of Bioactive Volatiles by Different *Burkholderia ambifaria* Strains. *Journal of Chemical Ecology*, Volumen 39, pp. 892-906.
- Guédez, C., Castillo, C., Cañizales, L. & Olivar, R., 2008. CONTROL BIOLÓGICO: UNA HERRAMIENTA PARA EL DESARROLLO SUSTENTABLE Y SOSTENIBLE. *Control Biológico-Academia*, 7(13), pp. 50-74.
- Guevara Avendaño, E. y otros, 2019. Avocado rhizobacteria emit volatile organic compounds with antifungal activity against *Fusarium solani*, *Fusarium* sp. associated with Kuroshio shot hole borer, and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiological Research*, Volumen 219, pp. 74-83.
- Guo, H. y otros, 2019. Biocontrol of Gray Mold of Cherry Tomatoes with the Volatile Organic Monomer from *Hanseniaspora uvarum*, Trans-Cinnamaldehyde. *Food and Bioprocess Technology*, Volumen 12, pp. 1809-1820.
- Gutiérrez Ramírez, A. y otros, 2013. Control biológico como herramienta sustentable en el manejo de plagas y su uso en el estado de Nayarit, México. *REVISTA BIO CIENCIAS*, 2(3), pp. 102-112.
- Hameeda, B., Harini, G., Kumar Rao, J. V. D. K. & Reddy, G., 2010. Biological Control of Chickpea Collar Rot by Co-inoculation of Antagonistic Bacteria and Compatible Rhizobia. *Indian Journal of Microbiology*, 50(4), pp. 419-424.
- Harlton, C. E., Lévesque, C. A. & Punja, Z. K., 1995. Genetic Diversity in *Sclerotium* (*Athelia*) *rolfsii* and Related Species. *Molecular Plant Pathology*, 85(10), pp. 1269-1281.
- Hashem, A., Tabassum, B. & Abd Allah, E. F., 2019. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), pp. 1291-1297.
- He, C. N., Ye, W. Q., Zhu, Y. Y. & Zhou, W. W., 2020. Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus methylotrophicus* and

*Bacillus thuringiensis* against five common spoilage fungi on loquats. *Molecules*, pp. 1-14.

- He, P., Cui, W. & Peng, L., 2022. Biocontrol efficacy of *Bacillus velezensis* HC-8 against powdery mildew of honeysuckle caused by *Erysiphe lonicerae* var. *Lonicerae*. *Biological Control*, 166(104834).
- Hernández Gómez, M. d. I. Á., Malagón Sánchez, A. K. & Pacheco Aguilar, J. R., 2016. Efecto antagónico de *Bacillus subtilis* Q11 contra el hongo fitopatógeno *Sclerotium rolfsii*. *Revista de Ciencias de la Salud*, 3(6), pp. 28-30.
- Hernández Gómez, Y. F. y otros, 2022. Insights into the Bacterial Diversity and Detection of Opportunistic Pathogens in Mexican Chili Powder. *Microorganisms*, 10(1677), pp. 1-13.
- Hernández Jiménez, J. y otros, 2004. Caracterización de aislamientos de *Sclerotium rolfsii* Sacc. en diferentes medios de cultivo. *Revista mexicana de fitopatología*, pp. 345-350.
- Huang, C. J., Wang, T. K., Chung, S. C. & Chen, C. Y., 2005. Identificación de una quitinasa antifúngica a partir de un potencial agente de control biológico, *Bacillus cereus* 28-9. *Sociedad Coreana de Bioquímica y Biología Molecular*, 38(1), pp. 82-88.
- Huang, J. -S., Peng, Y. -H., Chung, K. -R. & Huang, J. -W., 2018. Suppressive efficacy of volatile compounds produced by *Bacillus mycoides* on damping-off pathogens of cabbage seedlings. *The Journal of Agricultural Science*, 156(6), pp. 795-809.
- Imada, C. y otros, 2005. Degradation of Ferric Chelate of Ethylenediaminetetraacetic Acid by Bacterium Isolated from Deep-Sea Stalked Barnacle. *Marine Biotechnology*, Volumen 7, pp. 21-25.
- Jannah, M. y otros, 2018. Isolation and Characterization of Antibiotic-producing Endophytic Bacteria from *Citrus aurantifolia* Swingle. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 12(3), pp. 1473-1481.

- Jáquez Matas, S. V., Pérez Santiago, G., Márquez Linares & Pérez Verdín, G., 2022. IMPACTOS ECONÓMICOS Y AMBIENTALES DE LOS PLAGUICIDAS EN CULTIVOS DE MAÍZ, ALFALFA Y NOGAL EN DURANGO, MÉXICO. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Volumen 38, pp. 219-233.
- Jiménez Gómez, A. y otros, 2020. Increase in phenolic compounds of *Coriandrum sativum* L. after the application of a *Bacillus halotolerans* biofertilizer. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), pp. 2742-2749.
- Kanso, S., Greene, A. C. & Patel, B. K. C., 2002. *Bacillus subterraneus* sp. nov., an iron- and manganese-reducing bacterium from a deep subsurface Australian thermal aquifer. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52(3), pp. 869-874.
- Kaur, P. K., Joshi, N., Singh, I. P. & Saini, H. S., 2016. Identification of cyclic lipopeptides produced by *Bacillus vallismortis* R2 and their antifungal activity against *Alternaria alternata*. *Journal of applied microbiology*, pp. 139-152.
- Kazerooni, E. A. y otros, 2021. Biocontrol potential of *Bacillus amyloliquefaciens* against *Botrytis pelargonii* and *Alternaria alternata* on *Capsicum annum*. *Environmental and ecological interactions of fungi*, pp. 1-27.
- Kesaulya, H., Virgowati, H. J. & Celvia, T. G. N., 2017. Potency of *Bacillus* spp from Potato Rhizosphere as Active Ingredients for Biostimulant Formulation. *Modern Applied Science*, 11(10), pp. 74-80.
- Khan, N. y otros, 2018. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in microbiology*, pp. 1-12.
- Khan, N., Maymon, M. & Hirsch, A. M., 2017. Combating *Fusarium* infection using *Bacillus*-based antimicrobials. *Microorganisms*, pp. 1-13.

- Koeppel, A. y otros, 2008. Identifying the fundamental units of bacterial diversity: A paradigm shift to incorporate ecology into bacterial systematics. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(7), pp. 2504-2509.
- Korpi, A., Järnberg, J. & Pasanen, A. L., 2009. Microbial Volatile Organic Compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, Volumen 39, pp. 139-193.
- Krylov, V. B. y otros, 2018. Carbohydrate Specificity of Antibodies against Phytopathogenic Fungi of the *Aspergillus* Genus. *Applied Biochemistry and Microbiology*, Volumen 54, pp. 522-527.
- Kumari, P., Bishnoi, S. K. & Chandra, S., 2021. Assessment of antibiosis potential of *Bacillus* sp. against the soil-borne fungal pathogen *Sclerotium rolfsii* Sacc. (*Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(17), pp. 1-11.
- Kumari, P., Bishnoi, S. K. & Chandra, S., 2021. Assessment of antibiosis potential of *Bacillus* sp. against the soil-borne fungal pathogen *Sclerotium rolfsii* Sacc. (*Athelia rolfsii* (Curzi) Tu & Kimbrough). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31(17), pp. 1-11.
- Letunic, I. & Bork, P., 2007. Interactive tree of life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Bioinformatics*, pp. 127-128.
- Li, B. y otros, 2014. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in Microbiology*, 5(636), pp. 1-10.
- Liu, K. y otros, 2017. Selection and Assessment of Plant Growth-Promoting Rhizobacteria for Biological Control of Multiple Plant Diseases. *Phytopathology*, 107(8), pp. 928-936.
- Liu, W. W. y otros, 2008. Antagonistic Activities of Volatiles from Four Strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. Against Soil-Borne Plant Pathogens. *Agricultural Sciences in China*, 7(9), pp. 1104-1114.

- Liu, Y. y otros, 2011. Biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an antifungal chitinase. *Chinese journal of chemical engineering*, pp. 128-134.
- Li, X. Y. y otros, 2015. Comprehensive volatile organic compounds profiling of *Bacillus* species with biocontrol properties by head space solid phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Biocontrol Science and Technology*, 25(2), pp. 132-143.
- Li, Y. & Chen, S., 2019. Fusaricidin Produced by *Paenibacillus polymyxa* WLY78 Induces Systemic Resistance against *Fusarium* Wilt of Cucumber. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5240), pp. 1-19.
- Logan, N. A. & De Vos, P., 2015. *Bacillus*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, pp. 1-164.
- Logan, N. A. y otros, 2000. Aerobic endospore-forming bacteria from geothermal environments in northern Victoria Land, Antarctica, and Candlemas Island, South Sandwich archipelago, with the proposal of *Bacillus fumarioli* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 50(5), pp. 1741-1753.
- López Fernández, S. y otros, 2016. Grapevine colonization by endophytic bacteria shifts secondary metabolism and suggests activation of defense pathways. *Plant and soil*, pp. 155-175.
- Macías Rubalcava, M. L. y otros, 2018. Volatile organic compounds from *Hypoxylon anthochroum* endophytic strains as postharvest mycofumigation alternative for cherry tomatoes. *Food Microbiology*, 76(0740-0020), pp. 363-373.
- Mahapatra, S., Yadav, R. & Ramakrishna, W., 2022. *Bacillus subtilis* impact on plant growth, soil health and environment: Dr. Jekyll and Mr. Hyde. *Journal of Applied Microbiology*, 132(5), pp. 3543-3562.
- Ma, L. J. y otros, 2013. *Fusarium* Pathogenomics. *Annual Review of Microbiology*, Volumen 67, pp. 399-416.

- Martins, S. J. y otros, 2019. Microbial volatiles organic compounds control anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biological Control*, Volumen 131, pp. 36-42.
- Maughan, H. & Van der Auwera, G., 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infeción, genética y evolución*, 11(5), pp. 789-797.
- McSpadden Gardener, B. B., 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology*, 94(11), pp. 1252-1258.
- Mejía Bautista, M. Á. y otros, 2015. *Bacillus* spp. in the control of wilt caused by *Fusarium* spp. in *Capsicum chinense*. *Revista mexicana de fitopatología*, pp. 208-222.
- Mitchell, A. M. y otros, 2010. Volatile antimicrobials from *Muscodor crispans*, a novel endophytic fungus. *Microbiology*, 156(1), pp. 270-277.
- Mohd Jaaffar, A. K. y otros, 2017. Sensitivity of *Rhizoctonia* isolates to phenazine-1-carboxylic acid and biological control by phenazine-producing *Pseudomonas* spp.. *Biological control*, pp. 692-703.
- Morath, S. U., Hung, R. & Bennett, J. W., 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal biology reviews*, pp. 73-83.
- Morita, T. y otros, 2019. Antifungal spectrum characterization and identification of strong volatile organic compounds produced by *Bacillus pumilus* TM-R. *Heliyon*, 5(6), pp. 1-8.
- Munjal, V. y otros, 2016. Genotyping and identification of broad spectrum antimicrobial volatiles in black pepper root endophytic biocontrol agent, *Bacillus megaterium* BP17. *Biological Control*, Volumen 92, pp. 66-76.
- Myo, E. M. y otros, 2019. Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion. *Biological Control*, Volumen 134, pp. 23-31.



- Ngo, N. P. y otros, 2019. Spore inoculation of *Bacillus pumilus* TUAT1 strain, a biofertilizer microorganism, enhances seedling growth by promoting root system development in rice. *Soil Science and Plant Nutrition*, 65(6), pp. 589-604.
- Ossowicki, A., Jafra, S. & Garbeva, P., 2017. The antimicrobial volatile power of the rhizospheric isolate *Pseudomonas donghuensis* P482. *PLoS ONE*, 12(3), pp. 1-13.
- Pal, K. K. & Gardener, B. M., 2006. Biological control of plant pathogens. *The plant health instructor*, pp. 1-25.
- Palumbo, J. D. y otros, 2022. Complete Genome Sequences of Two *Bacillus velezensis* Strains Isolated from California Raisin Vineyard Soils. *Environmental Microbiology*, 11(7), pp. 1-2.
- Patel, S. & Gupta, R. S., 2020. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(1), pp. 406-438.
- Pavón, M. Á., González, I., Martín, R. & García, T., 2015. Importancia del género *Alternaria* como patógeno de cultivos vegetales (I). *Fitopatología*, pp. 46-50.
- Pérez Ibarra, B. M., Elena Flores, M. & García Varela, M., 2007. Isolation and characterization of *Bacillus thioparus* sp. nov., chemolithoautotrophic, thiosulfate-oxidizing bacterium. *FEMS Microbiology Letters*, 271(2), pp. 289-296.
- Piechulla, B., Lemfack, M. C. & Kai, M., 2017. Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. *Plant, cell & environment*, pp. 2042-2067.
- Pieterse, C. M. J. y otros, 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in arabidopsis. *The plant cell*, pp. 1571-1580.

- Pieterse, C. M. J. y otros, 2014. Induced systemic resistance by beneficial microbes. *Annual review of phytopathology*, pp. 347-375.
- *Protección ambiental-salud, ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos-clasificación y especificaciones de manejo* (2002) NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.
- Qin, X. y otros, 2017. *Hanseniaspora uvarum* prolongs shelf life of strawberry via volatile production. *Food Microbiology*, Volumen 63, pp. 205-212.
- Raaijmakers, J. M. & Mazzola, M., 2012. Diversity and natural functions of antibiotics produced by beneficial and plant pathogenic bacteria. *Annual review of phytopathology*, pp. 403-424.
- Rabbee, M. F., Hwang, B. -S. & Baek, K. -H., 2023. *Bacillus velezensis*: A Beneficial Biocontrol Agent or Facultative Phytopathogen for Sustainable Agriculture. *Agronomy*, 13(840), pp. 1-14.
- Rabbee, M. F., Hwang, B. -S. & Baek, K. -H., 2023. *Bacillus velezensis*: A Beneficial Biocontrol Agent or Facultative Phytopathogen for Sustainable Agriculture. *Agronomy*, 13(840), pp. 1-14.
- Rana, A., Sahgal, M. & Johri, B. N., 2017. *Fusarium oxysporum*: Genomics, Diversity and Plant–Host Interaction. *Developments in Fungal Biology and Applied Mycology*, pp. 159-199.
- Rashad, Y. M. & Moussa, T. A. A., 2020. Biocontrol Agents for Fungal Plant Diseases Management. *Cottage Industry of Biocontrol Agents and Their Applications*, Issue 978-3-030-33161-0, pp. 337-363.
- Raza, W. y otros, 2016. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. *Microbiological research*, Volumen 192, pp. 103-113.
- Raza, W. y otros, 2015. Production of volatile organic compounds by an antagonistic strain *Paenibacillus polymyxa* WR-2 in the presence of root

exudates and organic fertilizer and their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum. *Biological Control*, Volumen 80, pp. 89-95.

- Reva, O. N., Dixelius, C., Meijer, J. & Priest, F. G., 2004. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(2), pp. 249-259.
- Reva, O. N., Smirnov, V. V., Pettersson, B. & Priest, F. G., 2002. *Bacillus endophyticus* sp. nov., isolated from the inner tissues of cotton plants (*Gossypium* sp.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 27(1), pp. 101-107.
- Reverchon, F. y otros, 2019. Antifungal potential of Lauraceae rhizobacteria from a tropical montane cloud forest against *Fusarium* spp.. *Brazilian Journal of Microbiology*, Volumen 50, pp. 583-592.
- Reyes Tena, A. y otros, 2015. Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Revista Digital Universitaria*, 16(11), pp. 1-15.
- Rodríguez Mendoza, C. A., Hernández, L. R., Pérez Armendáriz, B. & Juárez, Z. N., 2021. Bacterias y hongos endófitos de la familia *Cactaceae* y sus aplicaciones. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 24(e328), pp. 1-14.
- Rojas Solís, D. y otros, 2018. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, Volumen 13, pp. 46-52.
- Rudrappa, T., Czymmek, K. J., Paré, P. W. & Bais, H. P., 2008. Root-secreted maize acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant physiology*, 148(3), pp. 1547-1556.
- Sainju, U. M. y otros, 2016. Nitrogen balance in response to dryland crop. *Agriculture, ecosystems and environment*, pp. 25-32.

- Sánchez Fernández, R. E. y otros, 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. *TIP. Revista especializada en ciencias químico-biológicas*, 16(2), pp. 132-146.
- Santos, M. L. d. y otros, 2018. Benefits Associated with the Interaction of Endophytic Bacteria and Plants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 61(e18160431), pp. 1-11.
- Selim, H. M. M., Gomaa, N. M. & Essa, A. M. M., 2016. Antagonistic Effect of the Endophytic Bacteria and Against some Phytopathogens. *Egyptin Journal of Botany*, 56(3), pp. 613-626.
- Sheoran, N. y otros, 2015. Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. *Microbiological Research*, Volumen 173, pp. 66-78.
- Sheron, N. y otros, 2015. Genetic analysis of plant endophytic *Pseudomonas putida* BP25 and chemo-profiling of its antimicrobial volatile organic compounds. *Microbiological Research*, Volumen 173, pp. 66-78.
- Sikorski, J. & Nevo, E., 2005. Adaptation and incipient sympatric speciation of *Bacillus simplex* under microclimatic contrast at “Evolution Canyons” I and II, Israel. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1(102), p. 15924–15929.
- Sikorski, J. & Nevo, E., 2007. Patterns of thermal adaptation of *Bacillus simplex* to the microclimatically contrasting slopes of 'Evolution Canyons' I and II, Israel. *Environ Microbiol*, 9(3), pp. 716-726.
- Summerell, B. A., 2019. Resolving *Fusarium*: Current Status of the Genus. *Annual Review of Phytopathology*, Volumen 57, pp. 323-339.
- Su, Y., Liu, C., Fang, H. & Zhang, D., 2020. *Bacillus subtilis*: a universal cell factory for industry, agriculture, biomaterials and medicine. *Microbial Cell Factories*, 19(173).

- Syed-Ab-Rahman, S. F. y otros, 2019. Soil bacterial diffusible and volatile organic compounds inhibit *Phytophthora capsici* and promote plant growth. *Science of The Total Environment*, Volumen 692, pp. 267-280.
- T. A., P. D. y otros, 2019. Bacterial rhizosphere community profile at different growth stages of Umorok (*Capsicum chinense*) and its response to the root exudates. *International Microbiology*, pp. 241-251.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular biology and evolution*, pp. 1596-1599.
- Tejaswini, G. S. y otros, 2022. Molecular detection and pathological investigations on southern blight disease caused by *Sclerotium rolfsii* on cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata): A new record in India. *Journal of Phytopathology*, 170(6), pp. 363-372.
- Tejera Hernández, B., Rojas Badía, M. M. & Heydrich Pérez, M., 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *CENIC*, pp. 131-138.
- Tenorio Salgado, S. y otros, 2013. Identification of volatile compounds produced by the bacterium *Burkholderia tropica* that inhibit the growth of fungal pathogens. *Bioengineered*, 4(4), pp. 236-243.
- Tetz, V. & Tetz, G., 2017. Draft Genome Sequence of a Strain of *Bacillus intestinalis* sp. nov., a New Member of Sporobiota Isolated from the Small Intestine of a Single Patient with Intestinal Cancer. *Genome Announc*, Volumen 5, pp. 1-2.
- Thyagarajam, S. I. y otros, 2017. Microbial siderophore as MMP inhibitor: An interactive approach on wound healing application. *Wound Medicine*, pp. 7-14.
- Toffano, L., Fialho, M. B. & Pascholati, S. F., 2017. Potential of fumigation of orange fruits with volatile organic compounds produced by *Saccharomyces cerevisiae* to control citrus black spot disease at postharvest. *Biological Control*, Volumen 108, pp. 77-82.

- Touré, Y. y otros, 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), pp. 1151-1160.
- Tyc, O. y otros, 2017. The ecological role of volatile and soluble secondary metabolites produced by soil bacteria.. *Biology, medicine*, pp. 280-292.
- Tyskiewicz, R., Nowak, A., Ozimek, E. & Jaroszuk Sciset, J., 2022. *Trichoderma*: The Current Status of Its Application in Agriculture for the Biocontrol of Fungal Phytopathogens and Stimulation of Plant Growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2329), pp. 1-28.
- Ullah, A., Bano, A. & Janjua, H. T., 2020. Chapter 3 - Microbial Secondary Metabolites and Defense of Plant Stress. *Microbial Services in Restoration Ecology*, pp. 37-46.
- Valenzuela Ruiz, V. y otros, 2021. Lipopéptidos producidos por agentes de control biológico del género *Bacillus*: revisión de herramientas analíticas utilizadas para su estudio. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 11(2), pp. 419-432.
- Vargas Ayala, R. y otros, 2000. Shifts in soil microflora induced by Velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in cropping systems to control root-knot nematodes. *Biological control*, pp. 11-22.
- Venkateswaran, K. y otros, 2001. Molecular Microbial Diversity of a Spacecraft Assembly Facility. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(2), pp. 311-320.
- Veselova, M. A., Plyuta, V. A. & Khmel, I. A., 2019. Volatile Compounds of Bacterial Origin: Structure, Biosynthesis, and Biological Activity. *Microbiology*, 88(3), pp. 261-274.
- Villalobos Arámbula, V. M., Trujillo Arriaga, F. J., Ramírez Ramírez, F. & Martínez, G. S., 2020. *Gobierno de México*. [En línea] Available at: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/633031/Fusarium\\_spp\\_m](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/633031/Fusarium_spp_m)

[a\\_z\\_2020.pdf](#)

[Último acceso: mayp 2022].

- Villareal Delgado, M. F., Villa Rodríguez, E. D., Cira Chávez, L. A. & Estrada Alvarado, M. I., 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), pp. 95-130.
- Vlassi, A. y otros, 2020. Volatile organic compounds from *Lysobacter capsici* AZ78 as potential candidates for biological control of soilborne plant pathogens. *Frontiers in microbiology*, Volumen 11, pp. 1-11.
- Wang, F. y otros, 2021. Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus halotolerans* against *Botrytis cinerea* causing grey mould in postharvest strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*, Volumen 174.
- Wang, H. y otros, 2022. Recent Advances in *Alternaria* Phytotoxins: A Review of Their Occurrence, Structure, Bioactivity, and Biosynthesis. *Journal of Fungi*, 8(168), pp. 1-32.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. & Cole, J. R., 2007. Naïve bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, pp. 5261-5267.
- Wan, T., Zhao, H. & Wang, W., 2017. Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* SN16-1 and plant pathogen *Fusarium oxysporum* on tomato rhizosphere bacterial community composition. *Biological Control*, Volumen 112, pp. 1-9.
- Wan, T., Zhao, H. & Wang, W., 2018. Effects of the biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* SN16-1 on the rhizosphere bacterial community and growth of tomato. *Journal of Phytopathology*, 166(5), pp. 324-332.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, S. M. & Lane, D. J., 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *American society for microbiology. Journal of bacteriology.*, pp. 697-703.
- Wilson, B. R. y otros, 2016. Siderophores in iron metabolism: From mechanism to therapy potential. *Trends mol med.*, pp. 1077-1090.

- Win, K. T. y otros, 2020. Short-term effects of biochar and *Bacillus pumilus* TUAT-1 on the growth of forage rice and its associated soil microbial community and soil properties. *Biology and Fertility of Soils*, Volumen 56, pp. 481-497.
- Wu, Y. y otros, 2015. Effects of volatile organic compounds from *Streptomyces albulus* NJZJSA2 on growth of two fungal pathogens. *Journal of basic microbiology*, 55(9), pp. 1104-1117.
- Xu, M. y otros, 2020. Biological control of peanut southern blight (*Sclerotium rolfsii*) by the strain *Bacillus pumilus* LX11. *Biocontrol science and technology*, pp. 1-5.
- Xu, M. y otros, 2020. Biological control of peanut southern blight (*Sclerotium rolfsii*) by the strain *Bacillus pumilus* LX11. *Biocontrol Science and Technology*, 30(5), pp. 485-489.
- Xu, Z., Harrington, T. C., Gleason, M. L. & Batzer, J. C., 2010. Phylogenetic placement of plant pathogenic *Sclerotium* species among teleomorph genera. *Mycologia*, 2(337-346), p. 102.
- Yamamura, S. y otros, 2007. *Bacillus selenatarsenatis* sp. nov., a selenate- and arsenate-reducing bacterium isolated from the effluent drain of a glass-manufacturing plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Volumen 57, pp. 1060-1064.
- Yoon, J. H. y otros, 2001. *Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, Korean traditional fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3).
- Yuan, H. y otros, 2023. Biocontrol activity of *Bacillus halotolerans* strain PI7 against *Botryosphaeria dothidea* causing apple postharvest decay and potential mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 13(1058167), pp. 1-12.
- Yuan, J., Raza, W., Shen, Q. & Huang, Q., 2012. Antifungal Activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 Volatile Compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *PLANT MICROBIOLOGY*, 78(16), pp. 5942-5944.



- Yu, X., Ai, C., Xin, L. & Zhou, G., 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. *European journal of soil biology*, pp. 138-145.
- Zam, S. I. y otros, 2016. Isolation, Characterization of Endophytic Bacteria from *Citrus aurantifolia* Swingle Leaves and Testing of Antifungal Activity towards *Fusarium oxysporum*. *Scholars Research Library*, 8(11), pp. 83-89.
- Zhang, B. y otros, 2016. Comparative proteomic analysis reveals intracellular targets for bacillomycin L to induce *Rhizoctonia solani* Kühn hyphal cell death. *Biochim biophys acta*, pp. 1152-1159.
- Zhang, D. D. y otros, 2016. Identification and characterization of a pathogenicity-related gene VdCYP1 from *Verticillium dahliae*. *Scientific Reports*, 6(27979), pp. 1-12.
- Zhang, D. y otros, 2020. Antifungal effects of volatiles produced by *Bacillus subtilis* Against *Alternaria solani* in potato. *Microbiol*, pp. 1-12.
- Zhao, H., Wang, X. & Wang, W., 2022. *Bacillus amyloliquefaciens* SN16-1- Induced Resistance System of the Tomato against *Rhizoctonia solani*. *Pathogens*, 11(35), pp. 1-16.
- Zhao, X., Zhou, J., Tian, R. & Liu, Y., 2022. Microbial volatile organic compounds: Antifungal mechanisms, applications, and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 13(9224450), pp. 1-13.
- Zheng, L. y otros, 2019. Identification of volatile organic compounds for the biocontrol of postharvest litchi fruit pathogen *Peronophythora litchii*. *Postharvest Biology and Technology*, Volumen 155, pp. 37-46.
- Zhong, J. y otros, 2016. Hypovirulence of *Sclerotium rolfsii* Caused by Associated RNA Mycovirus. *Microbiology*, 7(1798), pp. 1-18.