

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS  
BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA



**BACTERIAS ENDÓFITAS PRODUCTORAS DE METABOLITOS CON  
EFECTO ANTAGÓNICO CONTRA *Fusarium verticillioides*, PRINCIPAL  
FITOPATÓGENO DE CEREALES**

**Tesis de grado presentada para la obtención del grado de Licenciatura en Bioquímica**

**ELABORADO POR: Univ. LIDIA MAMANI HUANCA**

**LA PAZ – BOLIVIA**

**2019**

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS**  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS  
CARRERA DE BIOQUÍMICA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS  
BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA



**BACTERIAS ENDÓFITAS PRODUCTORAS DE METABOLITOS CON  
EFECTO ANTAGÓNICO CONTRA *Fusarium verticillioides*, PRINCIPAL  
FITOPATÓGENO DE CEREALES**

ELABORADO POR: UNIV. LIDIA MAMANI HUANCA

ASESORAS: CARLA CRESPO MELGAR PhD  
MARÍA TERESA ÁLVAREZ ALIAGA PhD

LA PAZ – BOLIVIA

2019

## **Dedicatoria**

*A Dios por guiarme y darme fuerzas para  
continuar y a mi familia por  
su apoyo incondicional.*

### **Agradecimiento (s)**

A esta prestigiosa casa de estudios, como es la Universidad Mayor de San Andrés, por haberme acogido durante mi formación profesional.

Al Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas por permitirme realizar esta tesis de investigación.

A mis queridas asesoras, Dra. Carla Crespo Melgar pH y Dra. María Teresa Álvarez, por su grata colaboración, sus enseñanzas y guía brindada para la culminación de este trabajo.

De manera especial a mis compañeros y amigos del IIFB por su confianza y apoyo incondicional para llevar a cabo esta investigación.

Y un especial agradecimiento a mis padres Cristina y Armando, a mis hermanas Graciela, Gladys y Aurelia, por llenarme día a día de ánimo y valor para afrontar las adversidades de la vida.

## Tabla de contenido

### Resumen

### Abstract

1. Planteamiento del Problema .....	1
1.1 Justificación .....	2
1.2 Objetivos.....	3
1.2.1 Objetivo General.....	3
1.2.2 Objetivos Específicos .....	3
2. Diseño Teórico .....	3
2.1 Marco Referencial .....	3
2.1.1 Antecedentes generales sobre el problema en estudio.....	3
2.1.2 Descripción del ámbito de estudio.....	4
2.2 Marco Teórico .....	5
2.2.1 La agricultura en Bolivia .....	5
2.2.2 Características del cultivo de maíz .....	6
2.2.3 Principales patógenos que afectan a los cultivos de cereales .....	9
2.2.4 <i>Fusarium verticillioides</i> .....	9
2.2.4.1 Diseminación y colonización de <i>Fusarium verticillioides</i> .....	10
2.2.4.2 Producción de micotoxinas.....	12
2.2.5 Uso de plaguicidas en la agricultura.....	14
2.2.6 Bacterias endófitas asociadas a las plantas.....	18
2.2.6.1 Bacterias endófitas como agentes de control biológico.....	18
2.3 Marco Conceptual.....	20
3. Formulación de la hipótesis de investigación.....	21
4. Operacionalización de las variables de investigación .....	22
5. Diseño metodológico.....	22
5.1 Población en estudio, ámbito y periodo de investigación .....	22
5.1.1 Población en estudio.....	22
5.1.2 Ámbito.....	22
5.1.3 Periodo de investigación.....	22
5.2 Tipo de investigación.....	23

5.3 Materiales, métodos, técnicas y procedimientos .....	23
5.3.1 Protocolo de investigación.....	23
5.3.2 Microorganismos.....	25
5.3.2.1 Microorganismos antagónicos (Cepas Bacterianas).....	25
5.3.2.2 Microorganismo patógeno (Fitopatógeno Fúngico).....	25
5.3.3 Activación, control de axenidad y aislamiento.....	25
5.3.3.1 Preparación de inóculo fúngico .....	26
5.3.3.2 Cinética de crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i> .....	26
5.3.4 Caracterización morfológica de microorganismos .....	26
5.3.5 Selección preliminar de bacterias endófitas con actividad biocontroladora.....	27
5.3.5.1 Conservación de cepas.....	27
5.3.6 Determinación de parámetros cinéticos de bacterias endófitas seleccionadas .....	28
5.3.7 Producción y evaluación de metabolitos bioactivos solubles con actividad inhibitoria contra <i>Fusarium verticillioides</i> .....	28
5.3.7.1 Producción de metabolitos bioactivos solubles por cultivo en estado líquido .....	28
5.3.7.2 Producción de metabolitos bioactivos solubles por cultivo en estado sólido.....	29
5.3.7.3 Evaluación de la actividad inhibitoria de filtrados bacterianos contra <i>Fusarium verticillioides</i> .....	29
5.3.7.4 Determinación del porcentaje de inhibición micelial.....	30
5.3.8 Evaluación de la actividad inhibitoria de metabolitos bacterianos volátiles contra <i>Fusarium verticillioides</i> .....	30
5.3.8.1 Producción y evaluación de metabolitos volátiles empleando cultivo en estado líquido .....	31
5.3.8.2 Producción y evaluación de metabolitos volátiles empleando cultivo en estado sólido.....	32
5.3.8.3 Evaluación de la inhibición de <i>Fusarium verticillioides</i> por el efecto combinado de metabolitos solubles y volátiles.....	32
5.3.9 Caracterización de bacterias endófitas productoras de metabolitos bioactivos contra <i>Fusarium verticillioides</i> .....	33
5.1 Procesamiento de los datos.....	36
5.1.1 Recolección .....	36
5.1.2 Elaboración.....	36
5.1.3 Análisis estadístico .....	36

<b>6. Resultados y discusión.....</b>	<b>36</b>
<b>6.1 Características de <i>Fusarium verticillioides</i> .....</b>	<b>36</b>
<b>6.2 Bacterias endófitas con actividad biocontroladora de <i>Fusarium verticillioides</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>6.2.1 Efecto inhibitorio directo de bacterias endófitas frente a <i>Fusarium verticillioides</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>6.2.2 Parámetros cinéticos de crecimiento de bacterias endófitas seleccionadas.....</b>	<b>48</b>
<b>6.3 Metabolitos solubles con actividad inhibitoria contra <i>Fusarium verticillioides</i> .....</b>	<b>51</b>
<b>6.3.1 Metabolitos solubles producidos por cultivo en estado líquido .....</b>	<b>51</b>
<b>6.3.2 Metabolitos solubles producidos por cultivo en estado sólido.....</b>	<b>60</b>
<b>6.4 Potencial de metabolitos volátiles con actividad inhibitoria contra <i>Fusarium verticillioides</i> .....</b>	<b>67</b>
<b>6.4.1 Inhibición de <i>Fusarium verticillioides</i> por metabolitos volátiles producidos en cultivo en estado líquido y sólido.....</b>	<b>73</b>
<b>6.4.2 Inhibición de <i>Fusarium verticillioides</i> por el efecto combinado de metabolitos solubles y volátiles.....</b>	<b>76</b>
<b>6.5 Estrategias de cultivo para la producción de metabolitos inhibidores de <i>Fusarium verticillioides</i> .....</b>	<b>78</b>
<b>6.6 Características fisiológicas, bioquímicas y antagonistas de bacterias endófitas seleccionadas .....</b>	<b>79</b>
<b>7. Conclusiones.....</b>	<b>86</b>
<b>8. Análisis prospectivo del impacto de la investigación.....</b>	<b>87</b>
<b>9. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>90</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>110</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b> Características morfológicas de Bacterias endófitas y su efecto inhibitorio contra <i>Fusarium verticillioides</i> .....	40
<b>Tabla 2.</b> Efecto inhibitorio de filtrados crudos producidos por CES y CEL de las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> (cepa control) frente a <i>Fusarium verticillioides</i> durante 7 y 15 días de incubación.....	65
<b>Tabla 3.</b> Características fisiológicas, bioquímicas y antagonistas de las cepas bacterianas endófitas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw seleccionadas por su capacidad de inhibir a <i>Fusarium verticillioides</i> . .....	85
<b>Tabla 4.</b> Análisis prospectivo del empleo de bifungicidas en el control biológico de <i>fusariosis</i> .....	89

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estadios reproductivos y vegetativos de una planta de maíz.....	7
<b>Figura 2. A.</b> Rutas de infección del maíz por <i>Fusarium verticillioides</i> : <b>1.</b> Infección sistémica de plántulas, <b>2.</b> Infección del estigma y granos, y <b>3.</b> Por daño mecánico ocasionados por insectos. <b>B.</b> Podredumbre de la espiga, <b>C.</b> Semillas de maíz con síntomas de estrías blancas causados por <i>Fusarium verticillioides</i> .....	12
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de los diferentes factores que influyen en la comunidad endófitas: condiciones ambientales, el estado de desarrollo y fisiología de la planta, la microbiota del suelo y la estructura fisicoquímica del suelo. Además, la presentación de posibles mecanismos de supresión de enfermedades ocasionados por patógenos empleando bacterias endófitas: antibiosis, resistencia sistémica inducida, promoción del crecimiento, competencia, parasitismo e interferencia de señales. ....	20
<b>Figura 4.</b> <i>Fusarium verticillioides</i> . <b>A.</b> Cultivo de <i>Fusarium verticillioides</i> en agar papa-dextrosa. <b>B.</b> Microconidias de <i>Fusarium verticillioides</i> con una magnificación de 400X y <b>C.</b> Microconidias de <i>Fusarium verticillioides</i> en cadena con una magnificación de 1000X.....	38
<b>Figura 5.</b> Cinética de crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i> en PDA cultivado a una temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por 15 días. ....	38
<b>Figura 6.</b> Efecto inhibitorio de C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> (cepa control) contra el crecimiento de <i>Fusarium verticillioides</i> por interacción directa antagonista-fitopatógeno. ....	43
<b>Figura 7.</b> Efecto inhibitorio de <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> (cepa control), C-24 π2Tw, C-31 H2Tw, C-22 h2-3Tw y C-20 ñ2Th frente a <i>Fusarium verticillioides</i> ( <i>Fv</i> ) a los 7 y 15 días de co-cultivo.....	46
<b>Figura 8.</b> Cinética de crecimiento y variación de pH de <b>A.</b> C-20 ñ2Th, <b>B.</b> C-22 h2-3Tw, <b>C.</b> C-24 π2Tw, <b>D.</b> C-31 H2Tw y <b>E.</b> <i>Pseudomonas rhizosphaerae</i> , cultivadas en caldo nutritivo a una temperatura de $28 \pm 1^\circ\text{C}$ y 120 rpm.....	50

**Figura 9.** **A.** Crecimiento normal de *Fusarium verticillioides* en medio PDA. **C.** Inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* en medio PDA con el filtrado crudo bacteriano. Observación microscópica a 400X de *Fusarium verticillioides*, **(B)** sin y **(D)** con el filtrado crudo bacteriano. ....54

**Figura 10.** Efecto inhibitorio de filtrados crudos producidos por cultivo en estado líquido a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  y 120 rpm de las cepas **A.** C-20 ñ2Th, **B.** C-22 h2-3Tw, **C.** C-24  $\pi$ 2Tw, **D.** C-31 H2Tw y **E.** *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) frente a *Fusarium verticillioides* durante 7 y 15 días de incubación, empleando la técnica de vertido en placa dilución 1:2 (v:v). ....59

**Figura 11.** **A.** Cultivo bacteriano en salvado de trigo hasta las 120 horas de incubación donde se observa la formación de bioflim sobre el sustrato. **B.** Filtrados crudos exentos de biomasa bacteriana obtenidos por CES. **C.** Crecimiento normal de *Fusarium verticillioides* en medio PDA. **D.** Inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* en medio PDA con el filtrado crudo bacteriano (dilución 1:3). Observación microscópica a 400X de *Fusarium verticillioides*, **(E)** sin y **(F)** con el filtrado crudo bacteriano. ....63

**Figura 12.** Efecto inhibitorio de filtrados crudos producidos por cultivo en estado sólido, empleando salvado de trigo como sustrato sólido, a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  de las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24  $\pi$ 2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) frente a *Fusarium verticillioides* durante 7 y 15 días de incubación, empleando la técnica de vertido en placa dilución 1:3 (v:v). ....64

**Figura 13.** **A.** Cultivo doble placa: bacteria y fitopatógeno. Actividad inhibitoria de: **B.** C-20 ñ2Th, **C.** C-22 h2-3Tw, **D.** C-24  $\pi$ 2Tw, **E.** C-31 H2Tw y **F.** *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) contra *Fusarium verticillioides* por interacción antagonista-fitopatógeno sin contacto directo. **G.** Crecimiento normal de *Fusarium verticillioides* en medio PDA. Observación microscópica a 400X de *Fusarium verticillioides*: **(H)** con y **(I)** sin exposición a metabolitos volátiles bacterianos. ....69

**Figura 14.** Efecto inhibitorio de metabolitos volátiles producidos por C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24  $\pi$ 2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) frente a *Fusarium verticillioides* (*Fv*) durante 7 y 15 días de co-incubación. ....71

**Figura 15.** Actividad antifúngica de compuestos volátiles bacterianos en placa dividida: **A.** Crecimiento de *Fusarium verticillioides* no afectado por metabolitos volátiles retenidos en carbón activado. **B.** El crecimiento de *Fusarium verticillioides* se inhibió en presencia de metabolitos volátiles producidos por bacterias presentes en un compartimento diferente. **C.** Crecimiento normal de *Fusarium verticillioides* en medio PDA.....72

**Figura 16.** Sistema cerrado de dos viales: Inhibición de *Fusarium verticillioides* por metabolitos volátiles producidos en **A.** CEL y **B.** CES por las cepas **(a.)** C-20 ñ2Th y **(b.)** *Pseudomonas rhizosphaerae*. **c.** control negativo de *Fusarium verticillioides*.....75

**Figura 17.** Efecto inhibitorio de metabolitos volátiles producidos por C-20 ñ2Th y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) en CEL y CES contra el crecimiento de *Fusarium verticillioides* (*Fv*). .....75

**Figura 18.** Inhibición de *Fusarium verticillioides* (*Fv*) por el efecto combinado de metabolitos volátiles y solubles producidos por C-20 ñ2Th y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) en CEL y CES.....77

**Figura 19.** Sistema cerrado de dos viales: Inhibición de *Fusarium verticillioides* por la combinación de metabolitos volátiles y solubles crudos producidos en **A.** CEL y **B.** CES por las cepas **(a.)** C-20 ñ2Th y **(b.)** *Pseudomonas rhizosphaerae*. **c.** control negativo de *Fusarium verticillioides*. .....78

**Figura 20.** Estrategias operativas para la inhibición de *Fusarium verticillioides* (*Fv*) empleando metabolitos bioactivos producidos por la cepa C-20 ñ2Th.....79

**Figura 21.** Pigmento fluorescente de las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) bajo luz UV en medio agar Cetrimida. .81

**Figura 22.** Prueba de emulsificación positiva de diésel, producida por los filtrados crudos bacterianos obtenidos por: A. Cultivo líquido (CEL) y B. Cultivo en estado sólido (CES). **a.** Control negativo (medio de cultivo sin inoculación), **b.** C-20 ñ2Th, **c.** C-22 h2-3Tw, **d.** C-24 π2Tw, **e.** C-31 H2Tw y **f.** *Pseudomonas rhizosphaerae*. .....83

## Índice de anexos

<b>Anexo 1.</b> Características macroscópicas y microscópicas de las cepas bacterias endófitas seleccionadas. ....	110
<b>Anexo 2.</b> Actividad inhibitoria de metabolitos solubles producidos por las cepas bacterianas endófitas seleccionadas producidas por cultivo en estado sólido, empleando como sustrato solido cascarilla de arroz, contra <i>Fusarium verticillioides</i> . ....	111
<b>Anexo 3.</b> Costos de producción de filtrado crudo bacteriano mediante cultivo en estado sólido.....	112

## **Tabla de abreviaturas**

D.O.	: Densidad óptica
pH	: Potencial de hidrogeniones
rpm	: Revoluciones por minuto
UFC	: Unidades formadoras de colonias
CEL	: Cultivo en estado líquido
CES	: Cultivo en estado sólido
PDA	: Agar papa-dextrosa
CN	: Caldo nutritivo
AN	: Agar nutritivo
Esp/mL	: Esporas por mililitro
HCN	: Ácido cianhídrico

## **BACTERIAS ENDÓFITAS PRODUCTORAS DE METABOLITOS CON EFECTO ANTAGÓNICO CONTRA *Fusarium verticillioides*, PRINCIPAL FITOPATÓGENO DE CEREALES**

Actualmente, los cereales durante su cultivo o postcosecha son afectados por enfermedades causadas por fitopatógenos fúngicos. *Fusarium verticillioides*, considerado entre los principales fitopatógenos que afectan cultivos de maíz, causa podredumbre de la planta y es capaz de producir micotoxinas del tipo fumonisinas, ampliamente estudiadas por su efecto cancerígeno. El control fitosanitario de este patógeno se basa en el uso de plaguicidas, que generan efectos perjudiciales en el medio ambiente y la salud humana. Por ello, el empleo de bioplaguicidas a base de microorganismos o sus productos, es una alternativa para el manejo de enfermedades en los cultivos. La presente investigación evaluó 69 cepas de bacterias endófitas por su actividad inhibitoria directa contra *Fusarium verticillioides*, seleccionando cuatro cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw que presentaron porcentajes de inhibición mayores al 50%. Posteriormente, se emplearon cultivos en estado líquido y sólido, con salvado de trigo (40%, p/v), para obtener metabolitos bioactivos solubles que expresaron porcentajes de inhibición entre el 45-54% contra *Fusarium verticillioides*. A través de un cultivo en doble placa se reveló que las cepas endófitas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw son capaces de producir metabolitos volátiles orgánicos con actividad inhibitoria superior al 80% ( $p > 0.05$ , ANOVA). Por ello, la cepa C-20 ñ2Th fue evaluada por su capacidad de producir metabolitos volátiles en cultivo en estado líquido y sólido, exhibiendo porcentajes de inhibición entre el 59-65% contra *Fusarium verticillioides*. Finalmente, la evaluación de estrategias de cultivo en estado líquido y sólido, reveló que el efecto combinado de metabolitos solubles y volátiles producidos por la cepa C-20 ñ2Th en cultivo en estado sólido, presentó los mayores porcentajes de inhibición contra *Fusarium verticillioides* (84%). Las cuatro cepas endófitas seleccionadas poseen características fisiológicas y bioquímicas similares al género *Pseudomonas* con propiedades antagonistas basadas en la producción de metabolitos bioactivos solubles y volátiles, enzimas hidrolíticas y biosurfactantes.

**Palabras clave.** *Fusarium verticillioides*, *Pseudomonas*, cultivo en estado líquido, cultivo en estado sólido, metabolitos solubles, metabolitos volátiles.

## **ENDOPHYTIC BACTERIA PRODUCING METABOLITES WITH ANTAGONIC EFFECT AGAINST *Fusarium verticillioides*, THE MAIN PHYTOPATHOGEN OF CEREALS**

Currently, on culture or postharvest, cereals are affected by diseases caused by fungal phytopathogens. *Fusarium verticillioides* is considered the main phytopathogen that affect corn crops, this causes plant rot and is capable of producing mycotoxins fumonisin type, widely studied for their carcinogenic effect. Phytosanitary control of this pathogen is based on the use of pesticides, which generates harmful effects on the environment and human health. Therefore, the use of biopesticides based on microorganisms or their products is an alternative for the management of the diseases in crops. The present investigation evaluated 69 strains of endophytic bacteria for their direct inhibitory activity against *Fusarium verticillioides*, were selected four strains C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw and C-31 H2Tw that presented inhibition greater than 50%. Subsequently, cultures in liquid and solid state, with wheat bran (40%, w/v), were used to obtain soluble bioactive metabolites that expressed inhibition between 45-54% against *Fusarium verticillioides*. Through a double plate culture, it was revealed that the endophytic strains C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw and C-31 H2Tw are capable of produce organic volatile metabolites with inhibitory activity greater than 80% ( $p > 0.05$ , ANOVA). Therefore, the C-20 ñ2Th strain was evaluated for its ability to produce volatile metabolites in liquid and solid state cultures, showing a inhibition from 59 to 65 percent against *Fusarium verticillioides*. Finally, the evaluation of liquid and solid state culture strategies revealed that the combined effect of soluble and volatile metabolites produced by C-20 ñ2Th strain in solid state culture, showed the highest inhibition rates against *Fusarium verticillioides* (84%). The four endophytic strains selected have physiological and biochemical characteristics similar to the *Pseudomonas* genus with antagonistic properties based on the production of soluble and volatile bioactive metabolites, hydrolytic enzymes and biosurfactants.

**Keywords.** *Fusarium verticillioides*, *Pseudomonas* sp., liquid culture, solid state culture, soluble metabolites, volatile metabolites.

## 1. Planteamiento del Problema

Los cereales son la fuente de alimentos más importante del mundo, tanto para el consumo humano y para la producción pecuaria, es así que la producción a nivel mundial alcanzó los 2685 millones de toneladas en la gestión 2019, un 1.2% más que en la gestión 2018 (FAO, 2019). A pesar de ello, actualmente el rendimiento agrícola enfrenta una crisis debido al cambio climático, que conduce a sequías, inundaciones y especialmente la afectación por enfermedades y plagas. La disminución del rendimiento agrícola debido a enfermedades y plagas en la mayoría de los cultivos afecta gravemente a la economía del agricultor y a la población consumidora. Así también, se ha reportado que las prácticas modernas como la agricultura intensiva, inciden negativamente sobre los depredadores naturales de las plagas, al no existir las condiciones necesarias para su reproducción debido al desgaste de los suelos. La primera alternativa para reducir la incidencia de enfermedades y plagas en los cultivos, se basa en el empleo de agroquímicos. Sin embargo, el impacto ambiental sobre la vida silvestre, los polinizadores, enemigos naturales, la calidad de agua y suelo, además del impacto social (afectación de la salud, etc.) son altamente negativos. A pesar de que los pesticidas químicos protegen los cultivos actuando sobre los fitopatógenos durante su aplicación sólo el 41% se distribuye en los cultivos, el 5% afecta a insectos y el 54% contamina el medio ambiente incidiendo en el suelo, agua y alimentos, provocando efectos adversos en la biodiversidad (Morant, 2010). Aunado a ello, existen reportes alarmantes que describen la resistencia sistémica a pesticidas de uso común. En Bolivia el uso de agroquímicos para la producción de alimentos se multiplicó en las últimas dos décadas, importando 25 millones de kilos de agroquímicos en el año 1999 a 152 millones de kilos de agroquímicos hasta junio de 2018, además se estima que un 30% de agroquímicos ingresan por contrabando al país (El País, 2018).

Hoy en día, ante estas situaciones adversas, se buscan alternativas para disminuir el uso de plaguicidas de origen químico. En ese sentido, se desarrollan alternativas de origen natural como los bioplaguicidas que han demostrado ser específicos contra plagas o enfermedades y generalmente presentan un limitado o riesgo nulo para la salud y el medio ambiente. Los bioplaguicidas naturales son derivados de plantas, microorganismos o son metabolitos producidos por dichos organismos. Debido a su reducida disponibilidad y al uso

indiscriminado de agroquímicos, surge la necesidad de proponer alternativas fitosanitarias desarrollando bioplaguicidas para el control de enfermedades y plagas que afectan a cultivos agrícolas.

## 1.1 Justificación

La producción de cereales en Bolivia es afectada por distintas plagas y enfermedades, entre ellas *Fusarium verticillioides*, es un fitopatógeno necrótrofo y endófito transmitido por el suelo, que tiene la capacidad de inducir muerte del tejido hospedero y, además, es capaz de provocar pudrición de órganos como la raíz, tallo y mazorca del maíz. Este microorganismo no solo causa severas reducciones en los rendimientos y calidad de los cultivos, si no también es responsable de la contaminación con micotoxinas (principalmente fumonisinas) en los cultivos maíz, que afectan a humanos y animales (Murillo & Munkvold, 2008).

Actualmente, para el control de la infección causada por *Fusarium verticillioides*, se utilizan distintos plaguicidas de origen químico, que genera grandes cantidades de residuos persistentes provocando contaminación, disminución de la biodiversidad de los suelos y reducción en el rendimiento de muchos cultivos, entre ellos el maíz.

Existen alternativas ecológicas para contrarrestar enfermedades producidas por fitopatógenos, incrementando el rendimiento de los cultivos y garantizando la sostenibilidad agrícola, entre ellas, el uso de bacterias endófitas que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de fitopatógenos fúngicos. Los endófitos tienen un gran impacto en la productividad de los cultivos porque pueden estimular el crecimiento de las plantas, ya que poseen diversos mecanismos para el uso eficiente de nutrientes como nitrógeno y fósforo, además, producen metabolitos como antimicrobianos, enzimas líticas, sideróforos entre otros que inhiben el crecimiento de fitopatógenos (Haque, Lee, & Cho, 2015).

El empleo de bacterias endófitas como agentes de biocontrol para la prevención de enfermedades, es una alternativa innovadora y amigable con el medio ambiente. Sin embargo, en nuestro medio no existen reportes de la potencialidad que albergan las bacterias endófitas. En ese sentido el presente trabajo de investigación evaluó la capacidad inhibitoria de metabolitos bioactivos producidos por bacterias endófitas, contra el crecimiento de *Fusarium verticillioides*, principal fitopatógeno de cereales. Al evaluar la potencialidad de estos agentes

bioactivos en el control de *Fusarium verticillioides* se pretende otorgar una alternativa para reducir el uso de plaguicidas de origen químico y su acumulación con el fin de incrementar la productividad de los cultivos contribuyendo a la soberanía alimentaria y la economía del país.

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo General**

Evaluar la potencialidad de bacterias endófitas por su capacidad de producir agentes bioactivos contra *Fusarium verticillioides*, principal fitopatógeno de cereales.

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- a) Seleccionar bacterias endófitas por su capacidad inhibitoria directa contra *Fusarium verticillioides*.
- b) Evaluar estrategias de cultivo en estado líquido y sólido para la producción de metabolitos bioactivos solubles y volátiles con actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides*.
- c) Caracterizar bacterias endófitas productoras de metabolitos bioactivos contra *Fusarium verticillioides*, de acuerdo a sus características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y antagónicas.

## **2. Diseño Teórico**

### **2.1 Marco Referencial**

#### **2.1.1 Antecedentes generales sobre el problema en estudio**

La agricultura se convirtió en el tercer pilar de la economía boliviana por la variedad genética que tiene nuestro país, entre los recursos de alto valor económico se encuentra los cereales, la papa, la quinua, el frijol entre otros (Agricultura en Bolivia es el tercer pilar económico, 2017). Los diferentes cultivos, en especial los cereales se ven afectados por plagas y enfermedades que causan pérdidas en la productividad repercutiendo en la calidad y disponibilidad de los alimentos y el aporte económico hacia el agricultor.

Entre los microorganismos fitopatógenos que afectan diversos cultivos se encuentran los hongos que ocasionan varios tipos enfermedades siendo los más perjudiciales *Alternaria*,

*Botrytis*, *Diplodia*, *Monilia*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Phomopsis*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor* y otros (Juárez, Sosa, & López, 2010). Entre estos fitopatógenos se destaca *Fusarium verticillioides*, que afecta la productividad de cereales como el maíz, este hongo tiene la capacidad de penetrar la planta y causar la muerte del tejido hospedero, provocando de esta manera cuantiosas pérdidas económicas (De la Torre, Sánchez, Galeana, & Plasencia, 2014).

Las prácticas agrícolas tales como la rotación de cultivos, labranza, enmiendas orgánicas y el uso de plaguicidas son utilizadas para mejorar la productividad de los cultivos. Sin embargo, el uso de plaguicidas ha traído resultados desfavorables a nuestro ecosistema. Alternativas innovadoras para disminuir el empleo de plaguicidas resaltan la aplicación de varios géneros de microorganismos como *Bacillus*, *Burkholderia*, *Lysobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* que se utilizan como agentes de control biológico en diversos cultivos (Chung, Toajjal, Khan, Hyun, & Ok, 2015). Entre los microorganismos más estudiados, *Bacillus sp.* tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos, limitando la colonización de *Fusarium verticillioides* en las raíces de la planta de maíz (Cavaglieri, Rodríguez, Chulze, & Etcheverry, 2005). Otros estudios reportan el potencial que albergan las bacterias endófitas que residen asintómicamente dentro de los tejidos vegetales sanos sin causar ningún efecto negativo (Prabhali & Dhruva, 2015). Se ha reportado que este tipo de microorganismos tienen la capacidad de promover el crecimiento de plantas directa o indirectamente y pueden ser utilizados como biofertilizantes, fitoestimulantes o en el control de enfermedades provocadas por fitopatógenos (Bach, Dubal, De Carvalho, Brito, & Pereira, 2016).

La problemática en nuestro país sobre el uso indiscriminado de pesticidas en los cultivos agrícolas incide en la necesidad de desarrollar investigaciones para la producción de bioplaguicidas. En ese sentido, el rol de la universidad es preponderante para proponer alternativas ante estas necesidades emergentes.

### **2.1.2 Descripción del ámbito de estudio**

La actividad agrícola constituye el principal medio de vida de las comunidades en Bolivia y es el base de la alimentación de millones de bolivianos. Sin embargo, la calidad de los alimentos se ve afectadas por diferentes plagas y enfermedades. Por ello, se recurre al uso de los pesticidas químicos que causan contaminación del medio ambiente, daño a la salud debido a la

presencia de sus residuos en los alimentos, provocan disminución de la biodiversidad y los brotes de plagas más resistentes al efecto de los mismos. Ante esta situación se tiene la necesidad de la búsqueda y el desarrollo de alternativas como los bioplaguicidas, que son plaguicidas naturales derivados de extractos de plantas, microorganismos o sus productos. Los metabolitos producidos por microorganismos son de gran interés en agricultura porque tienen la capacidad de inhibir o controlar la presencia de hongos fitopatógenos que afectan a los cultivos, entre otras aplicaciones biotecnológicas. Al no existir en Bolivia estudios que reporten el potencial de microorganismos endófitos nativos como productores de metabolitos bioactivos efectivos contra fitopatógenos que afectan cultivos de maíz, el presente trabajo de investigación contribuirá como línea base en esta área de investigación.

## **2.2 Marco Teórico**

### **2.2.1 La agricultura en Bolivia**

En Bolivia se ejerce una agricultura tradicional en el Altiplano y Valles (Cochabamba, La Paz y Oruro) y una agricultura moderna en el Oriente, parte del norte y sur de Bolivia (Santa Cruz, Beni y Tarija) siendo los tubérculos, hortalizas, productos estimulantes, frutas, cereales entre otros, los cultivos agrícolas más producidos (Gutierrez, 2018). Los cereales, tales como el maíz, arroz, trigo, cebada, quinua, avena y sorgo, son importantes en Bolivia, porque constituyen la base de la seguridad y soberanía alimentaria. En los años 2016 y 2017, Bolivia produjo alrededor de 2,2 millones de toneladas de cereales. Entre los principales cereales producidos en Bolivia, el maíz alcanzó 926 mil toneladas, 603 mil toneladas de sorgo y 427 mil toneladas de arroz en el año agrícola 2016/2017. Considerando que en los últimos 10 años las exportaciones de cereales del país acumularon 1.028 millones de dólares, posicionando a Bolivia como país de exportación neta de cereales (IBCE, 2018).

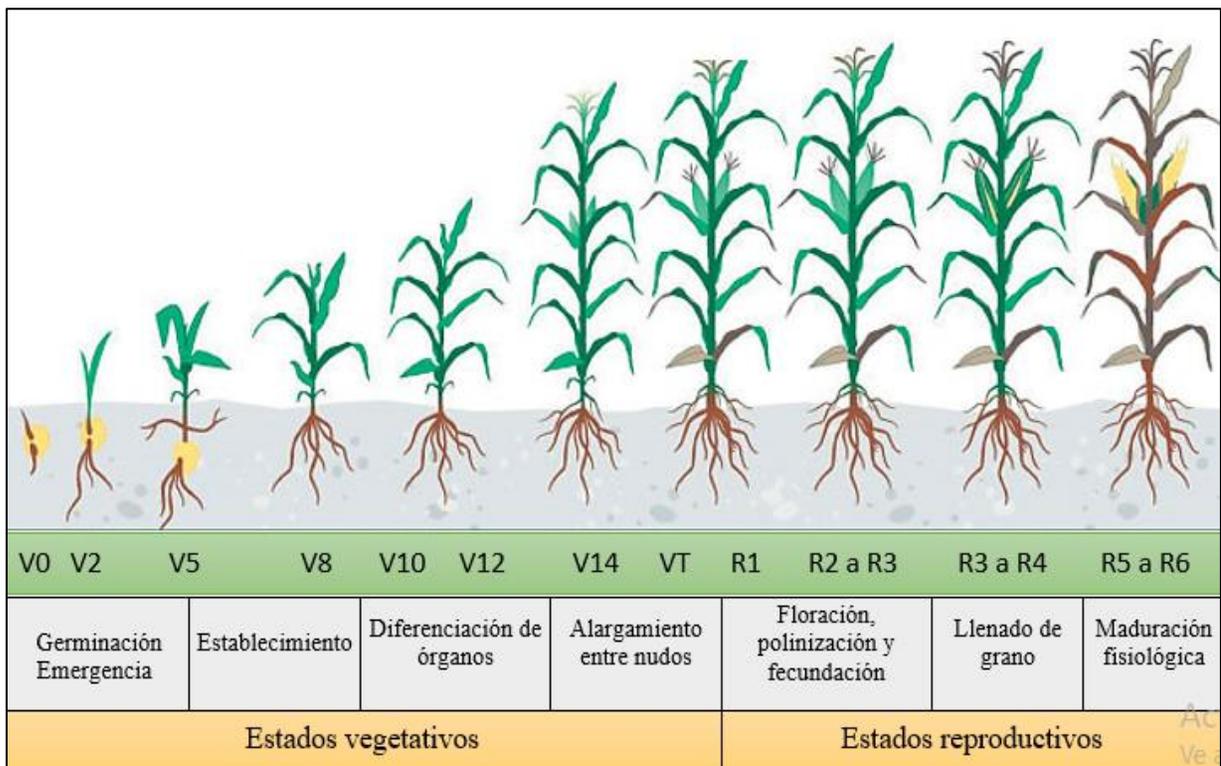
El maíz (*Zea mays* L.) es un alimento básico para la población mundial junto con el trigo y el arroz, puesto que suministra elementos nutritivos a los seres humanos y animales; constituye también la materia prima básica en la industria del almidón, aceites, proteínas, bebidas alcohólicas, endulzantes entre otros (Figueroa, 2011). Es el primer cereal en rendimiento de grano por hectárea, y el segundo después del trigo en una producción total (Simón & Golik, 2018). En Bolivia, el maíz es uno de los granos más importante para el agro después de la soya, produciendo más de 350.000 hectáreas en el Departamento de Santa Cruz (Gamarra,

2017) con alrededor de 2,15 toneladas por hectárea. Es así que el maíz es el cultivo de mayor proyección hacia la próxima década, pues sencillamente, de éste depende la alimentación de los 12 millones de bolivianos (Agronegocios, 2017).

### **2.2.2 Características del cultivo de maíz**

El maíz (*Zea mays* L.) es el cereal de preferencia para la alimentación animal y es la base de la alimentación humana en nuestra cultura, pertenece a la familia de las gramíneas, tribu maideas y se originó en los trópicos de América Latina. El maíz es una planta herbácea, presenta gran desarrollo vegetativo, puede alcanzar hasta 5 m de altura y es de producción anual (Ospina, 2015; Deras, s.f.). Entre las características descritas, las raíces son fasciculadas, en algunos casos sobresalen nudos de las raíces a nivel del suelo principalmente a nivel de raíces secundarias. El tallo es simple, recto en forma de caña, macizo en su interior y no presenta ramificaciones. El tallo tiene tres componentes importantes en sus tejidos: la corteza o epidermis, los haces vasculares y la médula. Las hojas son largas, lanceoladas, alternas y de gran tamaño. Se encuentran abrazando al tallo y presentan vellosidades en el haz. La planta de maíz es monoica pues presenta inflorescencias masculina y femenina separadas dentro de la misma planta. La inflorescencia masculina es una panícula (espigón o penacho) de coloración amarilla que posee aproximadamente entre 20 a 25 millones de granos de polen, además cada flor que compone la panícula contiene tres estambres donde se desarrolla el polen. En cambio, la inflorescencia femenina cuando ha sido fecundada por el polen se denomina mazorca, aquí se encuentran las semillas (granos de maíz) agrupadas a lo largo de un eje, esta mazorca se halla cubierta por hojas, terminando en una especie de penacho de color amarillo oscuro, formado por estilos. El grano de maíz es el fruto de la planta, compuesto por una cariósida que consta de tres partes principales: la pared, el endosperma triploide y el embrión diploide. La cubierta o capa de la semilla, que es la pared del ovario, se llama pericarpio, es dura y debajo de ella se encuentra la capa de aleurona, que le da el color al grano (blanco, amarillo, morado) y que contiene las proteínas. El embrión está formado por la radícula y la plúmula, ubicándose en el escutelo, localizado en la parte inferior del grano, adherido a la tusa o raquis (Guacho, 2014; Simón & Golik, 2018; Ospina, 2015; Fassio, Carriquiry, Tojo, & Romero, 1998).

El desarrollo de la planta de maíz se realiza en varias etapas reunidas en dos momentos principales: el estadio vegetativo y el estadio reproductivo (Fig. 1). El estadio vegetativo (V) consta de dos fases y va desde la emergencia (VE) hasta la aparición de la espiga masculina (VT). En la primera fase se presenta el desarrollo vegetativo inicial desde la germinación (VE) hasta la iniciación de la elongación del tallo (V6), donde se forman las hojas, y el desarrollo es ascendente, la producción de materia seca es lenta y finaliza con la diferenciación tisular de los órganos de reproducción. En la segunda fase se presenta el desarrollo vegetativo activo en el que además de hojas, se forman los órganos de reproducción y va desde la elongación del tallo (V6) hasta la floración femenina, emisión de estigmas (VT). El estadio reproductivo comienza con la aparición de los estigmas (R1) y finaliza con la madurez fisiológica, cuando todos los granos en la espiga han alcanzado su máximo peso seco o máxima acumulación de materia seca (R6) (Ransom, 2013; Simón & Golik, 2018).



**Figura 1.** Estadios reproductivos y vegetativos de una planta de maíz. Fuente: Pringle, (2017).

A pesar de que el maíz constituye la base de nuestra alimentación y se desarrollan diferentes estrategias para mejorar la productividad del cultivo, la planta del maíz es frecuentemente afectada por diversas enfermedades y plagas, ocasionando importantes disminuciones en el

rendimiento y la calidad del grano. Desde el momento de la siembra hasta su almacenamiento, el maíz está expuesto a ataques de numerosas plagas y enfermedades, que afectan distintos órganos de la planta en diferentes estadios del ciclo fenológico del cultivo. Los principales factores que influyen en la propagación de plagas y enfermedades en los cultivos de maíz, incluyen: el clima, humedad del suelo, labores preparatorias del terreno, rotación de cultivos y el control de malas hierbas, tratamiento inadecuado de semillas, tiempos de siembra y cosecha, la mala disposición de residuos del cultivo, fertilización inadecuada del suelo, sequía, inundaciones, monocultivos, secado inadecuado del grano, entre otros, que hacen que el maíz sea mucho más susceptible al ataque de estos organismos patógenos (Koenning, 2003).

La incidencia de plagas y enfermedades que afectan al cultivo de maíz están relacionadas con su fenología y pueden agruparse en aquellas que se ocasionan en la fase vegetativa (V0 a VT) y en la fase reproductiva (R1 a R6). Durante el inicio de la fase vegetativa las semillas de maíz que están en germinación y/o la formación de las raicillas de las plántulas, pueden ser atacadas por algunos patógenos transportados por las semillas, el suelo o el rastrojo, causando la pudrición antes de la germinación o la pudrición de la plántula. Entre estas enfermedades se destacan la podredumbre de la semilla y tizón de la plántula, ocasionados por hongos como *Stenocarpella maydis*, *Diplodia zae*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, entre otros. Por otro lado, las plagas que afectan el estadio vegetativo incluyen *Delia platura* Meig (mosca de la semilla) que ataca la zona del germen de semilla, destruyendo o deteriorando el embrión, por lo que emergen plantas deformes, *Diloboderus abderus* Sturm, *Lyogenis* sp., y otros gusanos blancos, *Conoderus* sp. y *Agriotes* sp. (Gusanos alambre), estos causan daño directo ya sea alimentándose de la semilla en germinación, destruyendo raíces o cortando plántulas. *Spodoptera frugiperda* Smith (gusano cogollero) ataca alrededor de la etapa V6, donde las larvas se alimentan del primordio apical, generando la muerte de la planta, estos son algunos ejemplos de plagas que afectan el estadio vegetativo de la planta. Las enfermedades que afectan en el estadio reproductivo se agrupan según el órgano de la planta que afectan como el tallo, hojas, inflorescencias, espiga y otros. La incidencia de plagas o enfermedades durante el crecimiento vegetativo se ve reflejada en la fase reproductiva del maíz, llegando a causar grandes pérdidas en el potencial de rendimiento. Entre estas enfermedades se tiene pudriciones del tallo ocasionados por *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium* sp., *Diplodia maydis*, *Pythium aphanidermatum* y otros. Daño a

cualquier tejido aéreo como espigas, tallos, hojas y panojas, especialmente en tejidos embrionarios causado principalmente por *Ustilago maydis*. Podredumbre de la espiga causado por *Stenocarpella maydis*, *F. moniliforme*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.* y otros. Entre las plagas más frecuentes que afectan el estadio reproductivo se tienen *Helicoverpa zea* que ataca los estigmas y granos, gorgojos (*Sitophilus oryzae* Linneo y *Sitophilus granarius* Linneo) atacan el grano, y entre otros que disminuye el rendimiento y calidad del grano (Simón & Golik, 2018; Oñate, 2016; Paliwal, 2001).

### **2.2.3 Principales patógenos que afectan a los cultivos de cereales**

La sequía, la incidencia de plagas y enfermedades se constituyen en limitantes principales de la producción agrícola en Bolivia. En la actualidad se ha registrado oficialmente una lista de plagas que afectan a una gran variedad de cultivos en Bolivia, la cual incluye organismos como *Agrotis sp.*, *Copitarsia sp.*, *Heterodera sp.*, entre otros (Plan de manejo de plagas, 2009). Por otro lado, los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades de pre y poscosecha en los cultivos de hortalizas, cereales y frutas, siendo responsables de pérdidas económicas cuantiosas. El daño que ocasionan no sólo se refleja en pérdidas económicas, sino también en la producción biológica dada por la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por microorganismos, que causan frecuentes disminuciones en la calidad del grano. Entre los principales fitopatógenos de origen fúngico se destacan: *Rhynchosporium secalis*, *Alternaria alternata*, *Botrytis fabae*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Fusarium oxysporium.*, *Rhizoctonia sp.*, *Alternaria solani*, *Fusarium solani*, *Botrytis cinérea*, *Penicillium sp.*, entre otros (Plan de manejo de plagas, 2009). Entre estos fitopatógenos *Fusarium verticillioides* es considerado el principal fitopatógeno del maíz, que afecta la calidad de las semillas, disminuyendo su contenido de proteínas y lípidos. Este patógeno se puede encontrar en casi todos los campos de cosecha de maíz sobre todo en los residuos de cultivo (Oren, Ezrati, Cohen, & Sharon, 2003).

### **2.2.4 *Fusarium verticillioides***

*Fusarium verticillioides* fue reportado por primera vez en Filipinas (Reinking, 1918), este fitopatógeno fue aislado del maíz, causando pudrición de la raíz, tallo y mazorca (Cumagun, Ramos, Dimaano, Munaut, & Hove, 2009). *Fusarium verticillioides* es un ascomiceto filamentoso perteneciente a la subdivisión Deuteromycota, que agrupa a aquellos hongos en

los que no se ha descrito una fase sexual o bien, ésta es muy rara, su correspondiente estado teleomórfico corresponde a *Gibberella moniliformis* (De Oliveira *et al.*, 2011; De la Torre, Sánchez, Galeana, & Plasencia, 2014). *Fusarium verticillioides* es miembro de la sección Liseola, en la que sus integrantes no forman clamidosporas, sino hinchamiento de hifas que ocasionalmente son confundidos con pseudoclamidosporas (Hernández, 2014). En el estado anamorfo, o de reproducción asexual existe abundante producción de microconidias hialinas, en su mayoría unicelulares y de forma ovalada, agrupadas en cadenas. Algunas cepas también forman macroconidias raramente reportadas. Por otro lado, aislamientos iniciales de este hongo en medio agar papa dextrosa, revelan un crecimiento micelial de color blanco, posteriormente naranja y finalmente morado, y se ha asociado la producción de pigmentos de *Fusarium verticillioides* con su grado de virulencia (De la Torre, Sánchez, Galeana, & Plasencia, 2014; Glenn, Richardson, & Bacon, 2004; Deepa & Sreenivasa, 2017).

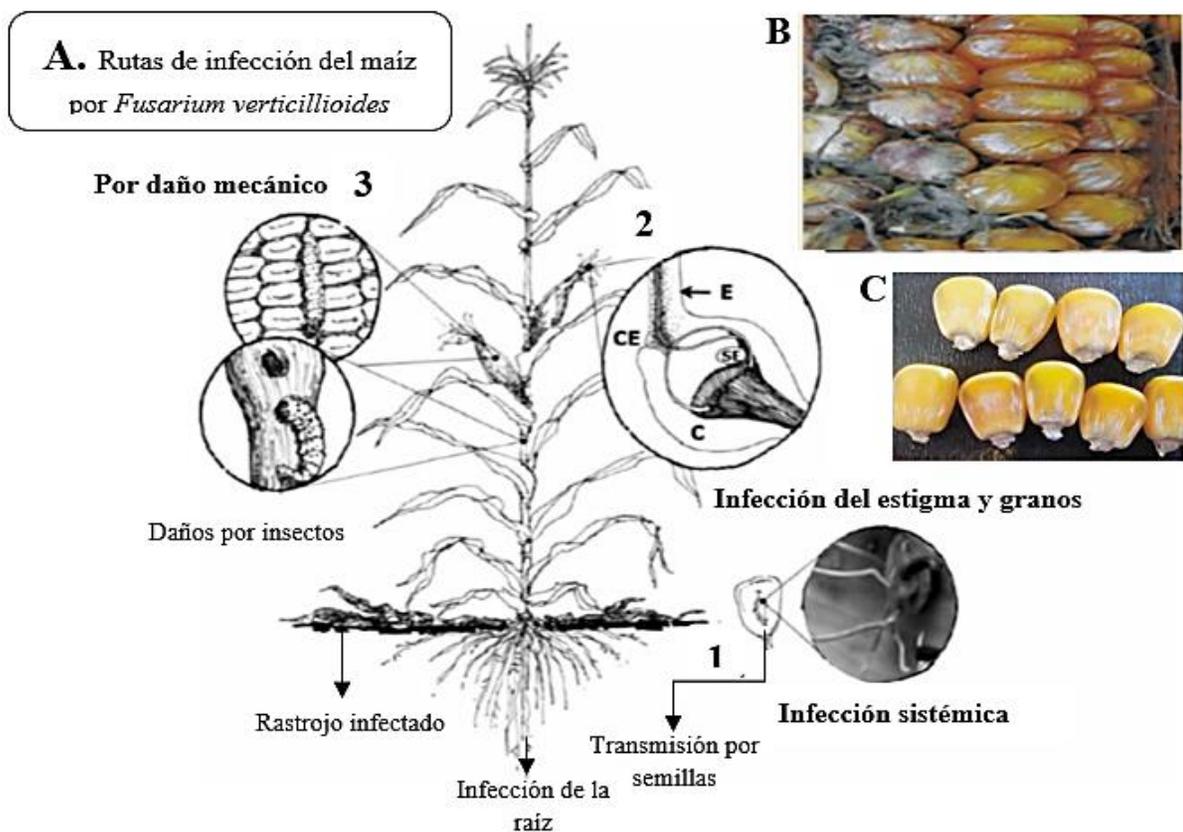
#### **2.2.4.1 Diseminación y colonización de *Fusarium verticillioides***

*Fusarium verticillioides* tiene una distribución cosmopolita, debido a su capacidad de adaptarse a diferentes condiciones ambientales. Existen varios mecanismos que favorecen su diseminación, entre ellos el hombre, animales e insectos, el agua y el viento tienen un rol importante en el incremento de infecciones en las plantas (Luna, 2016). Aunado a ello, *Fusarium verticillioides* es un fitopatógeno capaz de infectar todos los órganos de la planta de maíz, incluyendo granos, raíces y tallos. Las infecciones por este fitopatógeno varían dependiendo de las condiciones ambientales, geográficas y la fase de madurez de la planta (Mohd, Hanzah, Kusai, Zambri, & Salleh, 2017; Summerell, Salleh, & Leslie, 2003).

La infección del maíz por *Fusarium verticillioides* puede ocurrir a través de múltiples rutas de entrada en la planta, este microorganismo al colonizar distintos tejidos causa diversas enfermedades a lo largo del desarrollo de la planta (Fig. 2). Entre los principales mecanismos de infección de *Fusarium verticillioides*, se describe: i) infección sistémica de plántulas a partir de conidios o micelios fúngicos en la superficie de las semillas (desde la etapa V0). El hongo penetra de forma directa el pericarpio e infecta la epidermis de la raíz después de que se siembran las semillas contaminadas. Las hifas colonizan el parénquima del escutelo y llegan hasta el córtex, dentro de la planta joven *Fusarium verticillioides* se transporta de las raíces al tallo y finalmente a la mazorca y los granos. La infección sistémica también se desarrolla a

partir del hongo que sobrevive en los rastrojos del suelo (Oren, Ezrati, Cohen, & Sharon, 2003; Botta & Gonzalez, 2012; De la Torre, Sánchez, Galeana, & Plasencia, 2014). ii) Infección del estigma y granos (desde la etapa V14): *Fusarium verticillioides* produce macro y microconidias que son transportadas mediante el viento o la lluvia y llegan al estigma, el hongo infecta los granos, pero generalmente solo un pequeño porcentaje de los granos infectados desarrolla sintomatología. Los conidios acceden a las células del pericarpio y las hifas se propagan dentro pasando de una célula a otra para acceder al grano (Botta & Gonzalez, 2012; Oren, Ezrati, Cohen, & Sharon, 2003; Duncan & Howard, 2010; De la Torre, Sánchez, Galeana, & Plasencia, 2014). iii) *Fusarium verticillioides* puede infectar el tallo y la mazorca si existen daños mecánicos causados por insectos que actúan como vectores de conidias, por ejemplo: gusano barrenador (*Ostrinia sp.*), gusano de la raíz (*Diabrotica sp.*), gusano elotero y gorgojos, entre otros (De la Torre, Sánchez, Galeana, & Plasencia, 2014; Jacquat, 2017).

Es importante mencionar que *Fusarium verticillioides*, al colonizar el maíz en la mayoría de las etapas del ciclo de crecimiento de la planta, es a la vez un parásito y un saprofito; se puede encontrar como un endófito sistémico sin la visualización de síntomas dependiendo de las condiciones ambientales (Pereira, Nesci, Castillo, & Etcheverry, 2011). Los síntomas son variables dependiendo del genotipo de la planta, medio ambiente y la gravedad de la enfermedad (Lanubile *et al*, 2014; Bacon, Glenn, & Yates, 2008). Independientemente de la aparición de los síntomas, la presencia de este hongo en el maíz constituye un inminente riesgo debido a su capacidad de producir micotoxinas con efectos carcinogénicos (Joseph & Cumagun, 2007).



**Figura 2. A.** Rutas de infección del maíz por *Fusarium verticillioides*: **1.** Infección sistémica de plántulas, **2.** Infección del estigma y granos, y **3.** Por daño mecánico ocasionados por insectos. Fuente: De la Torre, Sánchez, Galeana, y Plasencia, (2014); Jacquat, 2017. **B.** Podredumbre de la espiga, **C.** Semillas de maíz con síntomas de estrías blancas causados por *Fusarium verticillioides*. Fuente: Aguaysol *et al.*, (2013).

#### 2.2.4.2 Producción de micotoxinas

Numerosas especies del género *Fusarium* son consideradas como peligrosos fitopatógenos, capaces de colonizar plantas y materias primas agrícolas, que ocasionan grandes pérdidas económicas disminuyendo la cantidad y la calidad de los cultivos agrícolas (Logrieco, Bottalico, Mulé, Moretti, & Perrone, 2003). Especies de *Fusarium* producen toxinas que amplían su virulencia, entre estas tenemos fitotoxinas (eniatinas y ácido fusárico) que son compuestos tóxicos para las plantas, micotoxinas (tricotecenos y fumonisinas) que son tóxicas para los animales y el hombre (Villa *et al.*, 2015). Actualmente se conocen cerca de 300 tipos micotoxinas siendo las más relevantes: aflatoxinas (AFs), ocratoxina A (OTA), patulina (PAT), fumonisinas (FBs), zearalenona (ZEA), tricotecenos y alcaloides del ergot producidas por especies de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Claviceps* (Abrunhosa *et al.*, 2012).

*Fusarium verticillioides* es uno de los principales fitopatógenos caracterizado por producir metabolitos secundarios tóxicos como las denominadas fumonisinas (micotoxinas), que contaminan los cultivos y los sitios de almacenamiento de granos (Desjardins & Plattner, 2000). Las fumonisinas fueron descritas por primera vez en 1988 por Gelderblom *et al.* (Afolabi, Bandyopadhyay, Leslie, & Ekpo, 2006). Desde su descubrimiento más de 15 fumonisinas se han aislado y caracterizado, agrupadas en cuatro categorías principales A, B, C y P (Stockmann-Juvala & Savolainen, 2008). De estas las fumonisinas B1, B2 y B3, son encontradas predominantemente en condiciones de campo (Shim & Woloshuk, 2001). Estructuralmente, las fumonisinas contienen un esqueleto lineal de 20 carbonos, con un amino en el C-2 y residuos de ácido tricarbóxico esterificados en C-14 y C-15. Estos compuestos difieren por la presencia o la ausencia de un grupo hidroxilo en los C-5 y C-10 (De la Torre, Sánchez, Galeana, & Plasencia, 2014).

Entre las fumonisinas, las de tipo B (FB) son sumamente tóxicas y han sido clasificadas por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer como sustancias de la clase 2B, posiblemente carcinógenas para los seres humano (Serrano & Cardona, 2015; Duvick, 2001). En especial la FB1 es generalmente el miembro más abundante de la familia de las micotoxinas producidas por *Fusarium verticillioides* y está asociada a distintos tipos de enfermedades, entre ellas, leucoencefalomalacia en caballos (Logrieco, Bottalico, Mulé, Moretti, & Perrone, 2003), cáncer de hígado en ratas, edema pulmonar en cerdos, neurodegeneración en ratones (Afolabi, Bandyopadhyay, Leslie, & Ekpo, 2006), cambios morfológicos testiculares y la reducción de la fertilidad en conejos (Ewuola & Egbunike, 2010) y cáncer de esófago, lesiones cutáneas, queratitis en humanos (Deepa & Sreenivasa, 2017). Estos efectos nocivos, se deben principalmente al mecanismo que poseen para interrumpir vías biosintéticas de esfingolípidos ya que son estructuralmente similares a la esfinganina, un intermediario biosintético del esfingolípido, inhibiendo la enzima esfinganina N-aciltransferasa o ceramida sintasa. (Desjardins & Plattner, 2000; Stockmann, Juvala & Savolainen, 2008; Merrill *et al.*, 2001; Soriano, Gonzáles, & Catalá, 2005). Los esfingolípidos son elementos esenciales en la estructura de la membrana celular particularmente en células nerviosas y lipoproteínas, además actúan en la señalización celular como segundos mensajeros para los factores de crecimiento, diferenciación y muerte celular. El papel de FB1 como elemento de virulencia en la infección por *Fusarium verticillioides* en la planta, aún no está

totalmente descrito, pero estudios realizados indican que la FB1 incrementa la virulencia del patógeno y promueve la colonización del hongo en el tejido vegetal. La toxina puede influir en la reducción del crecimiento, inhibir la elongación radicular de las semillas de maíz en la germinación y, además, disminuir la longitud de la raíz y el tallo. También se ha reportado que la FB1 bloquea la biosíntesis de esfingolípidos en células vegetales (Desjardins & Plattner, 2000; De la Torre, Sánchez, Galeana, & Plasencia, 2014).

Las fumonisinas reciben gran atención porque son contaminantes comunes de los cereales y productos derivados de ellos. Son de distribución ubicua y se encuentran con frecuencia en productos agrícolas recién cosechados y almacenados, como cereales, en todas las etapas de su producción, procesamiento y almacenamiento (Deepa & Sreenivasa, 2017). Además, del maíz también se ha detectado FB1 en el arroz, sorgo, salvado de trigo, harina de soja y comida para aves de corral (Stockmann-Juvala & Savolainen, 2008) y en niveles bajos en cebada y trigo (Deepa & Sreenivasa, 2017). En algunos países se ha reportado presencia de FB1 en arroz, harina, pan, cereales para el desayuno e inclusive galletas, en niveles de 0.010-0.790 µg/g (Cirillo, Ritieni, Galvano, & Coochieri, 2003). Además, se reportó niveles muy bajos de FB1 en cerveza de maíz (Shephard *et al.*, 2005). El consumo de alimentos preparados con cereales contaminados con estas micotoxinas se ha asociado a intoxicaciones agudas, en las cuales se presentan manifestaciones gastrointestinales como vómitos, diarrea, dolor abdominal y deshidratación, como también enfermedades crónicas graves (Peraica, Radic, Lucic, & Pavlovic, 1999; Marín, 2010).

### **2.2.5 Uso de plaguicidas en la agricultura**

La mayor parte de los problemas fitosanitarios son causados por hongos, bacteria, insectos y virus, que afectan diversas partes de la planta, provocando desde la disminución de la calidad del producto y hasta el decaimiento total de la planta. El control de plagas y enfermedades depende, en gran parte, de la aplicación de productos químicos sintéticos como organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, biperidinas entre otros, los cuales ocasionan problemas de salud humana, desequilibrio ambiental, y desfavorablemente el surgimiento de plagas y enfermedades más agresivas y resistentes a ellos (Martínez *et al.*, 2010). Los pesticidas son utilizados ampliamente para controlar las enfermedades de los cultivos causadas por fitopatógenos fúngicos, sin embargo, algunos fitopatógenos fúngicos son

además productores de micotoxinas que se distribuyen en los cultivos, afectan animales y humanos por su elevada toxicidad. Los pesticidas reducen las enfermedades fúngicas en los cultivos, pero no reducen su contaminación con micotoxinas, en contraste, existe evidencia de que el uso de pesticidas químicos puede estar asociado con el incremento en la producción de micotoxinas, además es posible que la resistencia a los pesticidas contribuya al incremento en la producción de micotoxinas (D'Mello *et al.*, 1998; Arroyo, Huertas, Gámiz, & García, 2014).

El control químico es una de las prácticas más comunes de manejo de plagas en áreas de producción agrícola. Se estima que en la actualidad aproximadamente el 85% de los plaguicidas empleados en el mundo se utilizan en el sector agropecuario (Cervantes, 2010). En Bolivia el uso de plaguicidas es una práctica creciente y resulta de relevancia para la salud pública por los efectos potenciales de exposición activa en las poblaciones trabajadoras. Es aún muy usual observar que agricultores emplean plaguicidas extremadamente tóxicos en las prácticas de explotación agrícola tales como Metamidophos, profenophos, Monocrotophos (grado Ia, Ib y II). El manejo de plaguicidas es altamente tóxico debido a varios factores, entre ellos la falta de asistencia técnica del Estado, venta ilegal e indiscriminada de plaguicidas en ferias rurales, deficiente control en puestos fronterizos, etc. (Plan de manejo de plagas, 2009). En los últimos ocho años, las importaciones de plaguicidas a Bolivia ascendieron a 1.237 millones de dólares, por la compra de 228 mil toneladas de plaguicidas, en términos de valor máximo histórico en la gestión 2014 (IBCE, 2015). Se estima que hasta un 30 a 35% de plaguicidas ingresan al país de manera ilegal y están presentes en casas comerciales y campos productores. Asimismo, se ha reportado la comercialización libre de 2,4-D-fipronil, cipermetrina, metamiphodos, endosulfan y monocrotophodos, los tres últimos prohibidos para la venta (Zanabria, Bickel, Jacobi, & Delgado, 2018).

La presencia de residuos de plaguicidas en los alimentos puede derivar en enfermedades en el ser humano, según un estudio realizado por la Fundación Plaguicidas en Bolivia (PlagBol) donde se encontró cuatro tipos de plaguicidas en lechugas tales como: Cipermitrin, Clorpirifos, Difenconazol y Lambda-Cihalotrin (Cuevas, 2015). También se reportó, la presencia de residuos de plaguicidas en tomates como los organosfosforados (clorpirifos, dimetoato, metilparation, malation) por encima de los límites permisibles en dos localidades

productoras de tomate en Bolivia, Omereque y Rio Chico. Lo más preocupante fue la presencia de metilparatión que se encontró en más del 60% de muestras colectadas en cultivos de tomate, conteniendo una concentración mayor al límite máximo permitido (0,2mg/kg). Según la OMS, este plaguicida es extremadamente peligroso, por inhalación los efectos a nivel respiratorio incluyen hemorragias y escurrimiento nasal, en contacto con la piel causa sudores y contracciones involuntarias y el envenenamiento agudo afecta al sistema nervioso central (Alvarez, Rodrigo, Huici, Barbieri, & Renjel, 2010). La exposición a plaguicidas puede representar un riesgo potencial para los seres humanos, ocasionando neuritis, manifestaciones psiquiátricas, trastornos hepato-renales, problemas neurológicos, inmunológicos, metabólicos, endocrinos, infertilidad entre otros. Asimismo, ha sido relacionado con el aumento en la incidencia de leucemia y cáncer de vejiga en agricultores, como consecuencia de sus efectos genotóxicos (Ascarrunz *et al.*, 2006).

Debido a los efectos negativos al uso de plaguicidas, en la actualidad el agricultor emplea prácticas ecológicas para el mantenimiento de suelo y plantas, con el objetivo de prevenir y minimizar el efecto de las plagas y enfermedades en los cultivos agrícolas, entre ellas, preparación del suelo, deshierbes, fertilización orgánica o química que disminuye la predisposición de la planta a las enfermedades, enmiendas orgánicas, labranza, rotación de cultivos y/o siembra de policultivos, siembra temprana, inspección de plantas por lo menos una vez por semana eliminando manualmente las posibles plagas, eliminación de plantas enfermas, uso de trampas para insectos, recolección temprana ante la aparición de plagas, entre otros. El uso eficiente de estas estrategias ha permitido el manejo racional de enfermedades y plagas disminuyendo el inóculo primario y creando condiciones desfavorables para la infección de los patógenos (Manejo integrado de plagas, 2011; Koenning, 2003). Más allá de las buenas prácticas agronómicas y hortícolas, los productores a menudo dependen en gran medida de fertilizantes químicos y pesticidas, que han contribuido a la mejora en la productividad y calidad de los cultivos. Sin embargo, la contaminación ambiental causada por el uso excesivo e indebido de agroquímicos ha provocado aversión hacia el uso de pesticidas en la agricultura. Ante la necesidad de las comunidades de disponer insumos alternativos para el control de enfermedades y plagas, el control biológico surge como una estrategia que involucra el empleo de organismos o sus productos para el control de enfermedades y plagas, convirtiéndose en una alternativa atractiva para la disminución del uso de productos químicos

debido a los riesgos de contaminación ambiental y al aumento de la demanda de alimentos orgánicos (Krishna & McSpadden, 2006; Ibarra *et al.*, 2006).

Adicionalmente, los microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras y hongos) empleados en el control biológico, tienen la capacidad de ejercer un efecto antagonista sobre diferentes patógenos y se utilizan para mejorar diversos cultivos agrícolas, por ejemplo, *Bacillus licheniformis* fue empleado para el control de la antracnosis y de las pudriciones pediculares en cultivos de mango causados por *Colletotrichum gloeosporioides* (Hernández, Bautista, & Velázquez, 2007). *Bacillus thuringiensis* actúa como un bioinsecticida para el control de una variedad de plagas en especial orugas (Usta, 2013), *Bacillus amyloliquefaciens* empleado para el tratamiento de enfermedades fúngicas transmitidas por el suelo, *Trichoderma sp.* es empleado también para el control de enfermedades en diversos cultivos vegetales, cereales, de algodón y otros (Van Lenteren, Bolckmans, Kohl, Ravensberg, & Urbaneja, 2017). Así también se ha reportado que *Candida oleophila* es un antagonista de hongos fitopatógenos como *Botrytis cinérea* y *Penicillium expansum*, causantes de la pudrición en cultivos de duraznos (Hernández, Bautista, & Velázquez, 2007). Por otro lado, metabolitos o subproductos generados por microorganismos también son empleados en el control biológico de enfermedades en cultivos agrícolas, algunos ejemplos de metabolitos microbianos reportados que están implicados en la supresión de patógenos de las plantas incluyen: Iturina A producido por *Bacillus subtilis* QST713, metabolito implicado en la inhibición de *Botrytis cinerea* y *R. solani*, que afectan cultivos agrícolas. Pirrolnitrina producido por *Burkholderia cepacia* como inhibidor del crecimiento de *R. solani* y *Pyricularia oryzae* (Krishna & McSpadden, 2006).

Durante más de 50 años se ha observado que existen bacterias y hongos que colonizan el tejido vegetal de las plantas sin causar efectos negativos en su hospedero, estos son los denominados microorganismos endófitos. Se ha reportado que los microorganismos endófitos están involucrados en la protección de la planta contra la infección de patógenos (Backman & Sikora, 2008), considerándose como una alternativa para el control biológico de enfermedades en plantas.

### **2.2.6 Bacterias endófitas asociadas a las plantas**

Los microorganismos endófitos residen asintómicamente dentro de los tejidos vegetales sanos sin causar efectos negativos en su hospedero (Prabhali & Dhruva, 2015). Las bacterias endófitas ingresan al tejido a través de las radículas germinativas, raíces, estomas o como resultado del daño foliar, aberturas o heridas naturales (Zinniel *et al.*, 2002). El proceso invasivo de la bacteria al tejido vegetal, involucra la producción de enzimas hidrolíticas como proteasas, lipasas, celulasas, pectinasas, endoglucanasas (Singh, Kumar, Singh, & Pandey, 2017). Dentro del tejido vegetal los microorganismos endófitos pueden colonizar la raíz de las plantas estableciendo subpoblaciones que se propagan sistemáticamente dentro de las plantas hasta colonizar tallos y hojas, y es muy probable que también puedan colonizar flores, frutos y semillas, pero en densidades muy bajas (Compant, Clément, & Sessitsch, 2010; Purnawati, Rochdjatun, Latief, & Hadiastono, 2014). Sin embargo, la comunidad endófitas es dinámica y está influenciada por diversos factores como la estructura fisicoquímica del suelo, la fase de crecimiento de la planta y su estado fisiológico, condiciones ambientales y la diversidad microbiana del suelo (Fig. 3) (Eljounaidi, Lee, & Bae, 2016).

La interacción entre el endófito y la planta se basa en una relación simbiótica, donde las bacterias endófitas pueden promover el crecimiento de las plantas directa o indirectamente. La promoción directa del crecimiento vegetal implica la producción de fitohormonas, la fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos, producción de sideróforos para la captación de hierro del suelo y también facilita la disponibilidad y absorción de nutrientes. La promoción indirecta del crecimiento vegetal ocurre reduciendo el daño a las plantas luego de una infección causada por microorganismos patógenos, incluyendo hongos y bacterias (Sgroy *et al.*, 2009; Santoyo, Moreno, Orozco, & Glick, 2016; Lodewyckx *et al.*, 2002). Estudios sobre la diversidad de microorganismos endófitos aislados de tejidos internos de plantas, mediante métodos basados en cultivo, han revelado más de 129 especies aisladas, con géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Agrobacterium* y otros (Sessitsch, Reiter, Pfeifer, & Wilhelm, 2002).

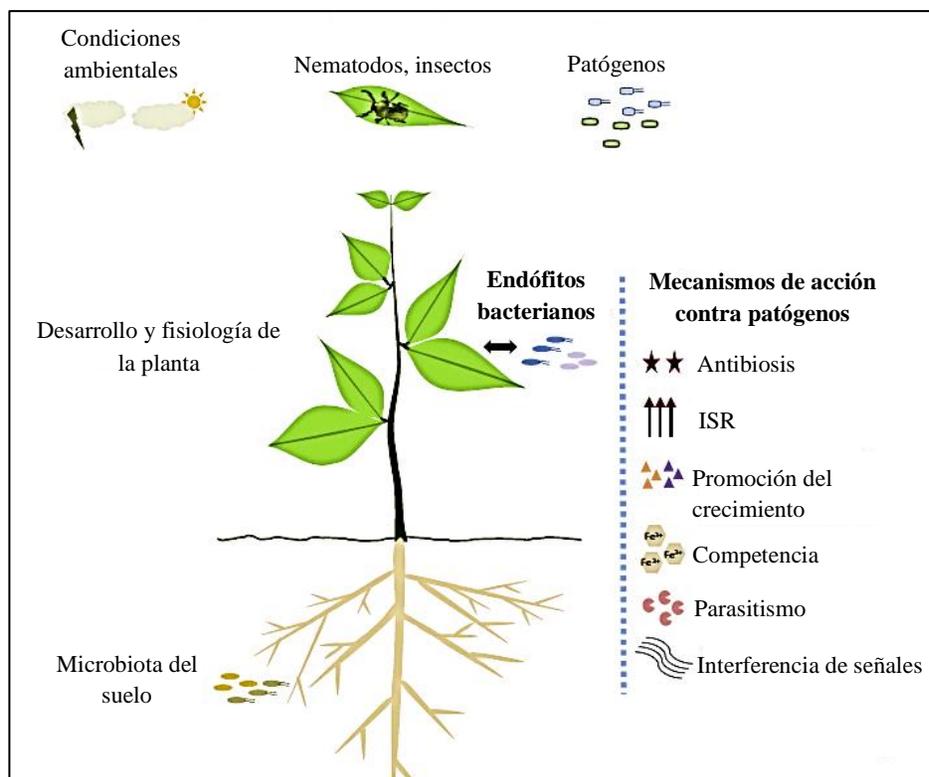
#### **2.2.6.1 Bacterias endófitas como agentes de control biológico**

La pérdida de cultivos por problemas fitosanitarios sigue siendo uno de los problemas más graves debido al aumento de las enfermedades que se presentan durante el desarrollo de

cultivos agrícolas. Los microorganismos endófitos han sido reportados como agentes de control contra fitopatógenos en diversos cultivos, debido a que las bacterias endófitas colonizan el mismo nicho ecológico compitiendo con fitopatógenos, exhibiendo un potencial como agentes de “control biológico” (Chebotar *et al.*, 2015). El control biológico, en su sentido más amplio emplea organismos distintos al hombre con el fin de controlar enfermedades en plantas o reducir la cantidad o efecto de patógenos (Höfte & Altier, 2010). Numerosos reportes han demostrado que los microorganismos endófitos tienen la capacidad de controlar a microorganismos patógenos de las plantas, además de insectos y nematodos (Ryan, Germaine, Franks, Ryan, & Dowling, 2008). Las bacterias endófitas compiten por su nicho ecológico con los fitopatógenos, por ello poseen mecanismos de control biológico ampliamente reconocidos, entre ellos, la competencia con el patógeno por nichos ecológicos o nutrientes; la antibiosis, un mecanismo que se caracteriza por la capacidad de una bacteria endófitas para producir compuestos antimicrobianos e inhibir el crecimiento de fitopatógenos; los endófitos tienen la capacidad de inducir resistencia sistémica en las plantas hospedadoras promoviendo la expresión de genes que confieren resistencia contra un amplio espectro de patógenos; parasitismo, cuando el antagonismo puede operar simplemente usando el patógeno como fuente de alimento; también se describe que los endófitos pueden interferir en la capacidad de detección del quorum sensing del patógeno al degradar las señales de expresión de genes de virulencia (Fig. 3) (Etminani & Harighi, 2018; Berg & Hallmann, 2006; Olanrewaju, Glick, & Babalola, 2017; Compant, Duffy, Nowak, Clément, & Ait, 2005; Berg & Hallmann, 2006). Sin embargo, lo más probable es que exista una combinación de varias estrategias de biocontrol exhibidas poblaciones bacterianas endófitas.

La capacidad de inhibir el crecimiento de fitopatógenos se ha reportado en ciertos géneros bacterianos como ser: *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Agrobacterium* entre otros. Por ejemplo, se reportó que *Pseudomonas fluorescens* y *Bulkholderia sp.*, tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal, debido a que producen metabolitos activos que tienen efecto antagónico e inhiben el crecimiento de hongos como ser *Fusarium sp*, *Curvularia sp*, *Alternaria alternata* (Trujillo, Díaz, Hernández, & Heydrich, 2007). Otros estudios revelan que cepas de *Bacillus*, aisladas de las raíces de arroz, presentan la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de fitopatógenos (Chung, Toajjal, Khan, Hyun, & Ok, 2015).

En este sentido, varios estudios reportan que los microorganismos endófitos nativos son utilizados como una potencial alternativa de control biológico (Suárez & Rangel, 2013).



**Figura 3.** Representación esquemática de los diferentes factores que influyen en la comunidad endófitica: condiciones ambientales, el estado de desarrollo y fisiología de la planta, el microbiota del suelo y la estructura fisicoquímica del suelo. Además, la presentación de posibles mecanismos de supresión de enfermedades ocasionados por patógenos empleando bacterias endófitas: antibiosis, resistencia sistémica inducida, promoción del crecimiento, competencia, parasitismo e interferencia de señales. Fuente: Eljounaidi, Lee, & Bae, (2016).

### 2.3 Marco Conceptual

**Fitopatógenos:** Son aquellos microorganismos que ocasionan enfermedades y deterioro en las plantas, los cuales son responsables de grandes pérdidas en los cultivos.

**Plaguicidas:** Sustancia o mezcla de ellas donde se asocia excipientes o diluyentes denominados ingredientes inertes, destinadas a prevenir, destruir o controlar plagas, incluyendo vectores de enfermedad humana o animal (Ramírez & Lacasaña, 2001).

**Control Biológico:** Es un método que emplea organismos vivos para reducir la densidad de la población de otros organismos como son las plagas (Villacide & Corley, 2012).

**Bacterias promotoras del crecimiento vegetal:** Bacterias asociativas que tienen la capacidad de estimular directamente el crecimiento de la planta, por diversos mecanismos como el aporte

de nitrógeno por el proceso de fijación biológica de nitrógeno atmosférico, producción de sustancias reguladoras del crecimiento, incremento en el volumen de la raíz, solubilización de minerales y nutrientes, inducción de la resistencia sistémica a patógenos (Loredo, López, & Espinosa, 2004).

**Sideróforos:** Moléculas secretadas por microorganismos en condiciones de deficiencia de hierro para su secuestro, son moléculas de bajo peso molecular solubles en medio acuoso (Moreno, Jiménez, García, & Preciado, 2012).

**Resistencia sistémica en la planta:** Una o varias moléculas excretadas por los microorganismos controladores biológicos inducen autodefensas en las plantas frente a cualquier fitopatógeno. Existen dos tipos de resistencia la constitutiva y la inducida (Robles, s.f.).

**Metabolitos secundarios:** Son aquellos compuestos sintetizados por microorganismos, que no tienen un rol directo en el crecimiento y reproducción del mismo, pero confieren características especiales al organismo, por ejemplo, antibióticos, pigmentos, antioxidantes y otros. Se producen después del crecimiento (Metabolismo Secundario, 2011).

**Rizósfera:** Espacio de interacción entre raíces y microorganismos del suelo, esta zona está caracterizada por el aumento de la biomasa y su actividad. La rizósfera provee un complejo y dinámico microambiente, donde las bacterias y hongos se asocian con las raíces (Steciow, s.f.)

**Bioplaguicidas:** Los bioplaguicidas son plaguicidas naturales que derivan de plantas, microorganismos.

### 3. Formulación de la hipótesis de investigación

**Hipótesis nula:** Las bacterias endófitas seleccionadas no poseen actividad antagonica contra el crecimiento de *Fusarium verticillioides*, principal fitopatógeno de cereales, ya sea por mecanismos de inhibición directa o por producción de metabolitos solubles y volátiles.

**Hipótesis alternativa:** Las bacterias endófitas seleccionadas poseen actividad antagonica contra el crecimiento de *Fusarium verticillioides*, principal fitopatógeno de cereales, ya sea por mecanismos de inhibición directa o por producción de metabolitos solubles y volátiles.

#### 4. Operacionalización de las variables de investigación

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADOR
<b>Bacterias endófitas antagónicas contra <i>Fusarium verticillioides</i></b>	Cuantitativa continua	Selección de bacterias endófitas	Inhibición directa del fitopatógeno
<b>Capacidad antagónica de metabolitos bioactivos bacterianos</b>	Cuantitativa continua	Metabolitos solubles y volátiles producidos por bacterias endófitas seleccionadas	Inhibición de <i>Fusarium verticillioides</i> a través de la reducción del crecimiento micelial
<b>Propiedades fisiológicas, bioquímicas y antagonistas</b>	Cualitativa discreta	Identificación de bacterias endófitas seleccionadas	Pruebas positivas y negativas

Fuente: Elaboración propia

#### 5. Diseño metodológico

##### 5.1 Población en estudio, ámbito y periodo de investigación

###### 5.1.1 Población en estudio

La población en estudio comprende cepas de bacterias endófitas criopreservadas y el fitopatógeno que corresponde a *Fusarium verticillioides*, que fueron colectados del cepario del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (IIFB), para la evaluación de la actividad inhibitoria de metabolitos bioactivos producidos por bacterias endófitas frente al crecimiento de *Fusarium verticillioides*.

###### 5.1.2 Ámbito

El estudio se desarrolló en los laboratorios del Área de Biotecnología Microbiana del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.

###### 5.1.3 Periodo de investigación

El presente trabajo de investigación se llevó a cabo en el periodo de 2017-2018.

## **5.2 Tipo de investigación**

Se desarrolló una investigación de tipo experimental, para determinar la capacidad inhibitoria de metabolitos bioactivos producidos por bacterias endófitas frente al crecimiento de *Fusarium verticillioides in vitro*, modificando la variable independiente como medio de cultivo, tiempo, y evaluando su efecto inhibitorio contra el crecimiento de *Fusarium verticillioides*, como variable dependiente.

## **5.3 Materiales, métodos, técnicas y procedimientos**

### **5.3.1 Protocolo de investigación**

**Bacterias endófitas productoras de metabolitos con efecto antagonista contra *Fusarium verticillioides*, principal fitopatógeno de cereales**

**Microorganismos: Bacterias endófitas (antagonista) y *Fusarium verticillioides* (fitopatógeno)**

Activación y Control de axenidad

Aislamiento y Caracterización

**1. Selección preliminar de bacterias endófitas con actividad biocontroladora contra *Fusarium verticillioides***

Enfrentamiento dual en placa

Bacterias con actividad inhibitoria  $\geq 50\%$

Cinética de crecimiento

Conservación de cepas

**2. Producción y evaluación de metabolitos bacterianos con actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides***

Cultivo en estado líquido (CEL)

Cultivo en estado sólido (CES)

Evaluación de la actividad inhibitoria *in vitro* (% de inhibición)

Metabolitos solubles

Metabolitos volátiles

Metabolitos combinados

**3. Caracterización de bacterias endófitas seleccionadas por su capacidad de producir metabolitos bioactivos contra *Fusarium verticillioides***

Propiedades fisiológicas

Propiedades bioquímicas

Propiedades antagonistas

### 5.3.2 Microorganismos

#### 5.3.2.1 Microorganismos antagonicos (Cepas Bacterianas)

Cuarenta y un muestras criopreservadas de bacterias endófitas provenientes del cepario del IIFB fueron empleadas en este estudio. Estos microorganismos fueron aislados a partir de tejidos vegetales de Thola (*Parastrephyale pidophylla*) y Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), los cuales 20 cepas bacterianas corresponden a Tarwi y 21 a Thola, se reportó su capacidad de fijación de nitrógeno (Vásquez, 2018). Adicionalmente, con fines comparativos se empleó la cepa *Pseudomonas rhizosphaerae* por su actividad biocontroladora.

#### 5.3.2.2 Microorganismo patógeno (Fitopatógeno Fúngico)

En el presente estudio se utilizó el hongo fitopatógeno *Fusarium verticillioides*, cepa proveniente del cepario de Biotecnología fúngica-IIFB, tipificada morfológica, fisiológica y genéticamente en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímica (Mamani, 2017).

### 5.3.3 Activación, control de axenidad y aislamiento

Las muestras bacterianas endófitas criopreservadas fueron activadas en caldo nutritivo (CN) a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Posteriormente, se realizaron resiembras en CN (3%, v/v) y se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 48 horas. Se evaluó el carácter axénico de cada muestra, realizando diluciones seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ), sembrando 100  $\mu\text{L}$  de cada suspensión bacteriana en placas de agar nutritivo (AN) e incubando a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas. Colonias aisladas en placas con AN, fueron colectadas empleando un asa bacteriológica y re-sembradas por estría y agotamiento en placas con AN, las cuales se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas.

Seguidamente, la cepa de *Fusarium verticillioides* fue reactivada en agar papa-dextrosa (PDA), se inoculó 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión de esporas ( $10^6$  esporas/mL, aprox.) en pozos de 6 mm de diámetro situados en el centro de la caja Petri y se incubo a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 7 días. Posteriormente, se realizó un lavado monospórico adicionando 2 mL de solución fisiológica (0.9%, p/v), y agitando la caja Petri con movimientos circulares. La suspensión de esporas se recolectó en viales estériles, se realizó diluciones seriadas ( $10^{-1}$  -  $10^{-3}$ ), sembrando 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión en placas con PDA e incubando a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente, se realizaron observaciones para detectar la germinación de las conidias empleando un

estereomicroscopio (Optika, Italy). Se seleccionó una conidia y se transfirió a una nueva caja Petri con PDA, e incubó a  $28 \pm 1$  °C durante 7 días.

### 5.3.3.1 Preparación de inóculo fúngico

La suspensión de esporas del *Fusarium verticillioides* se preparó a partir de un cultivo puro en PDA de 7 días de crecimiento, adicionando 2 mL de solución fisiológica (0.9% p/v) y homogenizando mediante movimientos circulares para suspender las esporas. Se recolectó la suspensión de esporas en tubos estériles de tapa rosca. 10 µL de la suspensión de esporas fueron depositados en una cámara de Neubauer, para realizar el recuento en el cuadrante central. El inóculo fúngico para los experimentos subsecuentes fue ajustado a una concentración de  $1.6 \times 10^6$  esp/mL, empleando el procedimiento descrito.

### 5.3.3.2 Cinética de crecimiento de *Fusarium verticillioides*

*Fusarium verticillioides* fue evaluada en función a la cinética (velocidad) de crecimiento. Para ello, se preparó una suspensión de esporas una concentración equivalente a  $1.6 \times 10^6$  esp/mL, posteriormente se inoculó 100 µL de la suspensión en pozos de 6 mm de diámetro situados al centro de las placas Petri, 19 cm, con medio PDA. Las placas fueron incubadas a  $28 \pm 1$ °C hasta que el micelio detuviera su crecimiento por contacto con los bordes de la caja Petri. La medición se realizó en el reverso de la placa de Petri desde el borde del inóculo hasta la punta del micelio. Se midió cada 24 horas, el crecimiento del frente hifal en las cuatro orientaciones (norte, sur, este, oeste). El incremento del crecimiento hifal en cm fue graficada en función del tiempo.

### 5.3.4 Caracterización morfológica de microorganismos

Colonias de cepas de bacterias endófitas desarrolladas en placas de AN, fueron caracterizadas en función a su morfología macroscópica: tamaño, forma, color, borde, superficie y consistencia de colonias, y sus características microscópicas, cuando cada una de las cepas bacterianas fue sometida a tinción diferencial Gram cuya observación fue realizada empleando un microscopio óptico (Olympus, Taiwán) con una magnificación de 1000X.

El micelio de *Fusarium verticillioides* desarrollado en PDA fue caracterizado macroscópicamente en función a la coloración, tipo de crecimiento y aspecto del micelio

empleando un estereomicroscopio. Para la caracterización microscópica se empleó cinta adhesiva transparente sobre la superficie del micelio, la cual fue colocada sobre un portaobjetos que contenía una gota de colorante vegetal, la preparación se observó al microscopio utilizando una magnificación de 400X.

### **5.3.5 Selección preliminar de bacterias endófitas con actividad biocontroladora**

Se realizó la evaluación preliminar de antagonismo en placa para seleccionar las cepas de bacterias endófitas con actividad inhibitoria *in vitro* sobre el crecimiento *Fusarium verticillioides*. Para ello, se empleó la técnica de enfrentamiento dual descrita por Sgroy *et al.*, (2009), con las siguientes modificaciones: se empleó un cultivo activo de cada aislado endófito desarrollado por 24 horas en AN, 3 o 5 colonias fueron seleccionadas y transferidas a solución fisiológica (0.9%, p/v) hasta obtener una turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). Se sumergió un hisopo estéril dentro de cada suspensión bacteriana retirando el exceso en las paredes del tubo, y se sembró el inóculo uniformemente en la superficie de medio PDA para obtener un crecimiento confluyente. Se utilizó medio estéril como control negativo y un saturado de *Pseudomonas rhizosphaerae* ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) como control positivo. Posteriormente, se inoculó 80  $\mu$ L de una suspensión de esporas de *Fusarium verticillioides* a una concentración de  $1.6 \times 10^6$  esp/mL en pozos de 6 mm de diámetro situados al centro de las placas Petri. Las placas fueron incubadas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 días. Los resultados fueron evaluados a través de la determinación del porcentaje de inhibición micelial de *Fusarium verticillioides* (descrito en la sección 5.3.7.4) y se seleccionaron como antagonistas a aquellas cepas bacterianas cuyo porcentaje de inhibición fue mayor o igual al 50%.

#### **5.3.5.1 Conservación de cepas**

Las cepas de bacterias endófitas seleccionadas en la prueba de antagonismo en placa (sección 5.3.5) fueron criopreservadas en glicerol (25%, v/v) empleando el procedimiento descrito por Hubálck, (2003). 3 mL de un cultivo activo de cada cepa bacteriana desarrollada por 24 horas en CN, fue centrifugado a 3500 rpm por 10 min, el paquete celular fue transferido a tubos de criopreservación estériles. Seguidamente, se adicionó 750  $\mu$ L de CN estéril e incubó a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por una hora, para agregar 250  $\mu$ L de glicerol estéril. Las suspensiones celulares fueron

mantenidas a temperatura ambiente por una hora, a 4 °C por una hora, a -20 °C por 18 horas y fueron conservadas a -80 °C hasta su uso.

### **5.3.6 Determinación de parámetros cinéticos de bacterias endófitas seleccionadas**

Las bacterias endófitas con actividad antagónica seleccionadas en la sección 5.3.5, fueron evaluadas en función a sus parámetros cinéticos, que incluyeron: cinética de crecimiento bacteriano y variación de pH durante su desarrollo. Para ello, se preparó una suspensión bacteriana activa con una concentración equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). Alícuotas de 0.1% (v/v) fueron inoculadas en 150 mL de CN (pH  $6.9 \pm 0.3$ ) e incubadas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$ , 120 rpm durante 48 horas. Muestras de 3 mL del cultivo bacteriano fueron recolectadas cada tres horas, para determinar el incremento de la turbidez a una longitud de onda de 620 nm en un espectrofotómetro (Cary 50 Bio UV-Visible, Australia). Así mismo, se registró la variación de pH empleando un potenciómetro de mesa (Oaktron, Singapur). El incremento de absorbancia y la variación de pH fueron graficadas en función del tiempo.

### **5.3.7 Producción y evaluación de metabolitos bioactivos solubles con actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides***

#### **5.3.7.1 Producción de metabolitos bioactivos solubles por cultivo en estado líquido**

Las bacterias endófitas con actividad antagónica seleccionadas en la sección 5.3.5 fueron estudiadas en función a su capacidad de producir metabolitos solubles con actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides*. Para ello, se evaluaron procesos de acuerdo al procedimiento descrito por Mohammed & Ravishankar, (2015) con las siguientes modificaciones: Se emplearon viales (100 mL) que contenían 70 mL de CN, los cuales fueron inoculados con una suspensión bacteriana endófitas al 0.1% (v/v), con turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL), utilizando como control positivo una suspensión de *Pseudomonas rhizosphaerae* ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) en las mismas condiciones. Posteriormente, los viales se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  y 120 rpm y se recolectaron muestras (70 mL) cada 0, 18, 24, 36, 48, 72, 120, 168 horas para la obtención del filtrado bacteriano (metabolitos solubles). Para ello, las muestras fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 20 min a 5 °C, recuperando el sobrenadante, para filtrarlo a través de una membrana de nitrocelulosa

(diámetro de poro 0.2  $\mu\text{m}$ ). Cada filtrado obtenido debidamente rotulado, se almacenó a 4 °C para posteriormente evaluar su actividad antagónica *in vitro* sobre *Fusarium verticillioides* (procedimiento descrito en la sección 5.3.7.3).

### **5.3.7.2 Producción de metabolitos bioactivos solubles por cultivo en estado sólido**

Las bacterias endófitas con actividad antagónica seleccionadas en la sección 5.3.5 fueron estudiadas en función a su capacidad de producir metabolitos solubles, por cultivo en estado sólido (CES) de acuerdo a los procedimientos descritos por Ghribi *et al.*, (2012) y Danesh, Mamo & Mattiasson (2011), con las siguientes modificaciones: Salvado de trigo (0,3-0,4 cm) y cascarilla de arroz (0,5-0,6 cm), fueron empleados como sustratos sólidos. Para ello, se pesaron 40 g de cada sustrato y transfirieron a matraces Erlenmeyer de 1000 mL. A continuación, el sustrato fue esterilizado dos veces a 121 °C por 15 min, en un intervalo de 12 h para eliminar los microorganismos formadores de esporas provenientes del sustrato. Posteriormente, se añadió agua destilada en condiciones asépticas, 80 mL para el salvado de trigo y 60 mL para la cascarilla de arroz (proporción 1:2.5 y 1:1.5 p/v, respectivamente). Luego, se inoculó 16 mL de cada cultivo endófito seleccionado (16-20 %, v/v) activado previamente en CN durante 24 horas. *Pseudomonas rhizosphaerae* fue empleada como control positivo en las mismas condiciones y agua destilada estéril en lugar del inóculo bacteriano fue empleada como control negativo. Todos los matraces fueron incubados en estanco a  $28 \pm 1$  °C por 120 horas, abriendo asépticamente los tapones de cada matraz a las 48 y 96 horas para facilitar la transferencia de gases. Posterior a las 120 horas de incubación, se añadió 40mL de agua destilada a cada matraz, agitando a 150 rpm durante 30 min., todo el contenido de cada matraz fue centrifugado dos veces a 10.000 rpm durante 15 min a 5 °C. Los sobrenadantes fueron colectados y filtrados empleando una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$ ) y cada filtrado obtenido debidamente rotulado, se almacenó a 4 °C para posteriormente evaluar su actividad antagónica *in vitro* (procedimiento descrito en la sección 5.3.7.3).

### **5.3.7.3 Evaluación de la actividad inhibitoria de filtrados bacterianos contra *Fusarium verticillioides***

Cada filtrado bacteriano, obtenido por cultivo en estado líquida o sólido, fue evaluado por su actividad inhibitoria *in vitro* contra *Fusarium verticillioides*. Para ello, se empleó la técnica de

vertido en placa descrito por Reinozo *et al.*, (2007) con algunas modificaciones: Se realizó una dilución 1:1 (v/v) de cada filtrado bacteriano con medio de cultivo PDA, dejando solidificar el medio por 18 horas a 4 °C. Se emplearon placas con PDA exento de filtrado como controles positivos. Posteriormente, se inoculó 80 µL de una suspensión de esporas de *Fusarium verticillioides* ( $1.6 \times 10^6$  esp/mL) en pozos de 6 mm de diámetro situados al centro de las placas, las cuales fueron incubadas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 días. Posteriormente, se determinó el porcentaje de inhibición micelial.

#### **5.3.7.4 Determinación del porcentaje de inhibición micelial**

La evaluación de la actividad inhibitoria de bacterias endófitas y/o sus metabolitos bacterianos contra *Fusarium verticillioides* a través de la técnica de enfrentamiento dual (sección 5.3.5), vertido en placa (sección 5.3.7.3) o la actividad inhibitoria de metabolitos bacterianos volátiles (sección 5.3.8), fue determinada de acuerdo al porcentaje de inhibición de *Fusarium verticillioides*, de acuerdo al diámetro de crecimiento micelial medido a los 7 y 15 días de incubación. El porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó mediante la ecuación descrita por Zarrin *et al.*, (2009).

$$\text{Porcentaje de inhibición micelial} = [(D_a - D_b) / D_a \times 100]$$

Donde,  $D_a$  es el diámetro de la zona de crecimiento micelial (control negativo) y  $D_b$  es el diámetro de la zona de crecimiento micelial con tratamiento.

#### **5.3.8 Evaluación de la actividad inhibitoria de metabolitos bacterianos volátiles contra *Fusarium verticillioides***

Las bacterias endófitas evaluadas por su actividad antagónica en la sección 5.3.5 fueron clasificadas en función a su capacidad de producir metabolitos volátiles empleando la técnica de doble placa descrita por Montealegre *et al.*, (2003), con las siguientes modificaciones: se prepararon suspensiones bacterianas activas con una densidad equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL). Se inóculo 100 µL de cada suspensión bacteriana en una base de placa Petri con AN, realizando una siembra por extensión en superficie. Posteriormente, en la base de otra placa Petri con medio PDA se inoculó 80 µL de una suspensión de esporas de *Fusarium verticillioides* ( $1.6 \times 10^6$  esp/mL) en un pozo central de 6

mm de diámetro. Se empleó 100 µL de agua destilada en lugar de la suspensión bacteriana como control negativo. Una vez que el inóculo fue absorbido totalmente en la superficie del medio, las bases fueron selladas entre sí empleando parafilm®, así se evitó el contacto físico entre el fitopatógeno y la suspensión bacteriana y facilitó la migración de metabolitos volátiles en la atmosfera interna. Cada doble placa se incubó a  $28 \pm 1$  °C durante 15 días. Los resultados fueron evaluados a través de la determinación del porcentaje de inhibición micelial de *Fusarium verticillioides* descrito en la sección 5.3.7.4.

Adicionalmente, para demostrar que los metabolitos volátiles bacterianos ejercían inhibición del crecimiento fúngico, se añadió carbón activado como adsorbente en el sistema de placa dividida empleando la técnica descrita por Fernando, Ramarathnam, Krishnamoorthy, & Savchuk, (2005) y Raza *et al.*, (2016) con algunas modificaciones: placas de petri de tres compartimentos fueron empleados en el proceso, 50 µL de cada suspensión bacteriana ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) fueron inoculados en un compartimiento de la placa petri con AN. Además, 80 µL de una suspensión de esporas de *Fusarium verticillioides* ( $1.6 \times 10^6$  esp/mL) fueron inoculados en un pozo central de 6 mm de diámetro en otro compartimiento de la placa Petri con medio PDA. Finalmente, en un tercer compartimento se añadió carbón activado (2g), para adsorber los compuestos volátiles bacterianos. Las placas se sellaron con parafilm® y se incubaron a  $28 \pm 1$ °C por 120 horas.

#### **5.3.8.1 Producción y evaluación de metabolitos volátiles empleando cultivo en estado líquido**

La actividad inhibitoria de metabolitos volátiles producidos en cultivo en estado líquido (CEL) por la cepa C-20 ñ2Th, seleccionada en el ensayo previo, fue evaluada contra *Fusarium verticillioides*, empleando la técnica descrita por Cordero, Príncipe, Jofré, Mori, & Fischer, (2014) con las siguientes modificaciones: Se diseñó un sistema cerrado de dos viales (100 mL) conectados por una manguera de 8 mm de diámetro (Masterflex®). En el primer vial, que contenía 80 mL de CN, se inoculó una suspensión de la cepa C-20 ñ2Th al 0.1% (v/v, con turbidez equivalente al tubo 0.5 de la escala de McFarland:  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL), incubando a  $28 \pm 1$  °C y 120 rpm durante 72 horas, durante este tiempo la atmosfera interna fue saturada con los metabolitos volátiles cerrando un extremo de la manguera con una abrazadera metálica. Posteriormente, el segundo vial que contenía medio PDA (30mL) fue inoculado con

un disco de micelio activo de *Fusarium verticillioides*. Seguidamente, se retiró la abrazadera metálica para facilitar la transferencia de metabolitos volátiles en el sistema cerrado, que fue incubado a  $28 \pm 1$  °C y 120 rpm durante 5 días. Adicionalmente, se empleó un sistema similar que no contenía la suspensión bacteriana como control negativo, además se empleó una suspensión de *Pseudomonas rhizosphaerae* ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) como control positivo. Los resultados fueron evaluados a través de la determinación del porcentaje de inhibición micelial de *Fusarium verticillioides* descrito en la sección 5.3.7.4.

#### **5.3.8.2 Producción y evaluación de metabolitos volátiles empleando cultivo en estado sólido**

Para evaluar la inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* por compuestos volátiles producidos por cultivo en estado sólido (CES) empleando la cepa C-20 ñ2Th se utilizó la técnica descrita en la sección previa. Para ello, se empleó el mismo sistema cerrado con las siguientes modificaciones: en lugar de 80 mL de CN se utilizó 15 g de salvado de trigo como sustrato sólido para el crecimiento de la cepa C-20 ñ2Th en el primer vial, empleando 20% (v/v) de inóculo previamente activado en CN ( $28 \pm 1$ °C por 24 horas). El salvado de trigo fue previamente tratado como se describe en la sección 5.3.7.2. Adicionalmente, el sistema se incubó en estanco a  $28 \pm 1$ °C durante 120 horas, manteniendo cerrado el extremo de la manguera conectora como describió anteriormente. Posteriormente, en el segundo vial que contenía medio PDA se inoculó un disco de micelio activo de *Fusarium verticillioides* en PDA se abrió la manguera conectora, y se incubó el sistema cerrado a  $28 \pm 1$ °C, en estanco durante 5 días. Se empleó un sistema similar que no contenía la suspensión bacteriana como control negativo y una suspensión de *Pseudomonas rhizosphaerae* (20% v/v) como control positivo. Los resultados fueron evaluados a través de la determinación del porcentaje de inhibición micelial de *Fusarium verticillioides* descrito en la sección 5.3.7.4.

#### **5.3.8.3 Evaluación de la inhibición de *Fusarium verticillioides* por el efecto combinado de metabolitos solubles y volátiles**

Para la evaluación de la inhibición de *Fusarium verticillioides* por efecto combinado de metabolitos solubles y volátiles producidos por la cepa C-20 ñ2Th, se empleó el sistema cerrado de dos viales (100 mL) descrito en las secciones 5.3.8.1 y 5.3.8.2. Para ello,

previamente se desarrollaron dos procedimientos paralelos: *i.*) Obtención de metabolitos solubles (filtrados crudos) a las 72 horas de CEL (sección 5.3.7.1) y 120 horas de CES con salvado de trigo como sustrato (sección 5.3.7.2). *ii.*) Producción de metabolitos volátiles por CEL (5.3.8.1) y CES (sección 5.3.8.2) empleando el sistema cerrado y favoreciendo la saturación con metabolitos volátiles en el primer vial. Posterior a ello, en el segundo vial se agregó medio PDA (30 mL) suplementado con el filtrado crudo proveniente del procedimiento *i.* (diluciones 1:2 y 1:3 para metabolitos solubles obtenidos por CEL y CES, respectivamente) e inoculado con un disco de micelio activo de *Fusarium verticillioides*. Se abrió la conexión en el sistema de dos viales para evaluar la inhibición de *Fusarium verticillioides* por el efecto combinado de los metabolitos solubles y volátiles, incubando a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 5 días. Adicionalmente, se empleó un sistema similar que no contenía la suspensión bacteriana como control negativo y una suspensión de *Pseudomonas rhizosphaerae* como control positivo. Los resultados fueron evaluados a través de la determinación del porcentaje de inhibición micelial de *Fusarium verticillioides* descrito en la sección 5.3.7.4.

### **5.3.9 Caracterización de bacterias endófitas productoras de metabolitos bioactivos contra *Fusarium verticillioides***

Las bacterias endófitas productoras de metabolitos con actividad antagónica, seleccionadas en la sección 5.3.5, fueron sometidas a pruebas de caracterización fisiológica y bioquímica. La capacidad de las cepas endófitas para crecer a diferentes temperaturas se llevó a cabo inoculando cada aislado en AN (pH 7.0) e incubando las placas a temperaturas variables de 4, 28, 37 y 42 °C. Por otro lado, se evaluó el crecimiento de los aislados en Agar MacConkey (MERCK, Alemania), sembrando por estría agotamiento e incubando a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas, este medio de cultivo es selectivo y diferencial diseñado para aislar selectivamente bacilos Gram negativos y diferenciarlos sobre la base de la fermentación de la lactosa. Test O/F (oxidación/fermentación), para esta prueba se preparó medio basal OF de Hugh-Leifson con glucosa (Koneman *et al.*, 2006), y se sembró cada aislado por picadura en un tubo O (sin vaselina) y otro tubo F (cubierto con vaselina), incubando a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 48 horas. Las bacterias oxidadoras solo produjeron ácido en el tubo O, las bacterias fermentadoras produjeron ácido en ambos tubos, O y F. Finalmente, el cultivo en Agar Cetrimida (MERCK, Alemania) permitió asignar a los aislados endófitos al género *Pseudomonas*, para ello fueron

sembrados por estría agotamiento e incubados a  $28 \pm 1$  °C por 5 días. La producción de pigmento fluorescente del cultivo en agar Cetrimida fue observada en luz UV empleando un transiluminador (Spectroline, Nueva York).

Adicionalmente, pruebas bioquímicas como actividad catalasa, oxidasa, TSI y SIM fueron realizadas a los aislados endófitos. Para la determinación de actividad catalasa se empleó un portaobjetos conteniendo una gota de peróxido de hidrógeno (3%, v/v) a la cual se adicionó una porción de cada colonia, la formación de burbujas indicó actividad positiva. Para la determinación de actividad oxidasa, se colocó una tira impregnada con NNN'N' tetrametil-p-fenilendiaminadihidroclorada (OXOID, Australia), como sustrato de la enzima citocromo oxidasa sobre cada colonia, el viraje del indicador de incoloro a azul indicó actividad positiva. Se evaluó también la capacidad fermentativa con glucosa, sacarosa y lactosa; la producción de H<sub>2</sub>S e Indol; y motilidad empleando agares TSI (CRITERION, Santa María) y SIM (CRITERION, Santa María). Colonias aisladas fueron sembradas en estos medios e incubadas a  $28 \pm$  °C por 48 horas. Finalmente, se determinó la actividad proteasa y gelatinasa de cepas endófitas. Para ello, los aislados endófitos fueron sembrados por estría agotamiento en placas con AN suplementado con leche descremada (2%, p/v) (Noriega, Hernández, Acebo, & Luis 2016), incubando a  $28 \pm 1$  °C por 72 horas, la actividad proteasa fue revelada por la aparición de una zona clara alrededor de las colonias reveló un resultado positivo. Para la actividad gelatinasa, las cepas endófitas fueron sembradas por picadura en medio Gelatina Nutritiva (Scharlau, Barcelona) e incubadas a temperatura ambiente por 72 horas, la actividad gelatinasa se observó por la licuefacción de la gelatina.

Las propiedades antagonistas de las cepas endófitas también fueron evaluadas en el presente trabajo de investigación. Entre ellas, la producción de biosurfactantes se evaluó mediante la actividad hemolítica, lipolítica y el índice de emulsificación. Para ello, las cepas endófitas fueron sembrados por estría agotamiento en medio Agar Sangre, para la determinación de la actividad hemolítica, y en medio LB suplementado con Tween 80 (2%) y rojo de metilo (0.01%), para la determinación de la actividad lipolítica (Poritsanos, 2015). Ambas placas fueron incubadas a  $28 \pm 1$  °C por 48 horas. Por otro lado, el índice de emulsificación de biosurfactantes, fue determinado empleando las cepas bacterianas endófitas inoculadas en medio de sales mínimo (MMS) descrito por Rivera, Martínez, Osorio, & Martínez, (2010)

compuesto por: glicerol al 2%, NaNO<sub>3</sub> (1,0 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,1 g/L), MgSO<sub>4</sub>•7 H<sub>2</sub>O (0,1 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,1 g/L) a pH 7.0 e incubadas a 28 ± 1 °C y 150 rpm durante 120 h. Transcurrido el tiempo de incubación, el caldo fue centrifugado a 5000 rpm, 5 °C durante 20 min. El sobrenadante libre de células fue empleado para la determinación del índice de emulsificación según la técnica descrita por Becerra & Horna, (2016), con algunas modificaciones: a 2mL del sobrenadante se añadió 1mL de diésel, agitando a alta velocidad para asegurar una mezcla homogénea de ambos líquidos dejando reposar durante 24 horas, empleando paralelamente un medio de cultivo sin inoculación como control negativo. La formación de un anillo de emulsificación permitió determinar el índice de emulsificación por la producción de biosurfactantes. Adicionalmente, se evaluó la capacidad emulsificante de los filtrados crudos bacterianos obtenidos por CEL y CES en la sección 5.3.7.1 y 5.3.7.2 empleando proceso descrito anteriormente.

Entre otras propiedades antagonistas descritas se destaca la producción compuestos volátiles inorgánicos como ácido cianhídrico (HCN) y amoníaco por bacterias endófitas. Por tanto, la producción de ácido cianhídrico se determinó según la técnica descrita por Trivedi, Pandey & Palni (2008), con algunas modificaciones: se preparó un experimento similar al procedimiento descrito en la sección 5.3.8, inoculando 100 µL de cada suspensión bacteriana (1.5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL) en una base de placa Petri con AN suplementado con glicina (4.4 g/L) y una placa de AN sin glicina como control. Separadamente, otra base de placa Petri fue preparada con medio PDA inoculando 80 µL de una suspensión de esporas de *Fusarium verticillioides* (1.6 x10<sup>6</sup> esp/mL) en un pozo central de 6 mm de diámetro. Antes del sellado de ambas bases, se colocó entre ellas una tira de papel filtro Whatman N°1 embebido en una solución de ácido pícrico-carbonato (2.5 g de ácido pícrico, 12.5 g de carbonato de sodio por 1 litro de agua destilada) secado en oscuridad. Las bases de las placas se sellaron con Parafilm® e incubaron a 28 ± 1°C por 4 días, observando el desarrollo cada 24 horas. El viraje en el papel filtro, de amarillo a naranja-marrón fue considerado como positivo a la producción de HCN. La producción de amoníaco por las cepas endófitas fue detectada por el método de placa dividida descrito por Raza *et al.*, (2016), con algunas modificaciones: 50 µL de cada suspensión bacteriana (1.5 x 10<sup>8</sup> UFC/mL) fue inoculado en una mitad de la placa petri con AN. En la otro mitad de la placa Petri con medio PDA y azul de bromotimol (0.02 g/L) se inoculó 80 µL de una suspensión de esporas de *Fusarium verticillioides* (1.6 x10<sup>6</sup> esp/mL) en un pozo central

de 6 mm de diámetro. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 72 horas. La producción de amoníaco fue observada mediante el viraje del medio.

## **5.1 Procesamiento de los datos**

### **5.1.1 Recolección**

Los datos recopilados durante el transcurso y al final de cada experimento, fueron transcritos en la bitácora de laboratorio y se construyeron tablas Excel elaborando una base de datos para su procesamiento y análisis.

### **5.1.2 Elaboración**

Se elaboraron cuadros, tablas, figuras a partir de los datos recolectados en cada experimento realizado durante la investigación, se emplearon los programas estadísticos GraphPad prisma versión 7®, Minitab 17® y Microsoft office Excel 2016.

### **5.1.3 Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se expresaron como la media y la desviación estándar (media  $\pm$  desviación estándar) para al menos tres réplicas de cada experimento. Los resultados fueron analizados empleando ANOVA unidireccional y su significancia ( $p \leq 0.05$ ) fue determinada mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey, utilizando Microsoft Excel 2016 y Minitab 17®. Las diferencias intergrupales se consideraron estadísticamente significativas cuando  $p \leq 0.05$  y altamente significativas cuando  $p \leq 0.001$ .

## **6. Resultados y discusión**

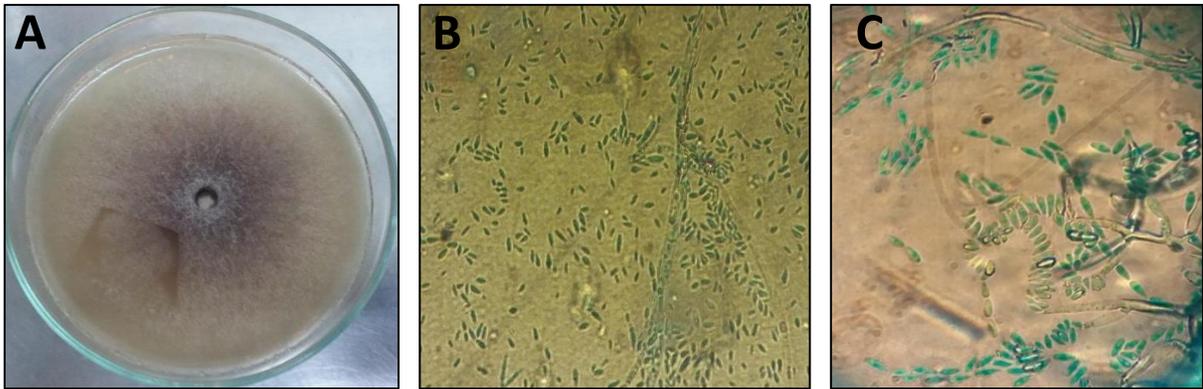
### **6.1 Características de *Fusarium verticillioides***

*Fusarium verticillioides* es un hongo de distribución global, se encuentra principalmente en zonas de clima templado a clima subtropical y tropical, y con menor frecuencia en zonas de temperatura fría (Hernández, 2014). Este microorganismo habita el suelo causando la pudrición de raíces, hojas, frutos y semillas de diversos cultivos. Se ha reportado que cuando *Fusarium verticillioides* está asociado al maíz, puede ser aislado de cualquier órgano de la planta (Rodríguez & Flores, 2018). Sin embargo, también se ha descrito su infección en otros cereales como el trigo, la cebada, trigo, arroz, avena, sorgo (Marín, 2010) e inclusive en

banana (Moretti *et al.*, 2004) y mango (Marasas, Ploetz, Wingfield, Wingfield, & Steenkamp, 2006; Mamani, 2017).

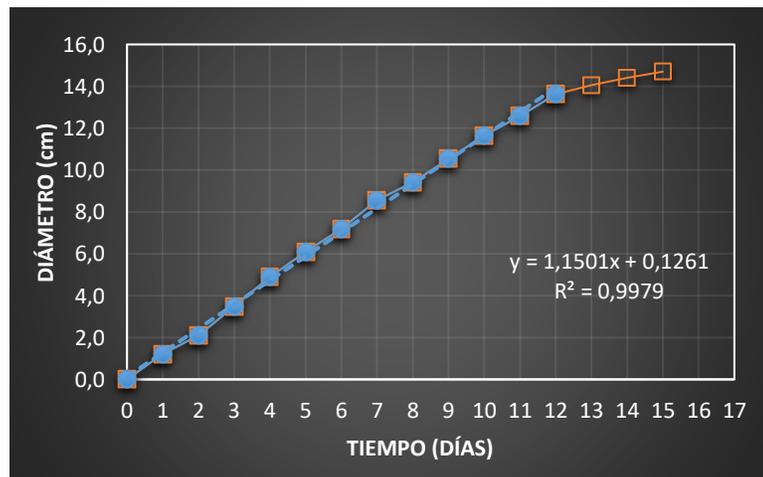
*Fusarium verticillioides* es un patógeno necrótrofo por su capacidad de causar la muerte del tejido hospedero y sobrevive como saprofito en el rastrojo. Además, durante los periodos tempranos de la infección, el hongo adquiere una fase biotrofa, al grado que puede sobrevivir como endófito en la semilla y en el tallo de las plantas sin causar daño visible, e infecta los tejidos de la planta cuando las condiciones ambientales son favorables (De la Torre, Galeana, & Plasencia, 2014). Asimismo, *Fusarium verticillioides* produce micotoxinas, entre ellas las fumonisinas, que contaminan el maíz y son responsables de enfermedades en humanos y animales. Se ha descrito que el consumo de alimentos derivados del maíz que están contaminados con micotoxinas ocasiona distintos tipos de enfermedades como cáncer de esófago en humanos, síndrome de edema pulmonar en cerdos, cáncer de hígado en ratas, leucoencefalomalacia equina, entre otros (Cavaglieri, Passone, & Etcheverry, 2004; Nayaka, *et al.*, 2010).

El fitopatógeno *Fusarium verticillioides* empleado en la presente investigación fue aislado e identificado por Mamani, (2017) a partir de hojas y frutos de mango infectados, y los resultados obtenidos al evaluar los postulados de Koch revelaron que *Fusarium verticillioides* es el causante de la enfermedad escoba de bruja en cultivos de mango. En la presente investigación, se empleó *Fusarium verticillioides* como microorganismo fitopatógeno de estudio. La morfología macroscópica de *Fusarium verticillioides* en cultivo axénico varía de acuerdo al medio y condiciones de cultivo, en medio PDA desarrolla un crecimiento radial y de aspecto ligeramente algodonoso, su micelio es blanco, al inicio, y forma pigmentos que van desde gris hasta violeta (Fig. 4A). La principal característica microscópica observada, fue la formación de microconidias ovaladas (Fig. 4B) y agrupadas en cadena, en algunas microconidias se observó al menos un septo (Fig. 4C). De la Torre Sánchez, Galeana, & Plasencia, (2014) reportaron que algunas cepas de *Fusarium verticillioides* también generan macroconidias solas o en cadena con apariencia larga y delgada con cinco o seis septos (Solano, De León, Valdovinos, Silva, & Soto, 2011), sin embargo, esta característica no fue observada en el presente estudio.



**Figura 4.** *Fusarium verticillioides*. **A.** Cultivo de *Fusarium verticillioides* en agar papa-dextrosa. **B.** Microconidias de *Fusarium verticillioides* con una magnificación de 400X y **C.** Microconidias de *Fusarium verticillioides* en cadena con una magnificación de 1000X.

Una vez determinadas las características macro y microscópicas de *Fusarium verticillioides*, se evaluó su cinética de crecimiento en medio PDA, se realizó mediciones del diámetro crecimiento cada 24 horas. En la Figura 5, se muestra el comportamiento cinético de *Fusarium verticillioides*, la fase de adaptación no se encuentra definida porque existe crecimiento a partir del primer día iniciando la fase de crecimiento hasta los 12 días de incubación, con una velocidad de crecimiento de 1,2 cm por día. Los datos obtenidos fueron útiles para posteriores evaluaciones de la actividad inhibitoria de las bacterias seleccionadas contra *Fusarium verticillioides* en un cultivo de 7 días, donde el fitopatógeno se encuentra en la fase media de crecimiento, y a los 15 días, donde se encuentra en fase estacionaria.



**Figura 5.** Cinética de crecimiento de *Fusarium verticillioides* en PDA cultivado a una temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  por 15 días. —●— Fase de crecimiento, —□— Fase estacionaria.

## 6.2 Bacterias endófitas con actividad biocontroladora de *Fusarium verticillioides*

Para la selección de bacterias endófitas con efecto inhibitorio contra *Fusarium verticillioides*, se evaluaron 41 cepas bacterianas criopreservadas, provenientes del cepario del IIFB. Estos endófitos fueron aislados a partir de tejidos vegetales de Thola (*Parastrephya lepidophylla*) y Tarwi (*Lupinus mutabilis*), y se caracterizaron por su capacidad fijadora de nitrógeno atmosférico (Vásquez, 2018). Durante la activación de las 41 cepas bacterianas, y al realizar el control de axenidad, se pudo observar que algunos de los cultivos estaban constituidos por más de un microorganismo, características reveladas por las diferencias en su morfología macroscópica. Por ello, se realizó el aislamiento de cada morfotipo proveniente de los 41 criopreservados. Este aislamiento, reveló la presencia de 69 cepas de bacterias endófitas. Las características macro y microscópicas de cada morfotipo se describen en la Tabla 1. El estudio de las características macroscópicas reveló colonias definidas, irregulares o filamentosas, con tamaño variado, de borde entero, ondulado o filamentosos, y de color blanquecino, crema, beige o translucido. Asimismo, la caracterización microscópica de los 69 aislados reveló 57 bacilos Gram-negativos, 2 bacilos Gram-positivos, 7 cocobacilos Gram-negativos y 3 cocos Gram-positivos (Tabla 1).

Las bacterias endófitas colonizan tejidos vegetales, sin dañar al hospedero. Sin embargo, confieren protección contra patógenos por inducción de mecanismos de defensa en las plantas (Reinhold, 2011). Se ha reportado una gran variedad de bacterias endófitas aisladas de tejidos vegetales, siendo los géneros más predominantes: *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Microbacterium*, y otros (Santoyo, Moreno, Orozco, & Bernard, 2015). Sin embargo, estos microorganismos también son comunes en la rizósfera y varios estudios reportan que las bacterias rizosféricas pueden colonizar los tejidos internos de las plantas y por lo tanto muchas bacterias endófitas podrían provenir de la rizósfera (Marquez, Hernandez, Orozco, Velazquez, & Santoyo, 2010). Existen varios estudios del potencial de bacterias endófitas que revelan su actividad inhibitoria contra un amplio espectro de patógenos de plantas, entre ellos microorganismos Gram-negativos, principalmente del género *Pseudomonas* y Gram-positivos pertenecientes al género *Bacillus*, los cuales son frecuentemente aislados por su actividad antagonista (Mohammed & Ravishankar, 2015).

Adicionalmente, se evaluó las características morfológicas de *Pseudomonas rhizosphaerae*, aislada de tejido vegetal de Thola (Mamani, 2018; Vasquez, 2018) empleada como cepa bacteriana control en el presente estudio. *Pseudomonas rhizosphaerae* es un bacilo Gram-negativo, que cultivado en AN presenta colonias de forma definida, convexa, de borde entero y de color beige. Características morfológicas similares fueron descritas para *Pseudomonas rhizosphaerae* aislada de suelo rizosférico de gramíneas, se ha reportado que este microorganismo solubiliza activamente fosfatos *in vitro* y constituye una nueva especie del género *Pseudomonas* desde el año 2003 (Peix *et al.*, 2003).

**Tabla 1.** Características morfológicas de Bacterias endófitas y su efecto inhibitorio contra *Fusarium verticillioides*.

CEPA	CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS					CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN (%)
	Tamaño*	Forma	Borde	Elevación	Color		
<i>P. rhizosphaerae</i>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Beige	Bacilos G (-)	52
C-20 ñ2Th	Mediano	Irregular	Ondulado	Convexa	Blanquecina	Bacilos G (-)	71
C-22 h2-3Tw	Mediano	Irregular	Ondulado	Convexa	Blanquecina	Bacilos G (-)	56
C-31 H2Tw	Mediano	Irregular	Ondulado	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	53
C-24 π2Tw	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Translucida	Bacilos G (-)	50
C-23 π1Tw	Mediano	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Blanquecina	Bacilos G (-)	47
C-25 π3Tw	Pequeño	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Cocobacilos G (-)	47
C-29 μ2Th	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	46
C-32 γTh	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	45
C-34 θTw	Grande	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	43
C-60 C2Th	Mediano	Irregular	Ondulado	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	42
C-30 H1Tw	Pequeño	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Cocos G (+)	41
C-6 A2Th	Pequeño	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G (-)	41
C-8 B2Th	Mediano	Irregular	Ondulado	Plana	Blanquecina	Bacilos G (-)	41
C-36 3-2Th	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	39
C-33 εTw	Grande	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	38
C-63 F1 Tw	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Beige	Bacilos G(-)	37
C-1 nTh	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Crema	Bacilos G (-)	36
C-62 K2 Tw	Mediano	Irregular	Ondulado	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	36
C-50 1-2Th	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Crema	Cocobacilos G (-)	35
C-61 K1 Tw	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Crema	Bacilos G(-)	32
C-15 Sg1Tw	Pequeño	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G (+)	31
C-17 t1Th	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Beige	Bacilos G (-)	31
C-26 j1Th	Pequeño	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Cocos G (+)	31
C-35 3-1Th	Mediano	Irregular	Ondulado	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	31
C-68 E2Th	Grande	Irregular	Ondulado	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	31

<b>C-2 r1Th</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Beige	Cocobacilos G (-)	30
<b>C-67 E1Th</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Beige	Bacilos G(-)	30
<b>C-9 λTw</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G (-)	28
<b>C-19 ñ1Th</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Beige	Bacilos G (-)	28
<b>C-59 C1Th</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Beige	Bacilos G(-)	28
<b>C-70 K<sub>a</sub>2Tw</b>	Mediano	Irregular	Ondulado	Plana	Translucida	Bacilos G(-)	28
<b>C-49 1-1Th</b>	Mediano	Irregular	Ondulado	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	27
<b>C-55 OTh</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	27
<b>C-10 MTh</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G (-)	26
<b>C-5 A1 Th</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Beige	Cocobacilos G (-)	25
<b>C-56 qTw</b>	Mediano	Irregular	Ondulado	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	25
<b>C-65 N1Th</b>	Mediano	Irregular	Ondulado	Plana	Translucida	Bacilos G(-)	25
<b>C-45 β2Th</b>	Mediano	Irregular	Ondulado	Convexa	Translucida	Bacilos G(-)	24
<b>C-66 N2Th</b>	Pequeño	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Cocobacilos G (-)	24
<b>C-13 J1Tw</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Beige	Bacilos G (-)	21
<b>C-57 pTw</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Translucida	Bacilos G(-)	21
<b>C-58 ITw</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(+)	21
<b>C-12 L2Tw</b>	Grande	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Blanquecina	Bacilos G (-)	20
<b>C-16 S<sub>g</sub>2Tw</b>	Grande	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	20
<b>C-18 t2Th</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G (-)	20
<b>C-54 oTw</b>	Pequeño	Definida	Entero	Convexa	Translucida	Bacilos G(-)	20
<b>C-14 J2Tw</b>	Mediano	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Blanquecina	Bacilos G (-)	18
<b>C-64 F2Tw</b>	Mediano	Irregular	Ondulado	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	16
<b>C-11 L1Tw</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Beige	Bacilos G (-)	16
<b>C-51 1-3Th</b>	Mediano	Irregular	Ondulado	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	15
<b>C-46 β3Th</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	14
<b>C-69 K<sub>a</sub>1Tw</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	13
<b>C-21 h2-2Tw</b>	Grande	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Blanquecina	Bacilos G (-)	14
<b>C-47 S1Tw</b>	Mediano	Irregular	Ondulado	Convexa	Crema	Bacilos G(-)	9
<b>C-43 2-2Th</b>	Mediano	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	3
<b>C-3 r2Th</b>	Mediano	Irregular	Ondulado	Plana	Blanquecina	Bacilos G (-)	0
<b>C-4 r3Th</b>	Grande	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G (-)	0
<b>C-7 B1Th</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Beige	Cocobacilos G (-)	0
<b>C-27 j2Th</b>	Mediano	Irregular	Ondulado	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	0
<b>C-37rhoTw</b>	Pequeño	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Cocobacilos G (-)	0
<b>C-38 jTw</b>	Mediano	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	0
<b>C-39 ethaTw</b>	Mediano	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	0
<b>C-40 5Th</b>	Pequeño	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Cocos G (+)	0
<b>C-41 δTh</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	0
<b>C-42 2-1Th</b>	Mediano	Irregular	Ondulado	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	0
<b>C-44 β1Th</b>	Grande	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	0
<b>C-48 S2Tw</b>	Mediano	Irregular	Ondulado	Convexa	Blanquecina	Bacilos G(-)	0
<b>C-52 4-1Th</b>	Mediano	Definida	Entero	Convexa	Translucida	Bacilos G(-)	0

C-53 4-2Th	Mediano	Filamentosa	Filamentosa	Plana	Blanquecina	Bacilos G(-)	0
** <i>Fusarium verticillioides</i>		Crecimiento radial y de aspecto ligeramente algodonoso de color blanco a gris, con microconidias ovaladas.					-

\*Tamaño: grande: 3mm, mediano: 2mm y pequeño:0.5-1mm hasta las 48 horas de incubación en AN.

\*\* Control negativo de *Fusarium verticillioides*

**Nota:** Las cepas de bacterias endófitas fueron crecidas en AN, para su posterior caracterización y la actividad inhibitoria fue determinada por enfrentamiento dual en placa (detallado en Sección 5.3.5). Tw (Tarwi) y Th (Thola) refieren a la procedencia de la cepa bacteriana.

Fuente: Elaboración propia.

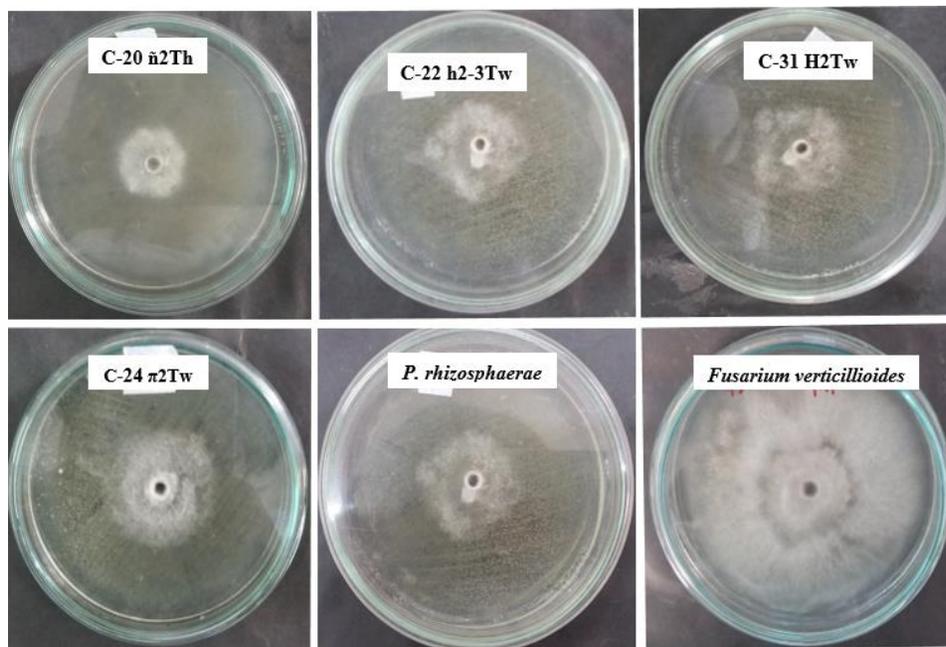
### 6.2.1 Efecto inhibitorio directo de bacterias endófitas frente a *Fusarium verticillioides*

En la actualidad, la contaminación por el uso indiscriminado de agroquímicos para la protección de cultivos ha reducido la biodiversidad en los agroecosistemas, lo cual se manifiesta en la incidencia de plagas y enfermedades en los cultivos (Chebotar *et al.*, 2015). Este y los problemas de seguridad y salud pública inherentes a la fabricación y uso de agroquímicos han conducido a la búsqueda y establecimiento de alternativas amigables para el manejo de plagas y enfermedades. Entre estas alternativas, las bacterias endófitas se destacan por ser ubicuas en los tejidos vegetales terrestres (Harish *et al.*, 2008) y son estudiadas porque pueden influir directa o indirectamente en el desarrollo de las plantas que colonizan (Zarrin *et al.*, 2009). Recientemente, se ha propuesto su utilización en el control de enfermedades en la agricultura moderna (Alviz, Pérez, & Pérez, 2017).

Muchos estudios emplean ensayos de cultivo dual, inhibición directa, especialmente para la búsqueda de microorganismos antagonistas de patógenos fúngicos que afectan cultivos agrícolas (Samsudin & Magan, 2016). La técnica de enfrentamiento dual es empleada para evaluar el efecto inhibitorio de microorganismos frente a fitopatógenos fúngicos. En el presente estudio, a través de esta técnica se evaluó la inhibición directa del antagonista (bacterias endófitas) sobre el patógeno (*Fusarium verticillioides*) de una manera sencilla y rápida. Los resultados de la evaluación de un total de 69 cepas endófitas, durante un tiempo de 7 días de co-incubación con el patógeno, revelaron diferentes niveles de inhibición (Tabla 1). Del total de cepas bacterianas endófitas evaluadas, solo cuatro (C-20 ñ2Th aislado de Thola y C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw aislados de tarwi) presentaron porcentajes de inhibición moderados contra *Fusarium verticillioides* en el rango de 50-71% (Tabla 1, Fig. 6). Adicionalmente, la cepa control *Pseudomonas rhizosphaerae* presentó un porcentaje de inhibición moderado del 52% (Tabla 1, Fig. 6). Otras cepas endófitas aisladas, revelaron una

actividad inhibitoria baja, en el rango de 30-47%, leve de 10-28% e inexistente de 0-9%, en comparación al control negativo de *Fusarium verticillioides*, donde no existió alteración en su crecimiento normal (Tabla 1). Sobre la base de los resultados obtenidos de los ensayos de enfrentamiento dual, se seleccionaron 4 cepas bacterianas endófitas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw, por su actividad inhibitoria frente a *Fusarium verticillioides* en función al porcentaje de inhibición igual o mayor al 50%, las cuales se caracterizaron por su potencial como antagonistas de este patógeno.

El potencial biocontrolador de las bacterias endófitas se basa en la amplia gama de mecanismos de defensa producidos por estos microorganismos. La inhibición del antagonista sobre el patógeno, por interacción directa, puede deberse a mecanismos como la competencia por nutrientes del medio en el que se encuentran, el parasitismo, donde existe una simbiosis entre organismos filogenéticamente no relacionados que coexisten durante un periodo de tiempo, ambos conduciendo a un crecimiento, actividad y/o fecundidad disminuidos entre los organismos que interactúan (Krishna & McSpadden, 2006).



**Figura 6.** Efecto inhibitorio de C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) contra el crecimiento de *Fusarium verticillioides* por interacción directa antagonista-fitopatógeno.

Desde una perspectiva microbiana, los suelos y las superficies vivas de las plantas son con frecuencia entornos con nutrientes limitados. Para colonizar con éxito la fitósfera, un

microorganismo debe competir efectivamente con el patógeno por los nutrientes disponibles que incluyen exudados, lixiviados o tejido senescente. Estos antagonistas también pueden secretar al medio diversos metabolitos que actúan sobre los fitopatógenos fúngicos, en los que se afecta la germinación de esporas y/o la elongación y crecimiento de hifas (Chang, Hsieh, Hsieh, & Chen, 2009). Algunos estudios han coincidido que la frecuencia de microorganismos antagonistas en el suelo y tejidos vegetales, puede estar asociada a diferentes factores como la incidencia del patógeno en el campo, el tipo de suelo, factores climatológicos, la salud y el genotipo de la planta sembrada, entre otros (Noriega, Hernández, Acebo, & Luis, 2016).

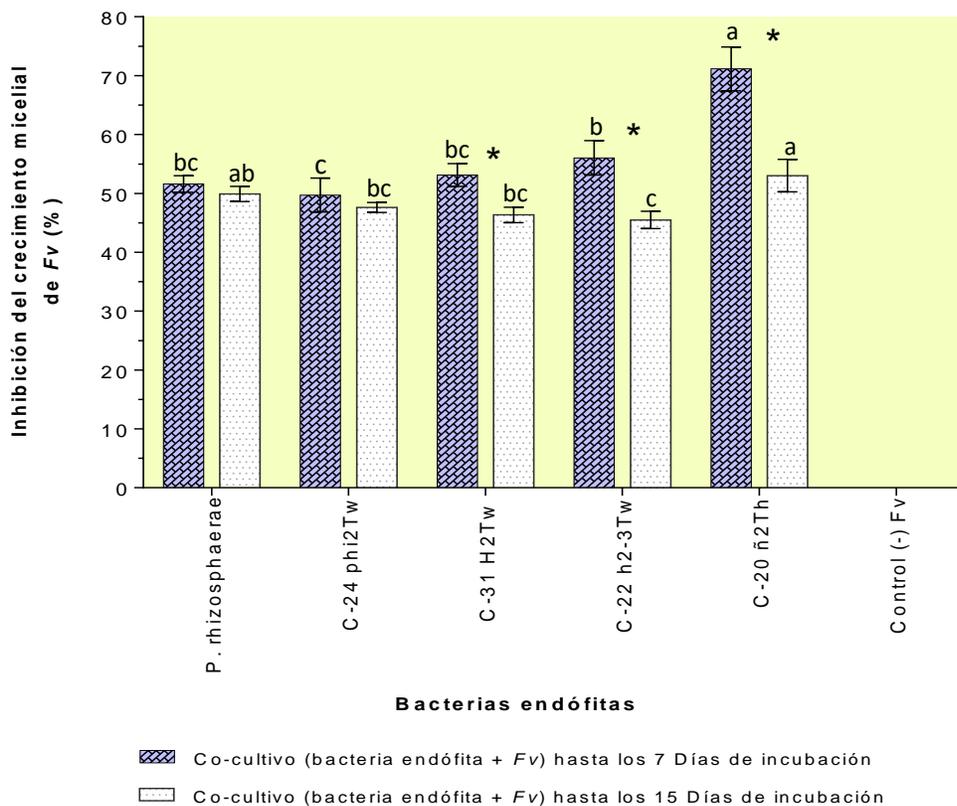
En el presente estudio, las cepas seleccionadas: C-20  $\eta$ 2Th, C-22 h2-3Tw, C-24  $\pi$ 2Tw, C-31 H2Tw, *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) presentaron los mayores porcentajes de inhibición en el ensayo de enfrentamiento dual en placa entre el 50-71%, durante 7 días de co-incubación con *Fusarium verticillioides*. Para evaluar la actividad antagónica entre las cepas seleccionadas, en función al porcentaje de inhibición contra *Fusarium verticillioides*, se realizó un análisis de comparación entre ellas, empleando el test de Tukey. Los resultados del análisis revelaron que no existe diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición (b, c o bc) de las cepas C-22 h2-3Tw, C-24  $\pi$ 2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae*, sin embargo, el porcentaje de inhibición de la cepa C-20  $\eta$ 2Th difiere significativamente del resto (a), presentando un mayor porcentaje de inhibición contra el patógeno (Fig. 7). Otras investigaciones han reportado porcentajes de inhibición similares a los obtenidos en este estudio, por ejemplo, *Pseudomonas putida* inhibe el crecimiento de *Fusarium verticillioides* en un 67% y *Pseudomonas fluorescens* en un 47%, ambos porcentajes determinados por la técnica de enfrentamiento dual desarrollada durante 7 días de co-incubación (Figuerola *et al.*, 2016). Asimismo, Cavaglieri, Orlando, Rodríguez, Chulze, & Etcheverry, (2005) evidenciaron el efecto inhibitorio del género *Bacillus*, aislado del rizoplaneo de maíz, contra *Fusarium verticillioides*, con una antibiosis variable entre 28 y 78% evaluada durante 7 días de co-incubación, resaltando la capacidad de *Bacillus subtilis* para inhibir la colonización de raíces del maíz por *Fusarium verticillioides* y de esta manera prevenir su transmisión. *Bacillus mojavenensis* también inhibió el crecimiento micelial de *Fusarium verticillioides*; este microorganismo causó agrandamiento e hinchamiento de las hifas, dañando la matriz celular y membranas de hifas y conidias (Snook, Mitchell, Hinton, & Bacon, 2009). Asimismo, se demostró que *Pseudomonas sp.* y *Burkholderia sp.* fueron capaces de inhibir el crecimiento de

*Curvularia sp.*, *Fusarium sp.*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria alternata*, fitopatógenos de los cultivos de maíz y arroz (Trujillo, Díaz, Hernández, & Heydrich, 2007).

Los estudios referentes a la actividad de microorganismos antagonistas, como *Pseudomonas* y *Bacillus* comprenden un periodo de evaluación corto entre 4 a 7 días de enfrentamiento dual. Sin embargo, existen estudios que reportan la capacidad de recuperación de *Fusarium verticillioides* después de un estado de inhibición. En este sentido, el presente estudio evaluó además el efecto antagonista de las cepas endófitas seleccionadas por un tiempo prolongado, hasta los 15 días de co-incubación antagonista-patógeno. Los resultados obtenidos como se muestra en la Fig. 7, revelan una alta reducción significativa en los porcentajes de inhibición de *Fusarium verticillioides* ( $p \leq 0.001$ , análisis ANOVA), de 71-53% evaluado a los 7 días a 53-46% hasta los 15 días, efecto causado por las cepas C-20  $\pi$ 2Th, C-22 h2-3Tw y C-31 H2Tw, lo cual demuestra la capacidad de recuperación de *Fusarium verticillioides* ante el efecto antagonista de las bacterias endófitas descritas. Por otro lado, el porcentaje de inhibición moderado de *Fusarium verticillioides* obtenido con la cepa C-24  $\pi$ 2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae*, de 52-50% (7 días) no se redujo significativamente, manteniéndose entre 50-48% a los 15 días de co-incubación, resaltando el elevado potencial de estas cepas como antagonista de este patógeno ( $p > 0.05$ , análisis ANOVA). Un estudio similar fue reportado por Rojas, Sánchez, Rosales, & Lugo, (2017) quienes evaluaron el efecto inhibitorio de cepas bacterianas correspondientes al género *Bacillus* contra *Fusarium verticillioides* y *Fusarium oxysporum* por enfrentamiento dual, los ensayos revelaron que los porcentajes de inhibición se mantuvieron por encima del 50-80% a los 7 y 15 días de co-incubación.

La reducción observada en el porcentaje de inhibición al evaluar las cepas C-20  $\pi$ 2Th, C-22 h2-3Tw y C-31 H2Tw puede explicarse debido a que los hongos filamentosos, como *Fusarium sp.*, son inhibidos temporalmente, pero en un cultivo prolongado, superan las condiciones de inhibición, porque secretan metabolitos, entre ellos, enzimas hidrolíticas que clivan compuestos macromoleculares complejos y los utilizan para su crecimiento prolongando su fase estacionaria (Figueroa, 2006). Se ha reportado que el género *Fusarium* secreta enzimas entre ellas, amilasas, celulasas, pectinasas, proteasas, lipasas entre otras, para facilitar la invasión degradando barreras de protección y compuestos intracelulares de diferentes hospederos (Valencia *et al.*, 2011; Forero, 2015). Otra hipótesis para explicar la

reducción de la actividad inhibitoria en el tiempo, radica en la producción de metabolitos secundarios, por hongos fitopatógenos como *Fusarium verticillioides*, que limitan la actividad metabólica de microorganismos, plantas y animales. Se ha reportado que *Fusarium verticillioides* y otras especies, producen ácido fusárico inhibiendo cepas antagonistas, como *Bacillus mojavensis*. En concentraciones bajas de ácido fusárico (aprox. 2  $\mu\text{mol/L}$ ) se reduce la población *Bacillus mojavensis* en un 41%, así mismo concentraciones elevadas de ácido fusárico (aprox. 223  $\mu\text{mol/L}$ ) son tóxicas para *Bacillus mojavensis*. Además, la producción de ácido fusárico por *Fusarium oxysporum* altera la actividad biocontroladora de *Pseudomonas fluorescens* interfiriendo en la expresión del gen que induce la producción de 2,4-diacetilfloroglucinol (Bacon, Hinton, Glenn, & Kulda, 2004). Sin embargo, la producción de metabolitos secundarios por parte de *Fusarium verticillioides* no fue estudiada en la presente investigación.



**Figura 7.** Efecto inhibitorio de *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control), C-24  $\pi$ 2Tw, C-31 H2Tw, C-22 h2-3Tw y C-20 ñ2Th frente a *Fusarium verticillioides* (Fv) a los 7 y 15 días de co-cultivo. Las barras representan las medias y la desviación estándar de cuatro replicas. Letras no comunes indican diferencias significativas para el test Tukey ( $p < 0,05$ ). \*: Reducción de la actividad inhibitoria del antagonista contra el patógeno hasta los 15 días de evaluación ( $p \leq 0,001$ ).

Existen diversos géneros de bacterias, descritos por su capacidad inhibitoria contra hongos fitopatógenos, por ejemplo, se ha reportado la actividad antagonica de bacterias epífitas como *Pseudomonas lurida*, *Pseudomonas rhizosphaerae*, *Pseudomonas parafulva* y *Bacillus megaterium* capaces de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea*, agente causal de la podredumbre gris de una amplia gama de cultivos, entre ellos frutas y verduras (Abanda, Krimm, Schreiber, & Schwab, 2006). Asimismo, se ha reportado actividad inhibitoria del género *Pseudomonas* contra *Fusarium verticillioides*, Chandra *et al.*, (2008) evaluaron semillas de maíz infectadas con *Fusarium verticillioides* y tratadas con *Pseudomonas fluorescens*, reduciendo la incidencia de *Fusarium verticillioides*, y promoviendo la germinación de semillas, reportando resultados similares con sorgo y arroz. Otros trabajos, emplearon *Pseudomonas fluorescens* que controló significativamente la enfermedad de la pudrición de la mazorca causada por *Fusarium verticillioides*, reduciendo el nivel de fumonisinas y mejorando el rendimiento del grano (Samsudin & Magan, 2016).

Diversos estudios han demostrado la factibilidad de aplicar especies microbianas, para el control biológico de plagas y enfermedades, entre ellas *Fusarium verticillioides*. El control biológico surge como una alternativa al uso de fungicidas químicos para cultivos en campo y poscosecha, y comprende en la actualidad, el uso de cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* y hongos como *Ampelomyces*, *Candida*, *Coniothyrium* y *Trichoderma* (McSpadden & Fravel, 2002), que son eficaces en el control directo de las enfermedades fúngicas en plantas. Sin embargo, la aplicación directa de estos microorganismos en los cultivos y su éxito, estan limitados por distintos factores como ser el clima, sincronización, especie, diferentes preferencias de hábitat, tipo de cultivo, carencia de hospederos alternativos, baja tasa de reproducción, cantidad de microorganismos liberados, patrón de colonización, depredación, disponibilidad de nutrientes entre otros, que hacen que la efectividad de estos enemigos naturales disminuya (Salas & Salazar, 2003; Alviz, Pérez, & Pérez, 2017). Por otro lado, el uso directo de estos agentes biológicos puede determinar desequilibrios en la biodiversidad de los suelos, y se ha reportado que las especies microbianas introducidas, pueden actuar como microorganismos oportunistas en las plantas. De igual manera, se desconoce si estos agentes biológicos, en desequilibrio, podrían causar efectos toxicos en el medio ambiente y el ser humano. Es así que una alternativa al uso directo de estos agentes, es el empleo de derivados de cultivos microbianos es decir productos

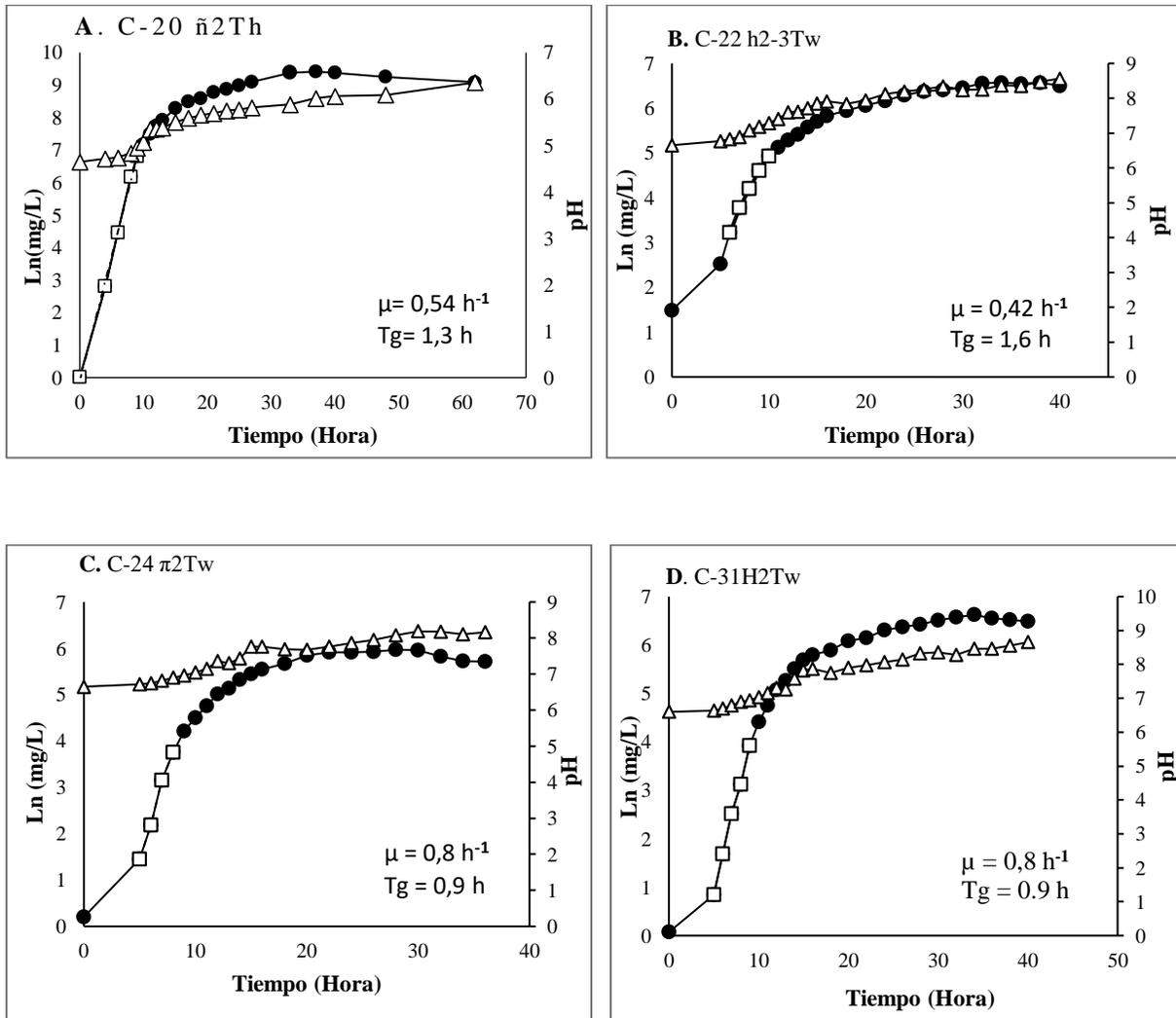
celulares, como metabolitos con actividad inhibitoria contra fitopatógenos. Estos productos no afectan el medio ambiente ya que al ser de origen biológico, son biodegradables. Se ha demostrado que metabolitos de origen vegetal, fúngico e inclusive bacteriano (Cerqueira, Barcellos, Bueno, Aires, & Dummer, 2016) son potenciales de utilizar en el control de patógenos que afectan cultivos agrícolas (Wilson, Solar, El Ghaouth, & Wisniewski, 1997).

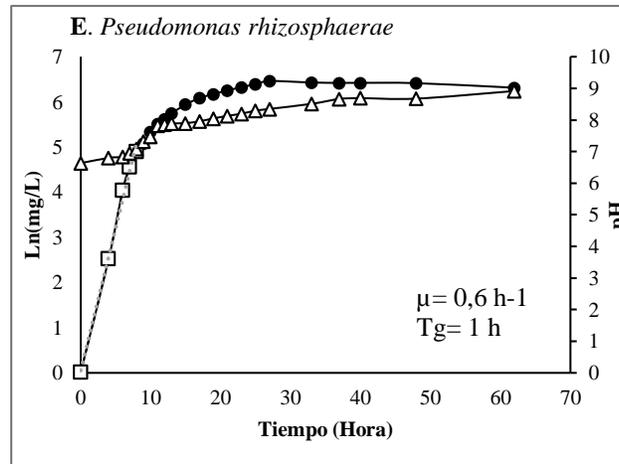
Debido a las desventajas descritas anteriormente, respecto a la aplicación directa de microorganismos para el control de fitopatógenos, el presente trabajo de investigación evaluó la actividad inhibitoria de metabolitos producidos por las bacterias endófitas seleccionadas: C-20  $\beta$ 2Th, C-22 h2-3Tw, C-24  $\pi$ 2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control), para ello se evaluaron sus parámetros cinéticos de crecimiento y metabolitos con actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides*, cuyos resultados son discutidos en las siguientes secciones.

### 6.2.2 Parámetros cinéticos de crecimiento de bacterias endófitas seleccionadas

Las bacterias endófitas C-20  $\beta$ 2Th, C-22 h2-3Tw, C-24  $\pi$ 2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) seleccionadas por su actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides* (sección 6.2.1), fueron evaluadas en función a su cinética de crecimiento y variación de pH en medio líquido. Para determinar los parámetros cinéticos de crecimiento se correlacionó la densidad óptica a 600 nm ( $OD_{600}$ ) con el de peso seco (g/L), utilizando la regla de oro que indica que 1 unidad  $OD_{600}$  corresponde a  $\approx 0,5$  g de peso seco por litro (Milo & Phillips, 2010). En la Figura 8A, se muestra el comportamiento cinético de C-20  $\beta$ 2Th donde la fase de crecimiento exponencial de un cultivo activo se desarrolla hasta las 9 horas con una velocidad de crecimiento de  $0.54 \text{ h}^{-1}$  y un tiempo de generación de 1.3 h, entrando a la fase de desaceleración del crecimiento hasta las 27 horas, donde se alcanza la fase estacionaria, concomitante al incremento de pH de 6.6 a 9.1. Un comportamiento similar, fue observado para la cepa C-22 h2-3Tw, con una fase exponencial hasta las 10 horas de cultivo ( $\mu = 0.42 \text{ h}^{-1}$ ,  $T_g = 1.6 \text{ h}$ ), con desaceleración hasta 26 horas y posterior ingreso a fase estacionaria, incrementando el pH de 6.7 a 8.6, como se observa en la Fig. 8B. Por otro lado, las cepas C-24  $\pi$ 2Tw y C-31 H2Tw iniciaron la fase exponencial a las 5 horas hasta las 8-9 horas, entrando a desaceleración hasta las 20 horas de cultivo (Fig. 8C, 8D). Además, se registró un incremento de pH de 6.6 a 8.2 y 8.7, para C-24  $\pi$ 2Tw y C-31 H2Tw,

respectivamente. Ambas cepas, exhibieron velocidades de crecimiento de  $0.8 \text{ h}^{-1}$  y tiempos de generación de  $0.9 \text{ h}$  (Fig. 8C, 8D). La cepa control *Pseudomonas rhizosphaerae* alcanzó su fase exponencial hasta las 8 horas de cultivo ( $\mu=0.63 \text{ h}^{-1}$ ,  $T_g=1.1 \text{ h}$ ), entrando a la fase de desaceleración hasta las 23 horas, donde alcanza la fase estacionaria. Además, se registró un incremento de pH de 6.6 a 8.9 durante su crecimiento (Fig. 8E).





**Figura 8.** Cinética de crecimiento y variación de pH de **A.** C-20 ñ2Th, **B.** C-22 h2-3Tw, **C.** C-24 π2Tw, **D.** C-31 H2Tw y **E.** *Pseudomonas rhizosphaerae*, cultivadas en caldo nutritivo a una temperatura de  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  y 120 rpm.  $\mu$  (Velocidad de crecimiento), Tg (Tiempo de generación),  $\square$ — Fase exponencial (Ln (mg/L)),  $\bullet$ — Cinética de crecimiento (Ln (mg/L)) y  $\triangle$ — pH.

A pesar de que los parámetros de crecimiento bacteriano varían en función a diversos factores, condiciones y medio de cultivo, procedencia y viabilidad del inóculo, y características intrínsecas de cada microorganismo, entre otros. Se ha reportado por Guerra & Zúñiga, (2018) un tiempo de generación similar para *Pseudomonas sp.* de 0.9 h en medio LMC. Asimismo, Tortone & Lucchesi, (2005) describieron un tiempo de generación de 1.3 h para *Pseudomonas aeruginosa* en medio HPi-BSM con glucosa y cloruro de amonio. Sin embargo, en medio N3 *Pseudomonas aeruginosa* tuvo un crecimiento exponencial hasta las 11 horas antes de entrar a la fase estacionaria con un aumento de pH hasta 8.9 (Barraza, Bravo, & Pérez, 2017). Por otro lado, *Pseudomonas putida* presenta aproximadamente un tiempo de generación de 0.75 h a  $30^\circ\text{C}$  en medios complejos (Stanier, Wheelis, & Painter, 1996). Los resultados obtenidos en el presente trabajo tienen una similitud con lo reportado en anteriores estudios. Sin embargo, el empleo de medios de cultivos diferentes influye directamente en el crecimiento bacteriano y determina los parámetros cinéticos de crecimiento.

Por otro lado, al comparar los resultados obtenidos en el presente estudio se revela que las cepas C-20 ñ2Th y C-22 h2-3Tw presentan una cinética de crecimiento y características macro y microscópicas similares, colonias medianas, de forma definida, de borde ondulado, convexas y de color blanquecino; además, ambas cepas son bacilos Gram-negativos. Contrariamente, las cepas C-24 π2Tw y C-31 H2Tw a pesar de ser idénticas en cuanto a su cinética de crecimiento

difieren en sus características morfológicas macroscópicas, y no así en sus características microscópicas (Tabla 1, ANEXO 1). Además, la cepa control *Pseudomonas rhizosphaerae* presenta una cinética de crecimiento y características macroscópicas diferentes a las cepas seleccionadas, ya que se caracteriza por sus colonias de forma definida, convexa, de borde entero y de color beige. En ese sentido, las características descritas para las cepas seleccionadas por su actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides* presentan similitudes con el género *Pseudomonas* tanto macro y microscópicas, debido a que miembros del género *Pseudomonas* son bacilos Gram-negativos no formadores de esporas, otras características incluyen desde colonias incoloras a blanquecinas, crema o amarillas, entre las más comunes (UK Standards for Microbiology Investigations, 2015). Se ha reportado también que las especies de *Pseudomonas* son metabólicamente versátiles, capaces de utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos simples y complejos; además, generan una gran cantidad de metabolitos secundarios como ser: floroglucinoles, fenolinas, pirrolnitrina, lipopéptidos, HCN, sideroforos, entre otros que promueven su actividad antagónica (Haas & Keel, 2003).

### **6.3 Metabolitos solubles con actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides***

#### **6.3.1 Metabolitos solubles producidos por cultivo en estado líquido**

El desarrollo de la biotecnología a través de los cultivos en estado líquido (CEL), por la facilidad que proporciona este proceso en cuanto al manejo de variables, permite evaluar y optimizar cultivos microbianos para la producción de metabolitos, entre ellos enzimas líticas y metabolitos secundarios como: antibióticos, sideróforos, biosurfactantes, entre otros, con potencial antagónico contra el crecimiento de fitopatógenos (Compant, Clément, & Sessitsch, 2010). Este tipo de cultivo permite controlar parámetros de cultivo como: transferencia de oxígeno, temperatura y homogenización, adición de nutrientes, control de pH y otros; lo cual le confiere una ventaja frente a los cultivos en estado sólido (CES). Los CEL son fácilmente adaptables, rentables y se obtienen reproducibilidad en los resultados (Fazenda, Seviour, McNeil, & Harvey, 2008).

En la CEL el desarrollo del microorganismo se presenta de una forma cinética típica, dando origen a una fase de latencia, de crecimiento (fase logarítmica), de desaceleración, estacionaria y la última, de declinación. Se ha reportado que durante la fase estacionaria (idiofase) generalmente inicia el metabolismo secundario, debido a la limitación de nutrientes en el

medio de cultivo o la acumulación de productos del metabolismo generando una condición de estrés sobre el microorganismo cultivado, en este estado se producen los metabolitos secundarios, los cuales no son esenciales para el crecimiento, desarrollo o reproducción normal; pero cumplen un papel importante en funciones de supervivencia y la provisión de mecanismos de defensa (Vaishnav & Demain, 2011). La falta de nutrientes o situaciones de estrés, son condiciones favorables para la producción de metabolitos secundarios con efecto inhibitorio contra microorganismos competidores, de esta manera el productor de metabolitos secundarios asegura la disponibilidad de nutrientes para su supervivencia. Asimismo, la producción de metabolitos secundarios es aprovechada en la industria para la generación de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana, antibióticos, alcaloides, pigmentos, surfactantes, etc. (Ruiz *et al.*, 2010).

Por lo anteriormente descrito, en el presente estudio se evaluaron los parámetros cinéticos de crecimiento de las cepas C-20  $\Delta$ 2Th, C-22 h2-3Tw, C-24  $\pi$ 2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) (sección 6.2.2), y se consideró extender el tiempo del CEL, para evaluar la producción y actividad de metabolitos secundarios solubles producidos por los microorganismos atravesando idiofase (fase de desaceleración y estacionaria, posterior a las 18 horas de incubación). En ese sentido, muestras del cultivo de C-20  $\Delta$ 2Th, C-22 h2-3Tw, C-24  $\pi$ 2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae*, fueron colectadas desde las 18 hasta las 168 horas de cultivo, las mismas fueron centrifugadas y filtradas para la recuperación de filtrados crudos, exentos de biomasa bacteriana. Los filtrados crudos obtenidos en los tiempos de cultivo mencionados (18 – 168 h) fueron evaluados por su actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides*, mediante la técnica de vertido en placa, (descrita en la sección 5.3.7.3). *Fusarium verticillioides* fue sembrado en medio PDA conteniendo los filtrados crudos bacterianos (dilución 1:2) e incubado durante 15 días, debido a que se evidenció en un ensayo previo (técnica de enfrentamiento dual, sección 6.2.1) que *Fusarium verticillioides* es inhibido hasta los 7 días de co-incubación, pero supera o mantiene la inhibición en tiempos prolongados de cultivo.

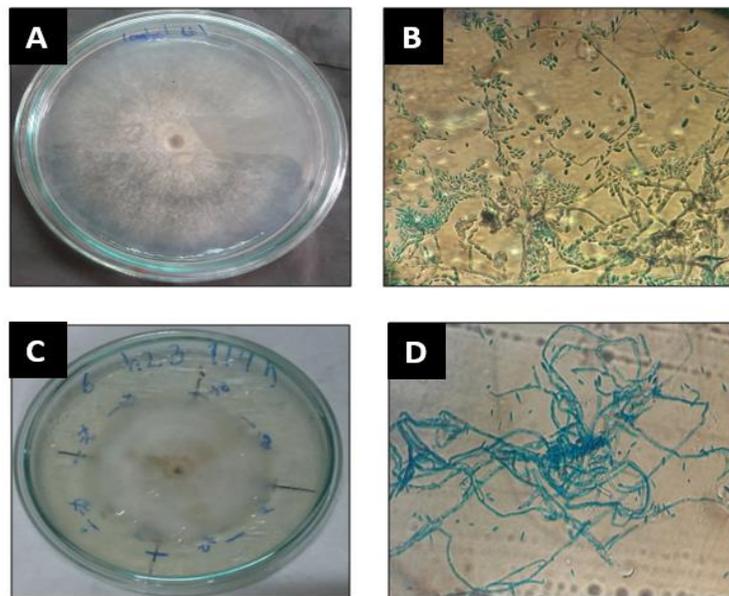
Los resultados obtenidos de la actividad inhibitoria de los filtrados crudos bacterianos producidos por las cepas seleccionadas y *Pseudomonas rhizosphaerae* evaluados frente a *Fusarium verticillioides* durante 7 días de incubación, revelaron porcentajes de inhibición

variables entre 20 y 47% en comparación al control negativo de *Fusarium verticillioides*, donde no existió alteración en su crecimiento normal ( $p < 0.001$ , Fig. 10). Este ensayo permitió evidenciar dos situaciones: *i*) los filtrados bacterianos obtenidos en la fase de desaceleración (entre las 18 a 36 horas) afectaron el crecimiento radial de *Fusarium verticillioides* entre el 20-28%. Por otro lado, *ii*) los filtrados bacterianos obtenidos en la fase estacionaria (48 a 168 horas), exhibieron mayores porcentajes de inhibición contra *Fusarium verticillioides*, entre el 26-47%. Estos resultados revelan que la presencia de metabolitos secundarios extracelulares presentes en los filtrados bacterianos, especialmente obtenidos en idiofase, conduce a la supresión del crecimiento fúngico.

Además, se pudo observar la alteración que producen los filtrados crudos bacterianos en la morfología macro- y microscópica de *Fusarium verticillioides* mediante microscopía óptica. Las principales alteraciones morfológicas revelaron disminución del crecimiento hifal y la germinación conidial en comparación al control negativo que alcanzó un crecimiento y esporulación normal (Fig. 9). Asimismo, se observaron cambios macroscópicos del crecimiento micelial del patógeno al estar expuesto a metabolitos secundarios, mostrando un aspecto algodonoso y de color blanco muy diferente al control negativo (sin tratamiento) que presentó un aspecto levemente algodonoso, y variable en color de blanco temporal a gris posteriormente (Fig. 9). A pesar de lo observado, no se pudo evidenciar distorsiones de hifas o esporas mediante microscopía óptica, sin embargo, para descartar esta observación sería necesario utilizar otras técnicas específicas como la microscopía electrónica de barrido.

En correspondencia con los resultados obtenidos, varios trabajos de investigación observaron fenómenos similares, por ejemplo, Wang, Yieh, & Shih, (1999) demostraron que el filtrado crudo de *Pseudomonas aeruginosa* K-187 inhibió el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme*, *Penicillium italicum* y *Aspergillus flavus* bloqueando la germinación de esporas e incrementando la hinchazón de las hifas. Borah, Goswami, Sarma, Cameotra, & Deka, (2016) indicaron que el biosurfactante Ramnolípido (RL-SS14), producido por *Pseudomonas aeruginosa* SS14 altera significativamente la morfología del micelio de *Fusarium verticillioides*, probablemente debido a la ruptura de la bicapa de fosfolípidos de membranas por la actividad surfactante de RL-SS14 conduciendo a la fuga de electrolitos, proteínas y ADN. En otro estudio, *Fusarium verticillioides* fue tratado con lipopéptidos

antimicrobianos (surfactan y fengicina) producidos por *Bacillus mojavensis*, una bacteria endófito del maíz, donde se observó inhibición del crecimiento filamentoso, distorsiones hifales, vacuolización y lisis (Blacutt, Mitchell, Bacon, & Gold, 2016). Sowanpreecha & Rerngsamran, (2018) observaron un crecimiento anormal del micelio y alargamiento de las hifas de *Phytophthora palmivora*, patógeno causante de la pudrición negra en las orquídeas, al ser tratada con proteínas antifúngicas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* RS1. Probablemente estas proteínas antifúngicas tienen acción durante el desarrollo de la hifas o la síntesis de la pared celular del patógeno. En conclusión, la estructura micelial de un hongo desempeña un papel fundamental en la reproducción y la progresión de la enfermedad, cualquier daño a la integridad del micelio podría afectar adversamente la patogenicidad del hongo (Borah, Goswami, Sarma, Cameotra, & Deka, 2016), como se observó en el presente estudio.



**Figura 9.** **A.** Crecimiento normal de *Fusarium verticillioides* en medio PDA. **C.** Inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* en medio PDA con el filtrado crudo bacteriano. Observación microscópica a 400X de *Fusarium verticillioides*, **(B)** sin y **(D)** con el filtrado crudo bacteriano.

En el presente estudio, se pudo evidenciar que el crecimiento hifal y la germinación conidial de *Fusarium verticillioides* fueron afectados debido a la acción de los filtrados crudos bacterianos, hasta los 7 días de incubación, repercutiendo en la imposibilidad de alcanzar la fase estacionaria de crecimiento. En un tiempo posterior, hasta los 15 días de incubación de *Fusarium verticillioides*, se evaluó la estabilidad de la actividad antifúngica de filtrados crudos bacterianos. Los resultados obtenidos (Fig. 10) revelaron que los filtrados crudos producidos

por las cepas en estudio y *Pseudomonas rhizosphaerae* obtenidos en idiofase tardía exhibieron un incremento en la reducción del crecimiento micelial de 24-47% (7 días) a 46-52% (15 días de incubación). Por otro lado, los filtrados crudos bacterianos obtenidos en idiofase temprana redujeron el crecimiento de *Fusarium verticillioides* de 20-28% (7 días) a 44-46% (15 días de incubación). En ese sentido, este estudio refleja que la actividad inhibitoria de los filtrados crudos bacterianos permaneció estable por un tiempo prolongado de 15 días de incubación, donde *Fusarium verticillioides* presentó alteraciones morfológicas en estructuras reproductivas.

Por otro lado, también se evaluó el tiempo de obtención del filtrado crudo bacteriano en función a su porcentaje de inhibición contra *Fusarium verticillioides*. Para ello, se empleó el análisis de comparación múltiple de Tukey, expresando diferencias significativas entre los distintos tiempos de obtención del filtrado crudo bacteriano ( $p < 0.001$ ). Se encontró que los filtrados crudos bacterianos recuperados en idiofase tardía poseen mayor actividad inhibitoria que aquellos obtenidos en idiofase temprana. En las Figuras 10A, B y D, se muestra que los filtrados crudos de las cepas C-20 ñ2Th, C-31 H2Tw y C-22 h2-3Tw, obtenidos a partir de las 72 horas exhibieron mayores porcentajes de inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides*, entre 30-43% (7 días) y 45-50% (15 días) expresados en la agrupación *a* y *ab* (test de Tukey).

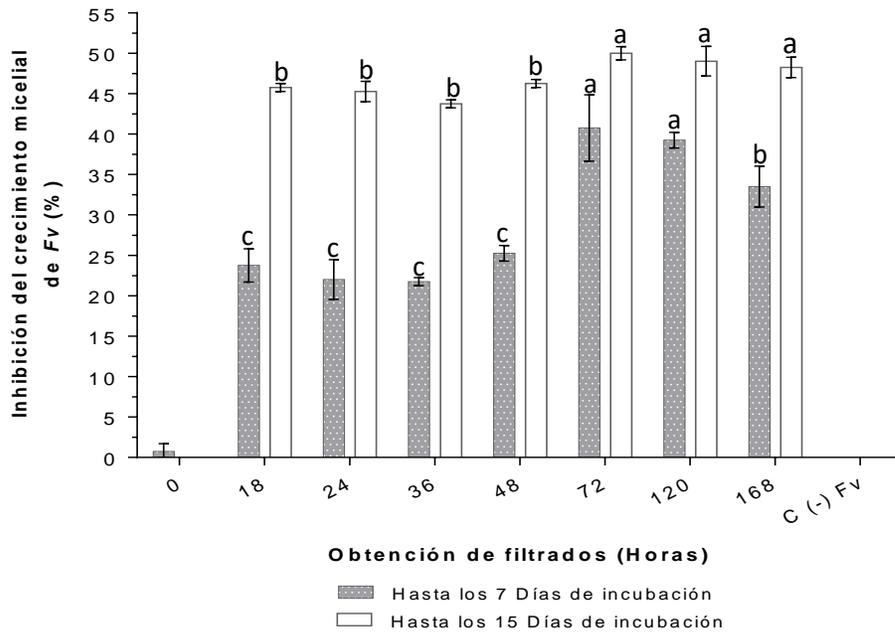
Adicionalmente, el filtrado crudo de la cepa C-24  $\pi$ 2Tw obtenido a partir de las 48 horas de CEL, inhibió el crecimiento micelial del patógeno en un 32-36% a los 7 días de incubación (Fig. 10C, agrupación *a*). Sin embargo, hasta los 15 días de evaluación, los filtrados obtenidos a las 72 y 120 horas de CEL produjeron mayor porcentaje de inhibición alrededor de  $50 \pm 0.5\%$  (Fig. 10C, agrupación *ab*). El filtrado crudo producido por la cepa control *Pseudomonas rhizosphaerae* presentó los mayores porcentajes de inhibición contra el patógeno, respecto a los demás filtrados evaluados, entre el 45-47% a los 7 días y del 50-52% a los 15 días de incubación (Fig. 9E, agrupación *a*). Por tanto, los filtrados crudos de C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24  $\pi$ 2Tw y C-31 H2Tw obtenidos en idiofase tardía, exhibieron mayor actividad antagonica contra *Fusarium verticillioides* resaltando el elevado potencial de estas cepas como antagonista de este patógeno. Sin embargo, el porcentaje de inhibición del filtrado crudo de la

cepa control *Pseudomonas rhizosphaerae* difiere del resto, presentando una mayor actividad inhibitoria contra el patógeno.

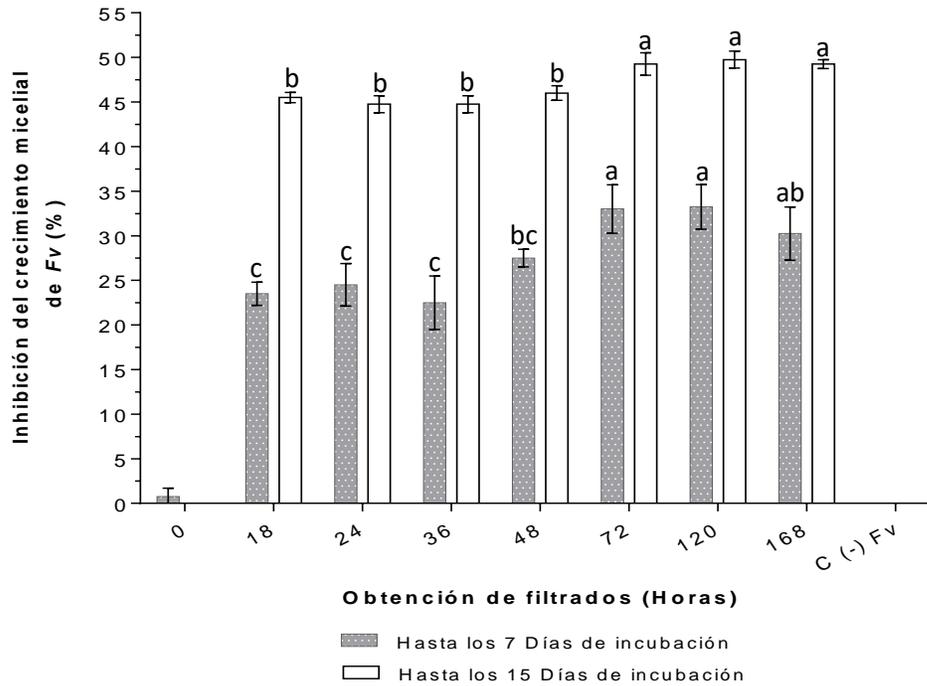
La eficacia como antifúngicos de metabolitos secundarios de especies de *Pseudomonas* ha sido ampliamente respaldada en estudios anteriores, por ejemplo, Sowanpreecha & Rerngsamran (2018) reportaron que el filtrado crudo producido por *Pseudomonas aeruginosa* RS1, obtenido en idiofase, inhibió el crecimiento de *Phytophthora palmivora* en un 53%, fitopatógeno causante de la podredumbre negra. Además, también se reportó porcentajes de inhibición del  $42\pm 2\%$  contra *Glomerella tucumensis* empleando filtrados de *Pseudomonas putida* N2wzH-50, obtenidos a las 72 horas de CEL (Hassan, Afghan, & Hafeez, 2011). Otro estudio realizado reportó que *Fusarium verticillioides* fue inhibido en un 50 y 80% al ser tratado con el ramnolípido RL-SS14 ( $\geq 50$  y 200 mg/L) de *Pseudomonas aeruginosa* SS14 (Borah, Goswami, Sarma, Cameotra, & Deka, 2016). Por otro lado, *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 se caracterizó por la capacidad de producir sideróforos, y se evidenció que a una concentración 20  $\mu\text{M}$  disminuye el crecimiento de *Colletotrichum lindemuthianum* y *Colletotrichum gloeosporioides*, (Santoyo, Valencia, Orozco, Peña, & Farías, 2010). Imran, Darine, & Mohamed, (2012) indicaron que el filtrado crudo de *Bacillus subtilis* (8.3 y 12.5%, v/v) inhibe el crecimiento de *Fusarium verticillioides*, *Rhizoctonia solani* y *Botrytis cinerea*.

En el presente estudio, los filtrados crudos bacterianos se caracterizaron por disminuir el crecimiento micelial de *Fusarium verticillioides* y se podría presumir que en condiciones naturales podrían reducir la concentración del patógeno capaz de producir infección, por lo que estos hallazgos del efecto antifúngico justifican su estudio como agentes de biocontrol en campo.

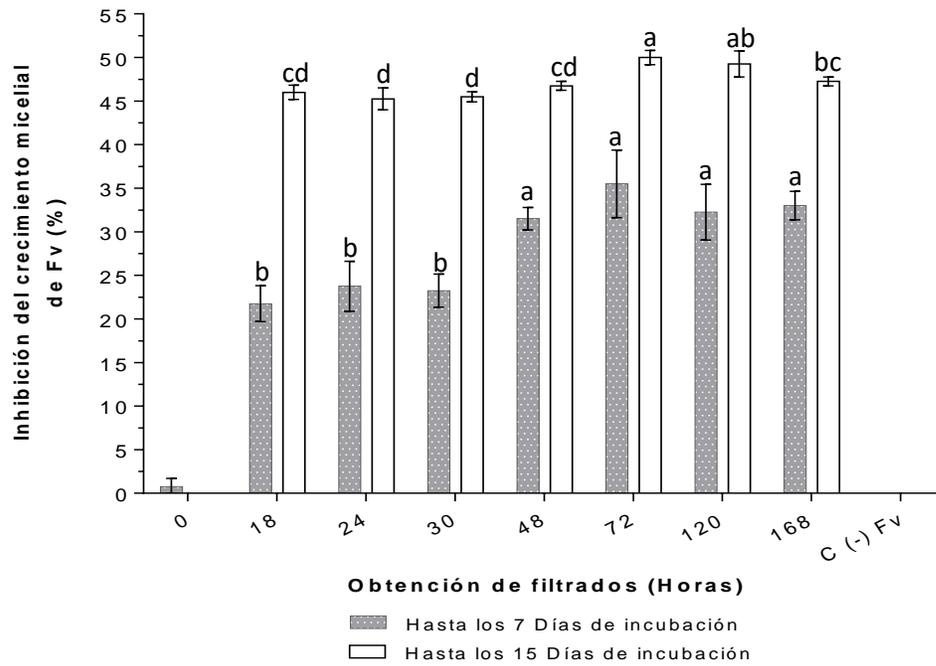
**A. C-20 ñ2Th**



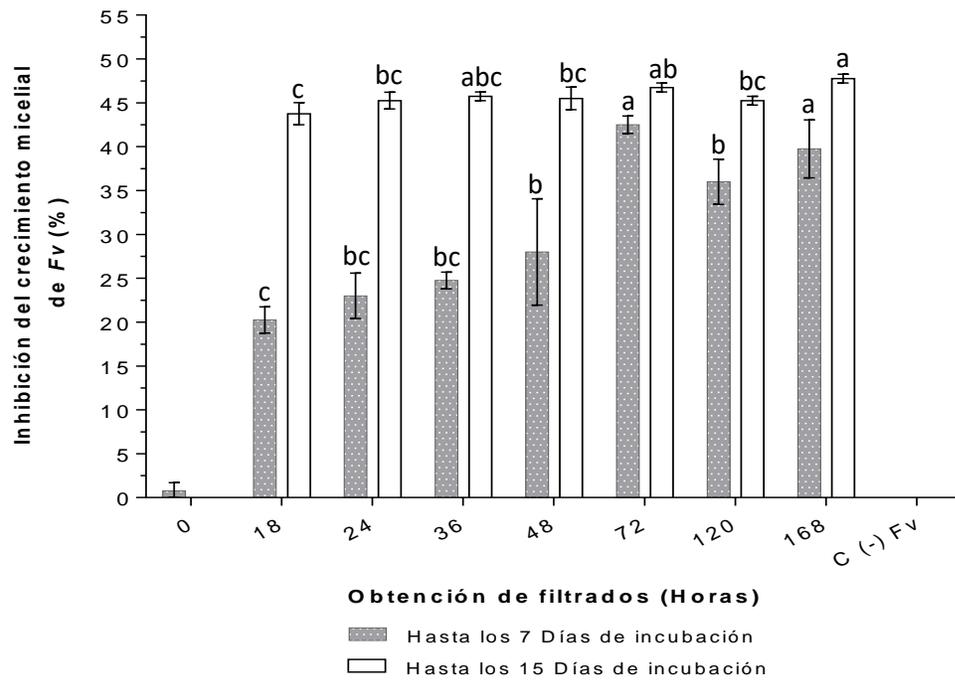
**B. C-22 h2-3Tw**



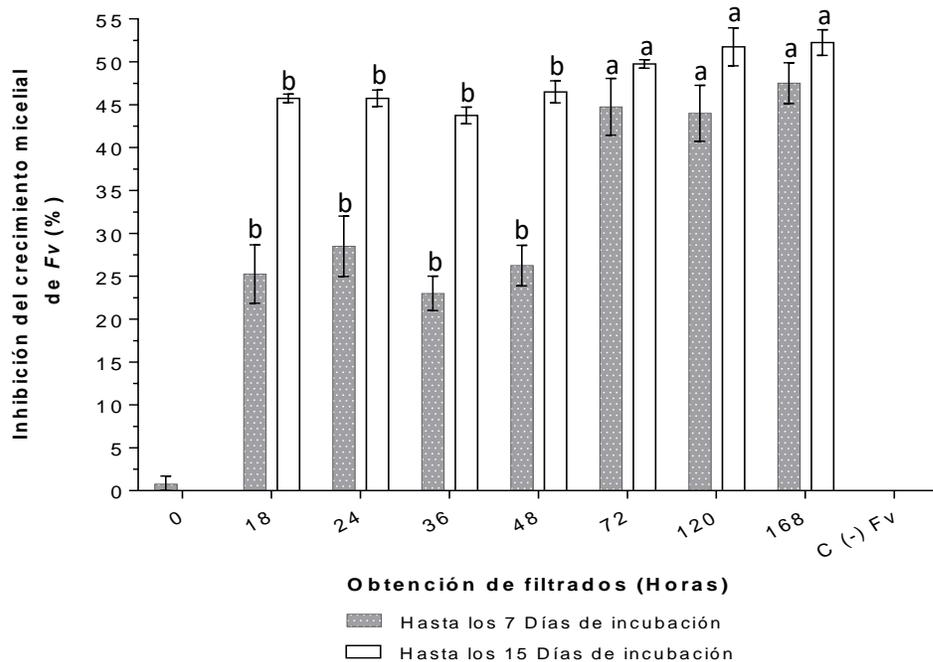
**C. C-24 phi2Tw**



**D. C-31 H2Tw**



**E. *Pseudomonas rhizosphaerae***



**Figura 10.** Efecto inhibitorio de filtrados crudos producidos por cultivo en estado líquido a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  y 120 rpm de las cepas **A.** C-20 ñ2Th, **B.** C-22 h2-3Tw, **C.** C-24 π2Tw, **D.** C-31 H2Tw y **E.** *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) frente a *Fusarium verticillioides* durante 7 y 15 días de incubación, empleando la técnica de vertido en placa dilución 1:2 (v:v). Las barras representan la media y la desviación estándar de cuatro replicas. Letras no comunes indican agrupaciones con diferencias significativas para la prueba Tukey ( $p < 0.001$ ).

Diversos estudios informaron que las bacterias endófitas ejercen un control biológico efectivo sobre los patógenos de las plantas a través de varios mecanismos de acción, como el incremento en la resistencia sistémica, competencia por nutrientes y nichos ecológicos (Compant, Duffy, Nowak, Clément, & Ait, 2005). Sin embargo, la síntesis de antimicrobianos es uno de los principales mecanismos de acción contra los patógenos (Compant, Clément, & Sessitsch, 2010; Santoyo, Moreno, Orozco, & Glick, 2015). Se ha estimado que estos microorganismos son una fuente inagotable de más de 20.000 compuestos biológicamente activos, los cuales influyen de manera directa en el rendimiento y supervivencia de las plantas hospederas (Alviz, Pérez, & Pérez, 2017). Los metabolitos bioactivos producidos por bacterias endófitas han sido estudiados por su actividad inhibitoria contra fitopatógenos y son empleados en formulaciones líquidas o sólidas para combatir enfermedades en los cultivos agrícolas, por ejemplo, *Bacillus mojavensis* RRC 101 que produce Leu7-surfactina es utilizada como bioinsumo para combatir enfermedades del maíz. Debido a la preocupación global por la salud humana y el medio ambiente, el género de *Pseudomonas sp.* ha sido ampliamente

aceptada como un agente seguro de control biológico en la agricultura. *Pseudomonas sp.* tiene la capacidad de producir una amplia gama de antimicrobianos: pioluteorina (Plt), ácido fenazina-1-carboxílico (PCA), el 2,4-diacetilfloroglucinol (2,4-DAPG), pirrolnitrina (Prn), cianuro de hidrógeno (HCN), sideróforos, compuestos de tipo proteico (bacteriocinas), biosurfactantes y otros, que influyen en la supresión de patógenos (Snook, Mitchell, Hinton, & Bacon, 2009; Chebotar *et al.*, 2015; Santoyo, Orozco, & Govindappa, 2012). Se demostró en el presente estudio, que filtrados crudos bacterianos inhibieron el crecimiento de *Fusarium verticillioides*, sin embargo, la caracterización de los metabolitos y su modo de acción necesita ser estudiado. En ese sentido, los metabolitos presentes en filtrados crudos bacterianos pueden usarse para obtener acciones antifúngicas sinérgicas. Los filtrados crudos bacterianos constituirían una alternativa en la agricultura para inhibir el crecimiento de *Fusarium verticillioides*.

### **6.3.2 Metabolitos solubles producidos por cultivo en estado sólido**

Industrialmente, los metabolitos secundarios son producidos por CEL porque permite un mayor control de parámetros como se mencionó anteriormente, sin embargo, este tipo de cultivo exige mayores costos de producción. Una alternativa interesante al CEL es el cultivo en estado sólido (CES), ya que el proceso es más sencillo, ecológico, de baja inversión de capital y lo más importante utiliza residuos o subproductos agroindustriales (Ziayoddin, Manohar, & Junna, 2012). La principal diferencia entre estos dos bioprocesos, es la cantidad de agua libre en el medio de cultivo. En la CEL existe agua libre en el sistema donde los nutrientes se encuentran en forma soluble en el medio líquido, en contraste el CES es un proceso sobre sustratos sólidos insolubles en agua, con un bajo contenido de humedad, pero suficiente para mantener el crecimiento y metabolismo microbiano (Mitchell, Berovic, & Krieger, 2002; Robinson, Singh, & Nigam, 2002; Singhanía, Patel, Soccol, & Pandey, 2009). La CES simula el hábitat natural del microorganismo, por lo que este sistema puede resultar más eficiente para la producción de metabolitos bioactivos (Holker, Hofer, & Lenz, 2004; Singhanía, Patel, Soccol, & Pandey, 2009). El CES tiene varias aplicaciones potenciales en la producción de productos de valor agregado como metabolitos secundarios incluyendo antibióticos, alcaloides, factores de crecimiento de planta, enzimas, ácidos orgánicos, bioplaguicidas, micopesticidas, bioherbicidas, biosurfactantes, biocombustibles, productos

biofarmacéuticos, etc. (Robinso, Singh, & Nigam, 2001; Manpreet, Sawraj, Sachin, Pankaj, & Benerjee, 2005; Pandey, 2003).

Los sustratos más empleados en el CES son los desechos agroindustriales como salvado de trigo, salvado de arroz, desechos de banana, cascarilla de café, bagazo de caña, pulpa de remolacha, mazorcas de maíz, desechos de frutas y vegetales, paja de trigo entre otros, los cuales se caracterizan por su elevado contenido de carbohidratos, proteínas y lípidos. Sin embargo, la selección del sustrato sólido adecuado para el proceso, es un factor crítico y, por lo tanto, implica la evaluación de varios sustratos agroindustriales favorables para el crecimiento microbiano y la producción de metabolitos de interés (Narendra, Swapna, Khan, Reddy, & Hameeda, 2015; Subramaniam & Vimala, 2012; Uyar & Baysal, 2004). El sustrato sólido utilizado en CES, al estar impregnado en agua, lixivia sus nutrientes en el agua circundante; esta suspensión enriquecida con nutrientes a su vez sostiene el crecimiento y la actividad metabólica del microorganismo. Inicialmente, el sustrato sólido es inaccesible para los microorganismos debido a su composición, su disponibilidad puede variar durante el cultivo, debido a que es utilizado lentamente por el microorganismo, existiendo una liberación controlada de nutrientes (Subramaniam & Vimala, 2012). Esto se debe a la interacción compleja de una variedad de factores que incluyen: la producción y difusión de enzimas hidrolíticas extracelulares, la difusión de productos de hidrólisis y la penetración del microorganismo en el sustrato (Mitchell, Berovic, & Krieger, 2002). Si se analiza el sustrato en una microescala en el sistema de CES, el microorganismo en crecimiento se adhiere al sustrato sólido, por ejemplo, los organismos unicelulares como bacterias forman una biopelícula alrededor del material sólido (Mitchell, De Lima, & Krieger, 2011; Manpreet, Sawraj, Sachin, Pankaj, & Banerjee, 2005).

Debido a las ventajas descritas del CES sobre el CEL, en el presente estudio se evaluó la producción de metabolitos solubles producidos por C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) en cultivo en estado sólido, empleando como sustrato sólido salvado de trigo y cascarilla de arroz, los cuales son desechos agroindustriales o se utilizan para la elaboración de productos de interés, como productos de panadería, fibras dietéticas, alimento balanceado para ganado, etc. (Vargas & Pérez, 2018). Es importante mencionar que una de las principales dificultades en el CES es la imposibilidad de

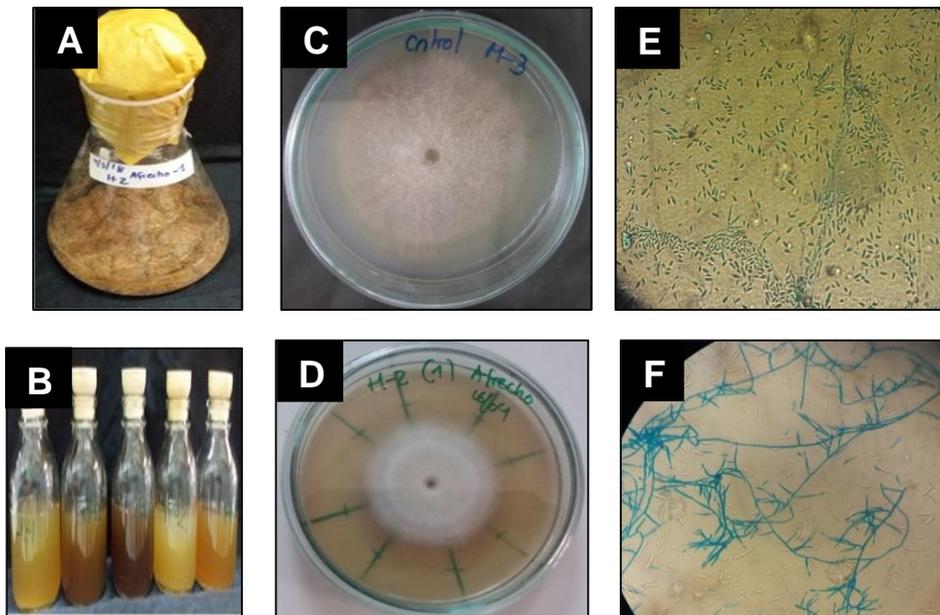
obtener muestras representativas durante el proceso, por ejemplo, cuando se requieren estudios cinéticos, de determinación de la concentración de sustratos y productos, cuantificación de células, etc. En ese sentido, en este experimento no se recolectaron muestras en diferentes intervalos de tiempo, sino más bien se colectó todo el caldo a las 120 horas de cultivo de C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae*, para el análisis de la actividad inhibitoria de sus metabolitos contra *Fusarium verticillioides*, mediante la técnica de vertido en placa a una dilución 1:3, durante 7 (Fig. 12, barras rojas) y 15 días (Fig. 12, barras azules).

Posterior al análisis de ambos sustratos sólidos empleados en el CES se encontró que el salvado de trigo, obtenido del mercado local, es un medio de cultivo que favorece la producción de metabolitos bioactivos por C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae*. El salvado de trigo, fue utilizado como fuente de carbono, nitrógeno y minerales, donde las bacterias crecieron exuberantemente sin otra fuente de carbono u otros nutrientes (Fig. 11A y B), lo cual es interesante para su aplicación, ya que no requiere nutrientes adicionales. La idoneidad universal del salvado de trigo puede deberse al hecho de que contiene suficientes nutrientes y permanece accesible incluso en condiciones de humedad, lo que proporciona una gran superficie para el crecimiento microbiano.

Los resultados obtenidos al evaluar la actividad inhibitoria de los filtrados crudos producidos por las cepas bacterianas y *Pseudomonas rhizosphaerae* mediante CES, empleando salvado de trigo como sustrato, revelaron porcentajes de inhibición moderados entre el 43-54% contra *Fusarium verticillioides* durante 7 días de incubación, presentando diferencias significativas respecto al control negativo de *Fusarium verticillioides* y al control de medio de cultivo, donde el fitopatógeno desarrolló normalmente (ANOVA,  $p < 0,001$ ). La evaluación de la actividad inhibitoria de los filtrados crudos producidos por las cepas bacterianas, en función al porcentaje de inhibición contra *Fusarium verticillioides*, se realizó mediante el análisis de comparación múltiple de Tukey. Los resultados del análisis revelaron que no existen diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición empleando filtrados crudos de las cepas C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw (Fig. 12, agrupación *ab*) alcanzando el 49-52% de inhibición de *Fusarium verticillioides*, incubado durante 7 días. Por otro lado, el filtrado crudo obtenido con la cepa C-20 ñ2Th inhibió el crecimiento micelial de *Fusarium*

*verticillioides* en un 43% (Fig. 12, agrupación *b*) y el filtrado crudo producido por la cepa control *Pseudomonas rhizosphaerae* presentó el mayor porcentaje de inhibición contra el patógeno, alrededor del 54% (Fig. 12, agrupación *a*). Adicionalmente, los filtrados crudos bacterianos empleando cascarilla de arroz en el CES, presentaron actividad leve o nula frente crecimiento de *Fusarium verticillioides* (resultados mostrados en el ANEXO 2).

Al igual que en el experimento anterior (CEL sección 6.3.1.) respecto a alteraciones morfológicas de *Fusarium verticillioides*, al ser tratado con filtrados crudos bacterianos, en este experimento se observó que los filtrados crudos producidos por CES con salvado de trigo, ocasionaron disminución del crecimiento hifal y la germinación de *Fusarium verticillioides*, así como cambios macroscópicos de un aspecto algodonoso de color blanco diferente al control negativo de aspecto levemente algodonoso y gris (Fig. 11C, D, E y F).

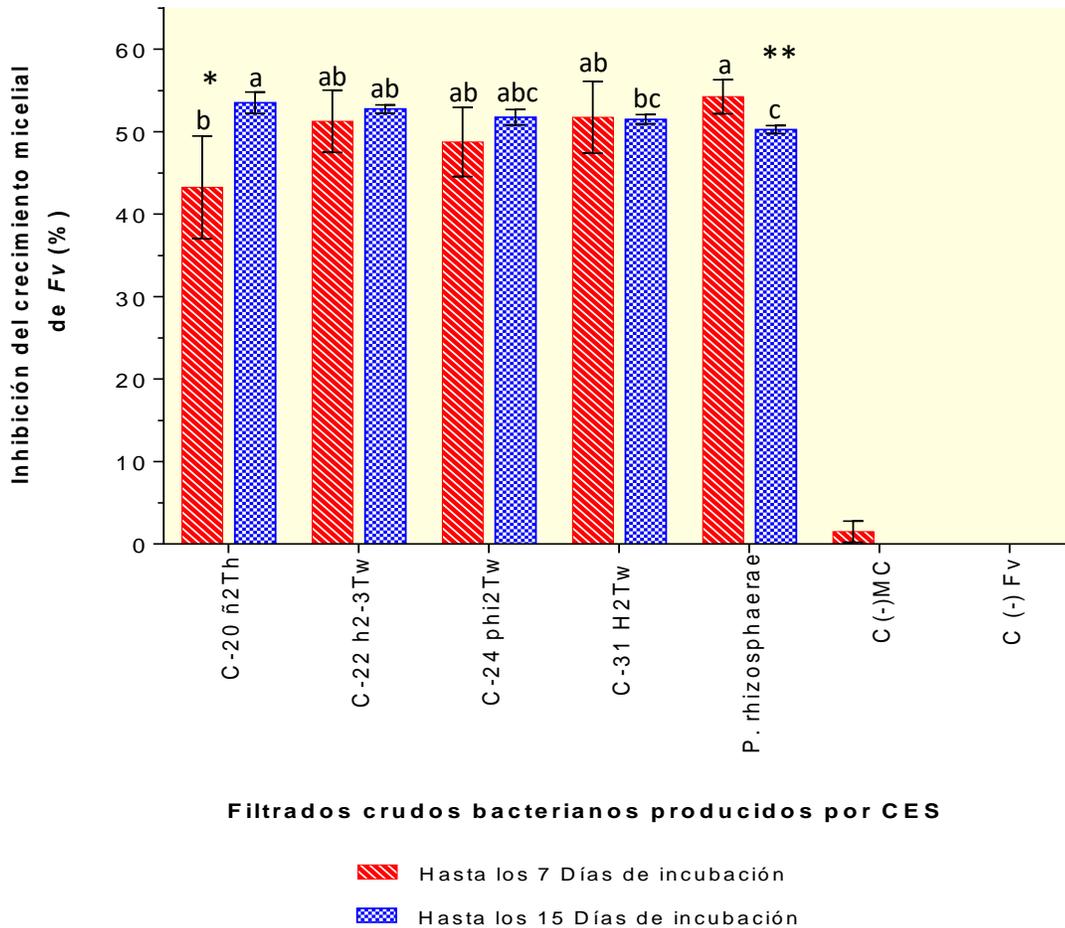


**Figura 11.** **A.** Cultivo bacteriano en salvado de trigo hasta las 120 horas de incubación donde se observa la formación de biofilm sobre el sustrato. **B.** Filtrados crudos exentos de biomasa bacteriana obtenidos por CES. **C.** Crecimiento normal de *Fusarium verticillioides* en medio PDA. **D.** Inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* en medio PDA con el filtrado crudo bacteriano (dilución 1:3). Observación microscópica a 400X de *Fusarium verticillioides*, **(E)** sin y **(F)** con el filtrado crudo bacteriano.

En la sección 6.3.1 se pudo observar que la actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides* de filtrados crudos bacterianos, obtenidos por CEL, permaneció estable por un tiempo prolongado de 15 días de incubación. En este sentido, también se evaluó la estabilidad de la actividad inhibitoria de los filtrados crudos bacterianos obtenidos por CES, durante 15

días de incubación. Los resultados del análisis ANOVA unifactorial, reportan que los filtrados crudos obtenidos de las cepas C-22 h2-3Tw, C-31 H2Tw y C-24  $\pi$ 2Tw cultivadas por CES, no expresan diferencias significativas en sus porcentajes de inhibición de 49-52% y 52-53%, a los 7 y 15 días de incubación de *Fusarium verticillioides*, respectivamente ( $p > 0.05$ ).

Por otro lado, empleando el filtrado crudo de la cepa C-20 ñ2Th se observó un incremento significativo en el porcentaje de inhibición de *Fusarium verticillioides*, de 43% (7 días) a 54% a los 15 días de incubación (ANOVA unifactorial,  $p < 0.05$ ). En contraste, empleando el filtrado crudo de *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) se observó una leve reducción en el porcentaje de inhibición de 54% a los 7 días a 52% hasta los 15 días de incubación de *Fusarium verticillioides* ( $p < 0.05$ ).



**Figura 12.** Efecto inhibitorio de filtrados crudos producidos por cultivo en estado sólido, empleando salvado de trigo como sustrato sólido, a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  de las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24  $\pi$ 2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) frente a *Fusarium verticillioides* durante 7 y 15 días de incubación, empleando la técnica de vertido en placa dilución 1:3 (v:v). Las barras representan la media y la desviación

estándar de cuatro replicas. Letras no comunes indican agrupaciones con diferencias significativas para la prueba Tukey ( $p < 0,05$ ). \*: Aumento y \*\*: Reducción de la actividad inhibitoria de filtrados crudos bacterianos contra el patógeno hasta los 15 días de evaluación ( $p < 0,05$ ). C(-)MC refiere al control negativo de medio de cultivo y C(-)Fv al control negativo de *Fusarium verticillioides*.

A la luz de las numerosas ventajas del CES sobre el CEL, en el presente trabajo de investigación se realizó la comparación de los diferentes filtrados crudos bacterianos obtenidos por CEL y CES mediante el análisis de comparación múltiple de Tukey. Para ello, se compararon los porcentajes de inhibición de *Fusarium verticillioides*, empleando filtrados obtenidos en idiofase de CEL (72, 120 y 168h, debido a que se reportaron mayores porcentajes de inhibición descritos en la sección 6.3.1.) y 120h de CES. Como se muestra en la Tabla 2, los filtrados obtenidos por CES exhiben porcentajes de inhibición superiores a aquellos obtenidos por CEL, para todas las cepas bacterianas estudiadas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae*. Además, es importante resaltar que para la evaluación del efecto inhibitorio se emplearon filtrados más diluidos de CES (dilución 1:3) que de CEL (dilución 1:2). Por ambas razones, mayores porcentajes de inhibición y utilización de menor volumen de filtrado, el cultivo en estado sólido fue superior al cultivo en estado líquido, y se sugiere que las bacterias endofitas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* ofrecen posibilidades para la producción de metabolitos bioactivos por CES.

**Tabla 2.** Efecto inhibitorio de filtrados crudos producidos por CES y CEL de las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) frente a *Fusarium verticillioides* durante 7 y 15 días de incubación.

Evaluación del crecimiento de <i>F. verticillioides</i>		C-20 ñ2Th		C-22 h2-3Tw		C-24 π2Tw		C-31 H2Tw		<i>P. rhizosphaerae</i>	
		7d	15d	7d	15d	7d	15d	7d	15d	7d	15d
CEL (idiofase)	72 h	41 ± 1 <i>ab</i>	50 ± 1 <i>b</i>	33 ± 3 <i>b</i>	49 ± 1 <i>b</i>	36 ± 4 <i>b</i>	50 ± 1 <i>ab</i>	43 ± 1 <i>b</i>	47 ± 0,5 <i>bc</i>	45 ± 3 <i>b</i>	50 ± 1 <i>a</i>
	120 h	39 ± 1 <i>ab</i>	49 ± 2 <i>b</i>	33 ± 2 <i>b</i>	50 ± 1 <i>b</i>	32 ± 3 <i>b</i>	49 ± 1 <i>bc</i>	36 ± 3 <i>b</i>	45 ± 1 <i>Cd</i>	44 ± 3 <i>b</i>	52 ± 2 <i>a</i>
	168 h	34 ± 2 <i>b</i>	48 ± 1 <i>b</i>	30 ± 3 <i>bc</i>	49 ± 0,3 <i>b</i>	33 ± 1 <i>b</i>	47 ± 1 <i>cd</i>	40 ± 2 <i>b</i>	48 ± 1 <i>B</i>	47 ± 3 <i>b</i>	52 ± 1 <i>a</i>
CES	120 h	43 ± 6 <i>a</i>	54 ± 1 <i>a</i>	51 ± 4 <i>a</i>	53 ± 0,5 <i>a</i>	49 ± 4 <i>a</i>	52 ± 1 <i>a</i>	52 ± 4 <i>a</i>	52 ± 1 <i>A</i>	54 ± 2 <i>a</i>	52 ± 0,5 <i>a</i>

**Nota:** Las medias de una misma columna que no comparten una letra son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) según el análisis de comparación múltiple de Tukey. **CES:** tiempo de obtención del filtrado crudo en Cultivo en estado sólido, **CEL:** tiempo de obtención del filtrado crudo en Cultivo en estado líquido, **d:** tiempo en días de incubación de *Fusarium verticillioides*, **h:** tiempo en horas de obtención del filtrado crudo bacteriano.

Fuente: Elaboración propia.

El uso de desechos agroindustriales para el cultivo en estado sólido (CES) es una alternativa para la producción de metabolitos bioactivos, por ejemplo, El Bendary, Moharam, & Foda, (2008) emplearon salvado de trigo, como sustrato sólido en el CES, para la producción de una toxina mosquitocida producida por *Bacillus sphaericus*, la cual tiene un efecto inhibidor contra *Culex pipiens*. Así mismo, Zhun, Zhang, Luo, Ran & Shen, (2012) optimizaron la producción de lipopéptidos por *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 por CES, empleando paja de arroz como sustrato principal con harina de soja, almidón y extracto de levadura, obteniendo una elevada concentración de lipopéptidos con actividad inhibitoria contra *Rhizoctonia solani* y *Ralstonia solanacearum*, fitopatógenos de diversos cultivos agrícolas. Mizumoto & Shoda, (2007) emplearon okara, un residuo de cuajada de soja producido durante la fabricación del tofu, utilizado en CES para la producción de Iturina A, un antibiótico lipopeptídico, producido por *Bacillus subtilis* RB14-CS. El género *Pseudomonas* también es empleado en CES con salvado de trigo para la producción de proteasas alcalinas por *Pseudomonas aeruginosa* (Meena, Tripathi, Srivastava, & Jha, 2013). Existen otras aplicaciones del cultivo en estado sólido (CES) en biorremediación y biodegradación de compuestos peligrosos, desintoxicación y biotransformación biológica de residuos agroindustriales (Singhania, Patel, Soccol, & Pandey, 2009).

Debido a que el CES utiliza desechos orgánicos sólidos, existe una reducción de los costos operativos y de producción, contribuyendo de manera concurrente a la gestión de los desechos sólidos. Los residuos agroindustriales se generan en grandes cantidades cada año, y el CES constituye una alternativa para su reutilización por su disponibilidad, bajo costo y composición, que permiten obtener diferentes compuestos de valor agregado. Aunque el CES tiene potencial en áreas específicas, ha recibido poca atención. Su potencial para operar de manera confiable a gran escala simplemente no se ha investigado en la misma medida que el CEL. Si bien el CES permite la formación de productos más concentrados, otros factores tales como la impureza del producto, elevación de temperatura, pH, O<sub>2</sub>, gradiente de sustrato y humedad en el proceso fermentativo, son problemas a ser considerados cuando se emplea el CES a escala industrial (Pandey, Soccol, & Mitchell, 2000; Singhania, Patel, Soccol, & Pandey, 2009; Robinson, Singh, & Nigam, 2002; Hölker, Höfer, & Lenz, 2004).

#### **6.4 Potencial de metabolitos volátiles con actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides***

Las bacterias endófitas tienen diferentes mecanismos por los cuales pueden inhibir a patógenos, la competencia por nutrientes, inducción de la resistencia sistémica en la planta, producción de sideróforos, degradación de factores de virulencia y producción de una gran variedad de compuestos antifúngicos, son algunos mecanismos ampliamente estudiados. Sin embargo, la mayoría de los procesos mencionados requieren un contacto cercano o incluso físico con el patógeno. Interesantemente, también se ha reportado que las bacterias antagónicas también son capaces de inhibir a distancia a fitopatógenos fúngicos por la emisión de metabolitos volátiles (Weisskopf, 2013; Noriega, Hernández, Acebo, & Luis, 2016). Estos compuestos volátiles bacterianos son de gran interés para el desarrollo de una variedad de aplicaciones, entre ellas la capacidad de inhibir el desarrollo de patógenos que afectan cultivos agrícolas (Barraza, Bravo, & Pérez, 2017; Schulz & Dickschat, 2007). Actualmente, las funciones biológicas de muchos compuestos volátiles no han sido elucidadas en detalle, pero se ha reportado que intervienen en procesos de comunicación inter e intra-organismos, como una posible válvula de liberación de carbono, promoción del crecimiento de las plantas o inclusive inhibición de patógenos (Kai *et al.*, 2009). También están involucrados en la competencia, señalización y cooperación en poblaciones celulares, sin embargo, la producción de compuestos volátiles está sujeta a las condiciones ambientales. La biosíntesis de compuestos volátiles bacterianos está generalmente vinculadas a vías catabólicas que incluyen la glicólisis, proteólisis y lipólisis, y pertenecen a diferentes clases químicas (Cho *et al.*, 2017; Schulz & Dickschat, 2007). Los compuestos volátiles se transforman rápidamente de líquidos o sólidos a gases, por su bajo peso molecular y alta presión de vapor. Estas propiedades permiten su fácil difusión a través de la estructura porosa del suelo y a grandes distancias en la atmosfera. Por lo tanto, los metabolitos volátiles no solo desempeñan un papel sobre el suelo y en consecuencia su efecto antagónico puede llegar a largas distancias (Cho *et al.*, 2017; Kai *et al.*, 2009).

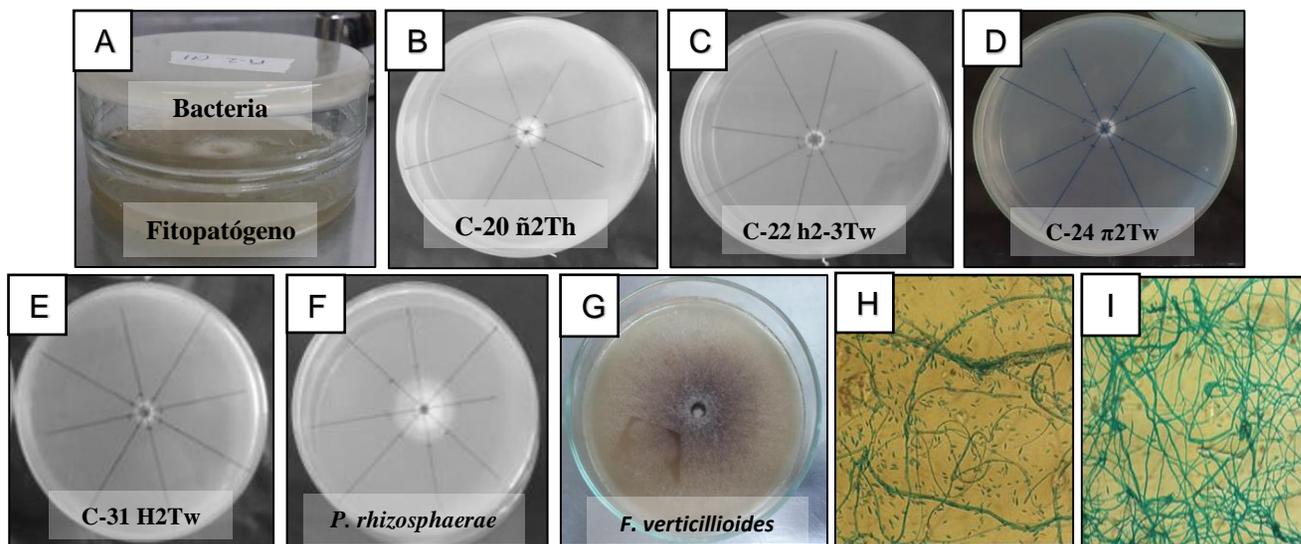
Los metabolitos volátiles bacterianos son de gran interés por su rol en el control biológico de patógenos. Por ello, el presente trabajo de investigación evaluó la actividad inhibitoria de metabolitos volátiles producidos por las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31

H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* contra el crecimiento de *Fusarium verticillioides* durante 7 y 15 días de incubación. Para este fin, se empleó la técnica de doble placa donde los dos organismos, bacterias endófitas y *Fusarium verticillioides* crecieron en diferentes superficies de agar, pero fueron expuestos entre sí, evitando cualquier contacto físico directo, donde sólo los metabolitos volátiles difundieron entre ambos microorganismos (descrito en la sección 5.3.8).

Los resultados preliminares de la actividad inhibitoria de metabolitos volátiles bacterianos producidos por las cepas seleccionadas y *Pseudomonas rhizosphaerae* frente a *Fusarium verticillioides* durante 7 días de co-incubación, revelaron porcentajes de inhibición elevados, entre 68 y 88% en comparación al control negativo de *Fusarium verticillioides*, donde no existió alteración en su crecimiento (ANOVA,  $p < 0,05$ ). La evaluación de la actividad inhibitoria de metabolitos volátiles producidos por las cepas bacterianas, en función al porcentaje de inhibición contra *Fusarium verticillioides*, se analizó mediante el test de comparación múltiple de Tukey, revelando que los metabolitos volátiles emitidos por las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw, fueron capaces de reducir el crecimiento de *Fusarium verticillioides* en un 83-88% hasta los 7 días de co-incubación, no existiendo diferencias significativas entre sí (Fig. 14,  $p > 0,05$ , agrupación *a*). Por otro lado, la cepa control *Pseudomonas rhizosphaerae* se caracterizó por emitir metabolitos volátiles que afectaron negativamente el crecimiento de patógeno sólo en un 68% hasta los 7 días de co-incubación (Fig. 14,  $p < 0,05$ , agrupación *b*).

En el estudio microscópico se observaron que los compuestos volátiles bacterianos redujeron la esporulación y el crecimiento hifal de *Fusarium verticillioides* (Fig. 13G, H). Las características macroscópicas también se vieron afectadas, evidenciado por el desarrollo de un micelio blanco diferente al control negativo (Fig. 13A, B, C, D, E y F). Sin embargo, estudios adicionales deben realizarse para comprender los mecanismos que conducen a la inhibición de las estructuras reproductivas de *Fusarium verticillioides* después de la exposición a metabolitos volátiles bacterianos. Estudios similares fueron reportados, por ejemplo, Fernando, Ramarathnam, Krishnamoorthy, & Savchuk, (2005) indicaron que especies del género de *Pseudomonas sp.*, aisladas de las raíces y el rastrojo de canola y de las raíces de soja, produjeron compuestos volátiles que inhibieron la supervivencia, infección y las

estructuras reproductivas de *Sclerotinia sclerotiorum*, causante de la podredumbre del tallo de canola, frijoles y la pudrición de la corona y el tallo de la alfalfa. Por otra parte, Manna, Yeon, & Deok, (2017) informaron que compuestos volátiles producidos por *Bacillus megaterium* KU143, *Microbacterium testaceum* KU313 y *Pseudomonas protegens* AS15 inhibieron notablemente el crecimiento micelial, la esporulación y la germinación conidial de *Aspergillus flavus*.

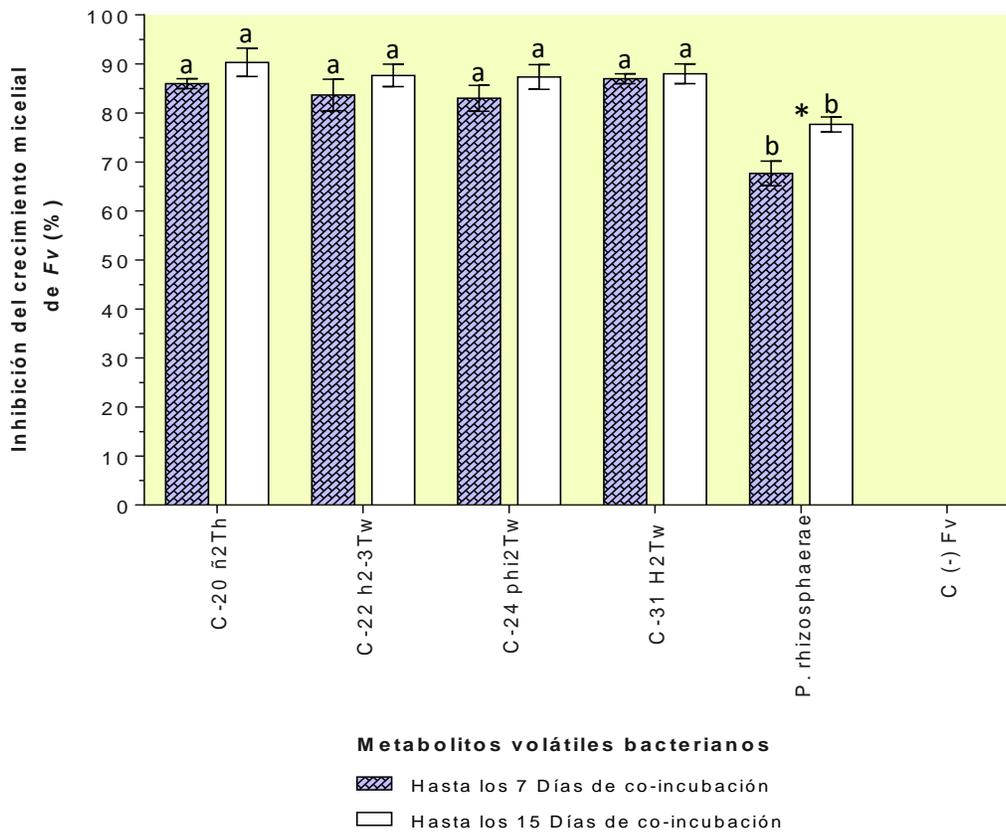


**Figura 13.** A. Cultivo doble placa: bacteria y fitopatógono. Actividad inhibitoria de: B. C-20 ñ2Th, C. C-22 h2-3Tw, D. C-24 π2Tw, E. C-31 H2Tw y F. *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) contra *Fusarium verticillioides* por interacción antagonista-fitopatógono sin contacto directo. G. Crecimiento normal de *Fusarium verticillioides* en medio PDA. Observación microscópica a 400X de *Fusarium verticillioides*: (H) con y (I) sin exposición a metabolitos volátiles bacterianos.

En el presente estudio, se evaluó también la inhibición de *Fusarium verticillioides* por la emisión de metabolitos volátiles producidos por las cepas bacterianas, con un tiempo de exposición prolongado hasta los 15 días de co-incubación. Los resultados obtenidos como se muestra en la Figura 14, revelan que no existe diferencias significativas en los porcentajes de inhibición de *Fusarium verticillioides* ( $p > 0.05$ , análisis ANOVA) de 83-88% evaluado a los 7 días y 87-90% hasta los 15 días, efecto causado por las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw, lo que indica que no existió la recuperación del fitopatógono a la exposición de metabolitos volátiles. Por otro lado, se observó un incremento significativo en el porcentaje de inhibición de *Fusarium verticillioides* por la emisión de metabolitos volátiles por *Pseudomonas rhizosphaerae*, de 68% hasta los 7 días a 78% a los 15 días de co-incubación ( $p < 0.05$ , análisis ANOVA). Se demuestra que las cepas endófitas evaluadas tienen

un elevado potencial antagonista por la emisión de metabolitos volátiles que afectan negativamente el crecimiento de *Fusarium verticillioides*, por ello se seleccionó a la cepa bacteriana endófito C-20 ñ2Th para posteriores evaluaciones.

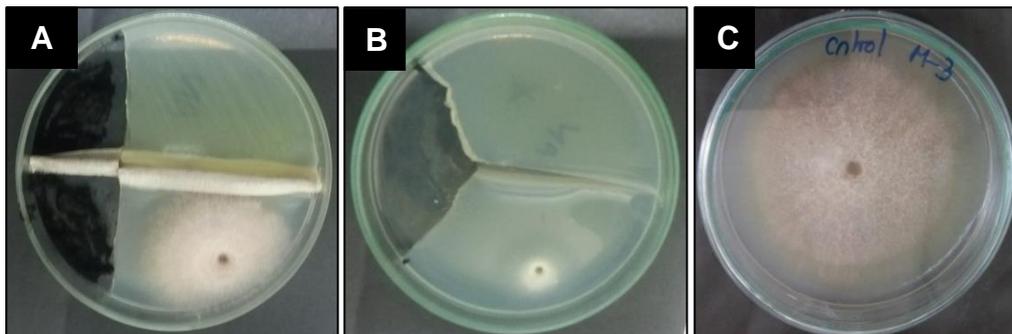
Varios estudios han informado sobre la participación de metabolitos volátiles en el control biológico de patógenos de plantas, por ejemplo, Elkahoui *et al*, (2014) indicaron que los compuestos volátiles producidos por *Pseudomonas sp.* P2, endófito aislado de hojas sanas de olivo, inhibió en un 86% el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*, fitopatógeno causante de enfermedades poscosecha de cultivos de papa. Por otro lado, *Pseudomonas corrugata* se caracterizó por la producción de metabolitos antifúngicos volátiles que inhibió en un 58% el crecimiento de *Alternaria alternata*, causante de la mancha foliar y tizón foliar, y en un 49% el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, causante de marchitamientos y pudriciones de los cultivos agrícolas (Trivedi, Pandey, & Palni, 2008). Otro estudio, señala que los metabolitos volátiles producido por *Pseudomonas aeruginosa* inhibieron el crecimiento *Fusarium oxysporum* en un 31%, principal fitopatógeno aislado de cultivos de pepino (Islam, Nain, Alam, Banu, & Islam, 2018).



**Figura 14.** Efecto inhibitorio de metabolitos volátiles producidos por C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) frente a *Fusarium verticillioides* (Fv) durante 7 y 15 días de co-incubación. Las barras representan la media y la desviación estándar de tres replicas. Letras no comunes indican diferencias significativas para la prueba Tukey ( $p < 0,05$ ). \*: Aumento de la actividad inhibitoria de metabolitos volátiles de *Pseudomonas rhizosphaerae* contra el patógeno hasta los 15 días de evaluación ( $p < 0,05$ ).

Se ha reportado que muchas especies de *Pseudomonas* producen metabolitos volátiles inorgánicos como el cianuro de hidrogeno y amoníaco, que desempeñan un papel importante en el control biológico de enfermedades en cultivos agrícolas. Por tanto, en el presente trabajo se evaluó la producción de cianuro de hidrógeno y amoníaco por las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae*. Los resultados revelaron que ninguna de las cepas bacterianas estudiadas produjo cianuro de hidrogeno. Así mismo, no se registró la producción de amoníaco para ninguna de las cepas bacterianas evaluadas (Tabla 3, sección 5.3.9). Estos resultados demostraron que la inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* no se debió a la producción de compuestos inorgánicos como cianuro de hidrogeno y amoníaco, y es posible que otros compuestos volátiles de naturaleza orgánica (COV) fueron responsables del efecto inhibitorio. Para corroborar que los metabolitos volátiles inhibidores del crecimiento de *Fusarium verticillioides* fueron de tipo orgánico COV

se empleó carbón activado como sistema de adsorción, co-incubando las bacterias seleccionadas junto a *Fusarium verticillioides* en una placa dividida. Esta técnica reveló que en presencia de carbón activado no existe inhibición de *Fusarium verticillioides* en comparación a un sistema sin carbón activado donde *Fusarium verticillioides* fue inhibido por el efecto de metabolitos volátiles orgánicos (Fig. 15A, B, C). Por tanto, se demostró que los efectos antifúngicos de los compuestos volátiles orgánicos producidos por C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) inhiben la germinación o el crecimiento micelial de *Fusarium verticillioides*. Asimismo, se demuestra interesantemente que los compuestos volátiles producidos por bacterias endófitas agregan otro mecanismo al perfil de acción en el control biológico de *Fusarium verticillioides*.



**Figura 15.** Actividad antifúngica de compuestos volátiles bacterianos en placa dividida: **A.** Crecimiento de *Fusarium verticillioides* no afectado por metabolitos volátiles retenidos en carbón activado. **B.** El crecimiento de *Fusarium verticillioides* se inhibió en presencia de metabolitos volátiles producidos por bacterias presentes en un compartimento diferente. **C.** Crecimiento normal de *Fusarium verticillioides* en medio PDA.

La investigación sobre COV bacterianos atrae una atención considerable, sin embargo, la identificación de los COV no fue considerada en el presente trabajo investigación, lo cual queda pendiente para futuras investigaciones. La detección y determinación de los COV microbianos es una tarea ardua debido a la complejidad de las mezclas o la abundancia de estos compuestos, determinar sus concentraciones biológicamente relevantes y evaluar si actúan como compuestos individuales o en mezclas es un desafío (Audrain, Farag, Ryu, & Ghigo, 2015; Piechulla & Degenhardt, 2014). Se ha reportado que los compuestos volátiles bacterianos de origen orgánico incluyen varias clases químicas tales como los derivados de ácidos grasos, otros ácidos, compuestos que contienen azufre y nitrógeno, terpenos entre otros (Audrain, Farag, Ryu, & Ghigo, 2015). Varios trabajos de investigación identificaron los metabolitos volátiles bacterianos que están implicados en la inhibición de patógenos, por

ejemplo, Elkahoui *et al.*, (2014) reportaron que *Pseudomonas* P2 exhibió una alta actividad antifúngica contra *Rhizoctonia solani*, principalmente por dos compuestos volátiles como Dimetil disulfuro y Dimetil trisulfuro.

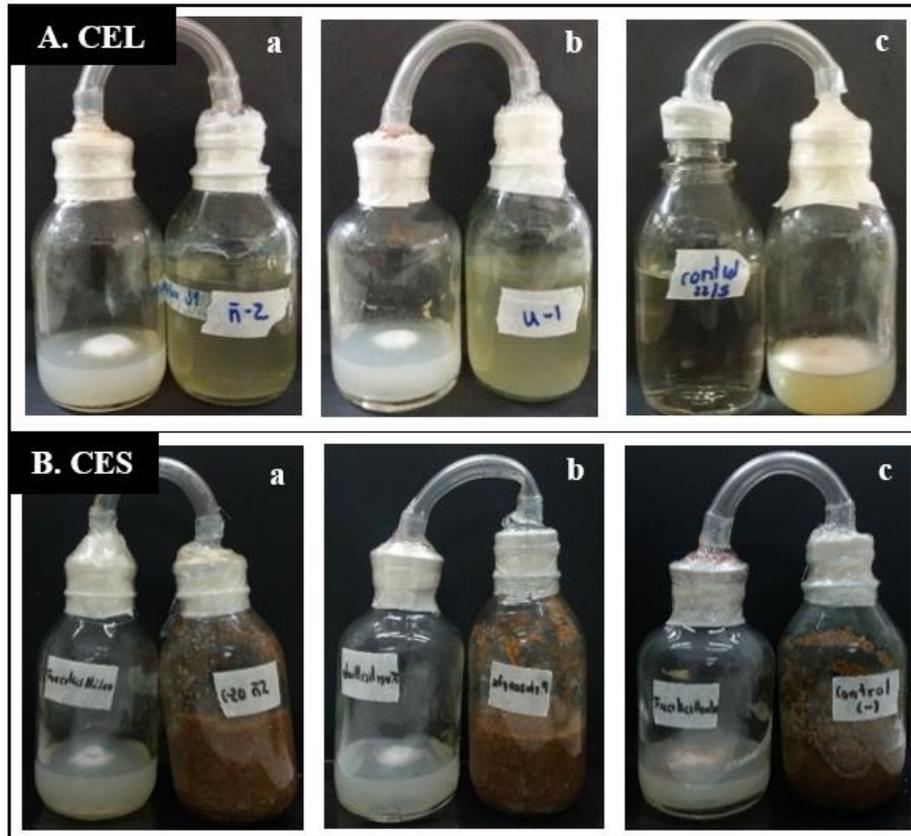
Los bioplaguicidas basados en microorganismos vivos y sus compuestos bioactivos han sido investigados y promovidos como una alternativa que sustituye el uso de pesticidas sintéticos utilizados durante muchos años. Sin embargo, durante la última década se tiene una creciente atención sobre los metabolitos volátiles bacterianos por su potencial en la mejora de la protección de los cultivos agrícolas. Estudios de su efectividad como antagonistas se han realizados en condiciones de laboratorio, sin embargo, existen pocos estudios realizados en campo para demostrar la acción eficiente de los metabolitos volátiles microbianos para la producción y protección sostenible de cultivos agrícolas. Debido a que estos compuestos son altamente efectivos, pueden emplearse en concentraciones relativamente bajas en comparación con los agroquímicos. Sin embargo, existen retos para la aplicación de compuestos volátiles que incluyen la alta tasa de evaporación de estos compuestos, posibles efectos sobre el crecimiento de las plantas y variación en sus niveles de efectividad (Kanchiswamy, Malnoy, & Maffei, 2015; Glare *et al.*, 2012; Song & Ryu, 2013).

#### **6.4.1 Inhibición de *Fusarium verticillioides* por metabolitos volátiles producidos en cultivo en estado líquido y sólido**

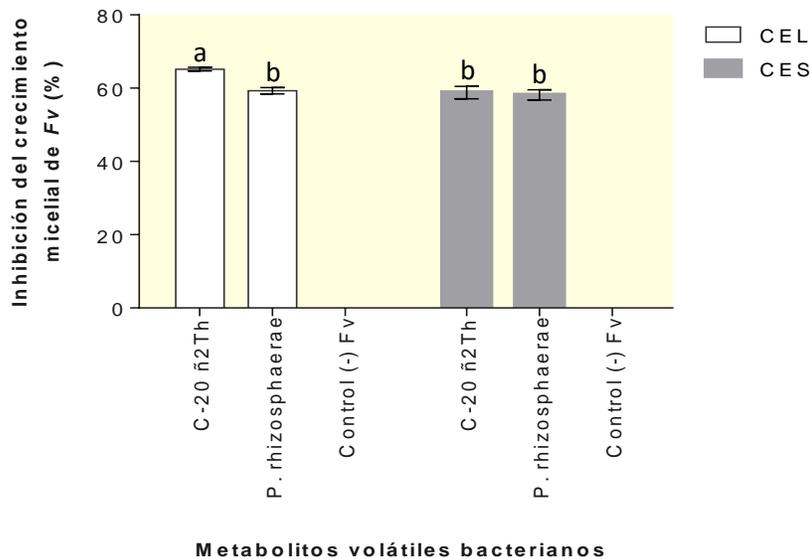
La mayoría de las investigaciones sobre la actividad inhibitoria de metabolitos volátiles bacterianos contra fitopatógenos utilizan el diseño bipartito de la placa Petri o doble placa, pero pocos trabajos emplean cultivo en estado líquido o sólido para el crecimiento bacteriano y la producción de compuestos volátiles. Cordero, Príncipe, Jofré, Mori, & Fischer, (2014) reportaron que los compuestos volátiles producidos por *Pseudomonas fluorescens* MGR12 en CEL, inhibieron el crecimiento micelial de *Fusarium proliferatum* RC 479, fitopatógeno causante de enfermedades en cultivos de cereales. En el presente trabajo de investigación se evaluaron las cepas C-20 ñ2Th y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) en CEL y CES por su capacidad de producir metabolitos volátiles con actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides* empleando un sistema cerrado (Fig. 16).

Los resultados obtenidos revelan que los metabolitos volátiles producidos por las cepas C-20 ñ2Th y *Pseudomonas rhizosphaerae* en CEL y CES inhibieron el crecimiento de *Fusarium verticillioides* entre el 58-65% (Fig. 17), en comparación al control negativo que no presentó alteración en su crecimiento. La evaluación de la actividad inhibitoria de metabolitos volátiles producidos por la cepa C-20 ñ2Th en CEL reveló el mayor porcentaje de inhibición contra *Fusarium verticillioides* hasta un 65% (agrupación *a*). Por otro lado, no existieron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de *Fusarium verticillioides* por efecto de compuestos volátiles producidos por las cepas C-20 ñ2Th en CES y *Pseudomonas rhizosphaerae* en CEL y CES, el cual fluctuó entre el 58-59% (agrupación *b*). Este ensayo permitió evidenciar que los metabolitos volátiles bacterianos obtenidos en CEL y CES (con salvado de trigo como sustrato sólido) afectaron negativamente el crecimiento radial de *Fusarium verticillioides*. Además, se puede observar claramente en la Fig. 16 que, al no existir una interacción directa entre el antagonista y el fitopatógeno, los compuestos volátiles producidos por C-20 ñ2Th y *Pseudomonas rhizosphaerae* en CEL y CES, lograron difundir e inhibir el crecimiento de *Fusarium verticillioides*. Se ha mencionado, que los metabolitos volátiles producidos por los agentes de control biológico tienen un rol importante en la inhibición de fitopatógenos que afectan a las plantas. Estos compuestos se encuentran en el suelo como pequeñas moléculas capaces de difundirse a través de soluciones acuosas y espacios de aire hasta llegar a la atmosfera. El rango efectivo de los compuestos volátiles bacterianos puede ir de micrómetros a metros y actuar sobre los hongos fitopatógenos induciendo fungistasis, inhibiendo la germinación o el crecimiento hifal o ejerciendo efectos fungicidas (Garbeva *et al.*, 2011).

La tecnología de CEL y CES es generalmente empleada para la producción de metabolitos bioactivos microbianos, sin embargo, los metabolitos extraídos son generalmente de tipo soluble. En el presente trabajo de investigación, se ha demostrado que el empleo de sistemas de CEL y CES son efectivos para la producción de metabolitos solubles, y además volátiles con actividad inhibitoria efectiva contra *Fusarium verticillioides*. Es así CEL y CES pueden ser empleados a la vez para la extracción de metabolitos solubles y volátiles.



**Figura 16.** Sistema cerrado de dos viales: Inhibición de *Fusarium verticillioides* por metabolitos volátiles producidos en **A.** CEL y **B.** CES por las cepas **(a.)** C-20 ñ2Th y **(b.)** *Pseudomonas rhizosphaerae*. **c.** control negativo de *Fusarium verticillioides*.



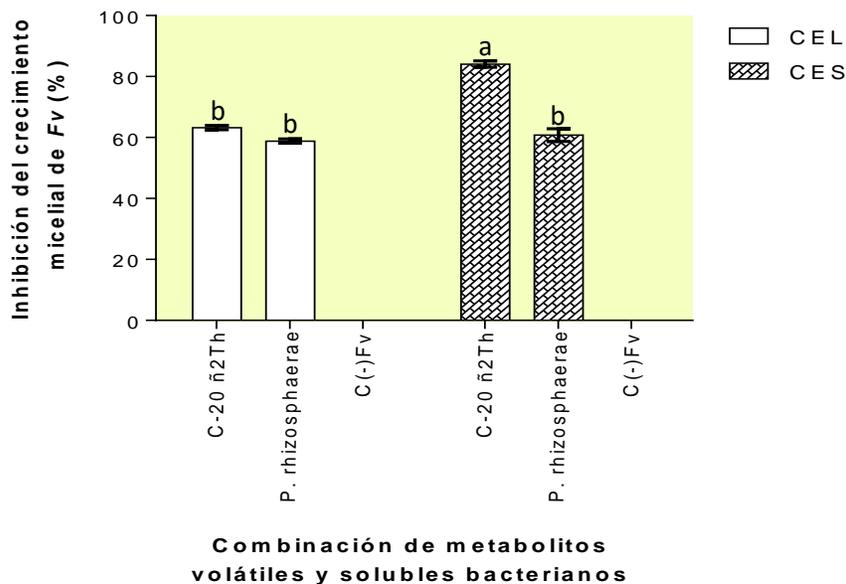
**Figura 17.** Efecto inhibitorio de metabolitos volátiles producidos por C-20 ñ2Th y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) en CEL y CES contra el crecimiento de *Fusarium verticillioides* (Fv). Las barras representan la media y la desviación estándar de tres replicas. Letras no comunes indican diferencias significativas para la prueba Tukey ( $p < 0,05$ ).

Los compuestos volátiles bacterianos tienen alta presión de vapor, son difusibles en aire y agua, altamente reactivos, lo cual hace difícil su aplicación en campo abierto. Muchas de las evaluaciones respecto a la actividad inhibitoria de metabolitos volátiles bacterianos contra el crecimiento de fitopatógenos emplean sistemas cerrados donde desarrollan el antagonista y el patógeno en compartimentos separados, o alternativamente se emplean metabolitos volátiles purificados (Park, Dutta, Ann, & Raaijmakers, 2015). Actualmente, se ha descrito que las formulaciones de compuestos volátiles bacterianos pueden adecuarse a aquellos procesos que se emplean para moléculas similares como las feromonas y aromas alimenticios, entre estas técnicas se encuentran la microencapsulación o la tecnología de sol-gel. Estas formulaciones permiten obtener perlas o matrices que concentran estos compuestos volátiles para ser aplicadas aplicarse en campo abierto, viveros, en zonas de almacenamiento de productos agrícolas y otros (Sharifi & Ryu, 2018).

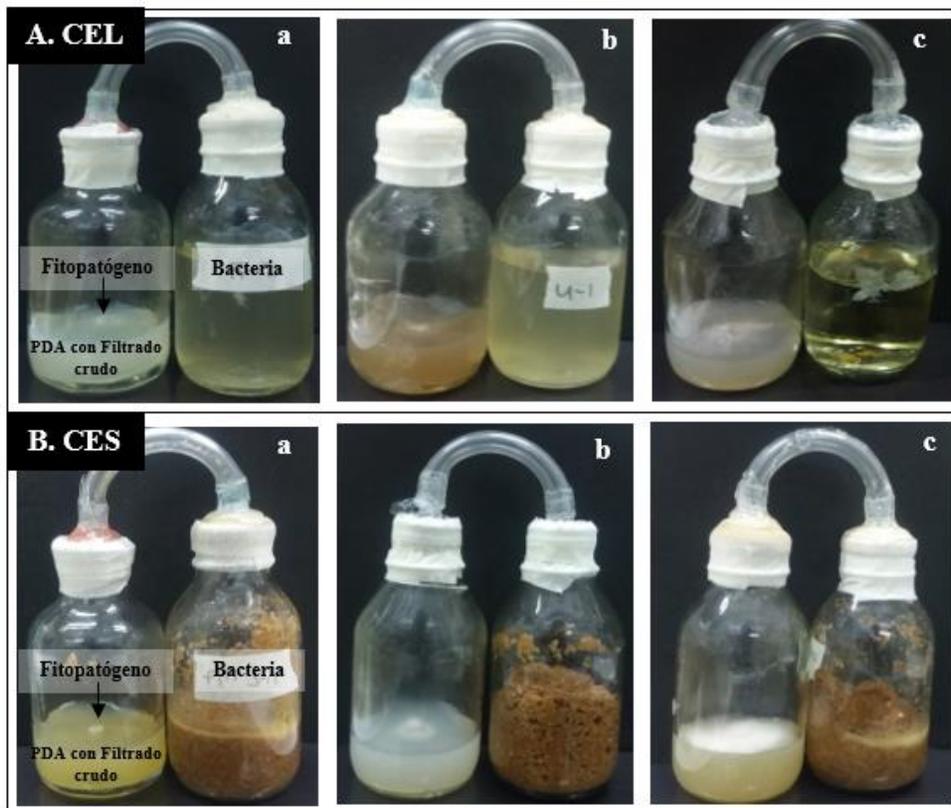
#### **6.4.2 Inhibición de *Fusarium verticillioides* por el efecto combinado de metabolitos solubles y volátiles**

Muchas bacterias asociadas a las plantas o del suelo producen una amplia gama de metabolitos secundarios bioactivos, tanto solubles como volátiles, que tienen funciones ecológicas diversas e importantes, como la protección de las plantas ante la invasión de los patógenos. Por un lado, los metabolitos volátiles son pequeñas moléculas que pueden evaporarse y difundir fácilmente a través de los poros del suelo y llegar a largas distancias. En contraste, los metabolitos secundarios solubles tienen una mayor polaridad solubilizándose en el agua, se acumulan alrededor de la planta y actúan a distancias más cortas. Se ha reportado que el sinergismo entre ambos compuestos, solubles y volátiles, exhibe una actividad antimicrobiana mejorada. Pero, existe muy poca investigación sobre la aplicación combinada de compuestos volátiles y solubles en la agricultura (Tyc, Song, Dickschat, Vos, & Garbeva, 2016). Por ello, en el presente trabajo de investigación se evaluó la inhibición de *Fusarium verticillioides* por el efecto combinado de metabolitos solubles y volátiles producidos por las cepas C-20 ñ2Th y *Pseudomonas rhizosphaerae* en CEL y CES para determinar las condiciones más propicias en el desarrollo de compuestos antifúngicos.

La combinación de metabolitos volátiles y solubles producidos por las cepas C-20 ñ2Th y *Pseudomonas rhizosphaerae* en CEL y CES tiene un efecto aditivo para inhibir el crecimiento de *Fusarium verticillioides* entre el 59 al 84%, en comparación al control negativo de *Fusarium verticillioides* donde no existió alteración en su crecimiento normal (Fig. 18 y 19). En este ensayo el efecto combinado de metabolitos volátiles y solubles producidos por las cepas C-20 ñ2Th en CEL y *Pseudomonas rhizosphaerae* en CEL y CES, presentaron menores porcentajes de inhibición entre el 59-63% respectivamente, no existiendo diferencias significativas (Fig. 19, agrupación *b*). Sin embargo, el efecto combinado de metabolitos volátiles y solubles producidos por la cepa C-20 ñ2Th en CES presentó mayor actividad contra *Fusarium verticillioides* inhibiéndolo hasta un 84%, con diferencias significativas respecto a las demás evaluaciones (Fig. 18,  $p < 0,05$ , agrupación *a*). Por tanto, en el presente trabajo que evaluó dos tipos de cultivo CEL y CES para la obtención de metabolitos bioactivos de tipo volátil y soluble, el CES empleando salvado de trigo como sustrato, fue la condición optimizada para la cepa C-20 ñ2Th, y el efecto combinado de sus metabolitos solubles y volátiles reveló un incremento de la capacidad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides*.



**Figura 18.** Inhibición de *Fusarium verticillioides* (*Fv*) por el efecto combinado de metabolitos volátiles y solubles producidos por C-20 ñ2Th y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) en CEL y CES. Las barras representan la media y la desviación estándar. Letras no comunes indican diferencias significativas para la prueba Tukey ( $p < 0,05$ ).



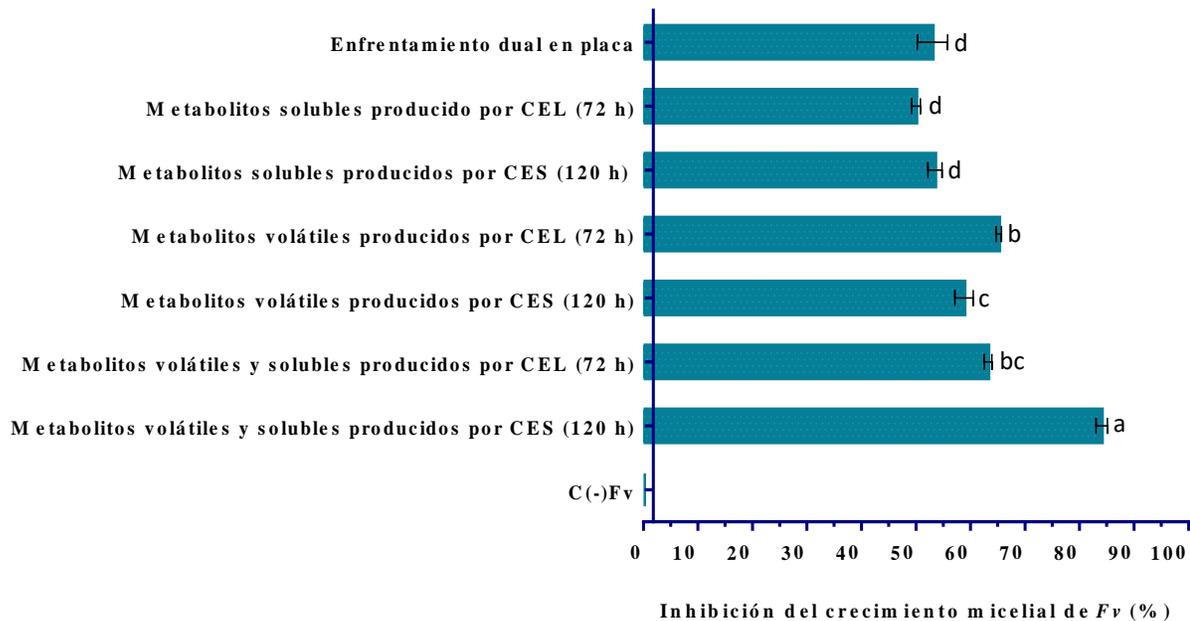
**Figura 19.** Sistema cerrado de dos viales: Inhibición de *Fusarium verticillioides* por la combinación de metabolitos volátiles y solubles crudos producidos en **A. CEL** y **B. CES** por las cepas **(a.)** C-20 ñ2Th y **(b.)** *Pseudomonas rhizosphaerae*. **c.** control negativo de *Fusarium verticillioides*.

### 6.5 Estrategias de cultivo para la producción de metabolitos inhibidores de *Fusarium verticillioides*

El desarrollo de bioplaguicidas para el control biológico de enfermedades que afectan a cultivos agrícolas es el futuro para una agricultura sostenible y tiene una relación estrecha con el estudio y la explotación de la biotecnología moderna desde el aislamiento y selección del microorganismo, la determinación de las condiciones óptimas de crecimiento, la selección de medios de cultivo y condiciones operacionales, entre otros. En ese sentido, se emplea la tecnología de cultivo en estado líquido (CES) y sólido (CEL) para la producción biomasa o compuestos del metabolismo microbiano. Durante el desarrollo del presente trabajo de investigación, se seleccionaron bacterias endófitas por su potencial inhibitorio directo contra *Fusarium verticillioides*. En base ello, se propusieron y evaluaron diferentes estrategias de cultivo para la obtención de metabolitos bioactivos contra el crecimiento de *Fusarium verticillioides*. Como se observa en la Fig. 20, los metabolitos solubles y volátiles producidos

por la cepa C-20 ñ2Th en CEL y CES afectaron negativamente el crecimiento de *Fusarium verticillioides* con porcentajes de inhibición variables entre el 50-65%. Sin embargo, el efecto combinado de metabolitos volátiles y solubles producidos en CES, resultó en una actividad inhibitoria aditiva con un porcentaje de inhibición del 84%, la cual fue la mejor estrategia operativa a escala laboratorio. El CES se caracteriza por simular el ambiente natural del crecimiento microbiano y por ende la secreción de metabolitos bioactivos demostró ser más eficiente. La combinación de metabolitos bioactivos solubles y volátiles podría resultar en una alternativa para el control de *Fusarium verticillioides*.

En definitiva, el manejo de futuras enfermedades que afectan los cultivos agrícolas no solo se basara en el uso de agentes biológicos, como los microorganismos, sino en el empleo de metabolitos bioactivos de tipo soluble y volátil, en formulaciones sólidas o líquidas, que serán empleadas para el control de enfermedades.



**Figura 20.** Estrategias operativas para la inhibición de *Fusarium verticillioides* (*Fv*) empleando metabolitos bioactivos producidos por la cepa C-20 ñ2Th. Las barras representan la media y la desviación estándar. Letras no comunes indican diferencias significativas para la prueba Tukey ( $p < 0,05$ ).

## 6.6 Características fisiológicas, bioquímicas y antagonistas de bacterias endófitas seleccionadas

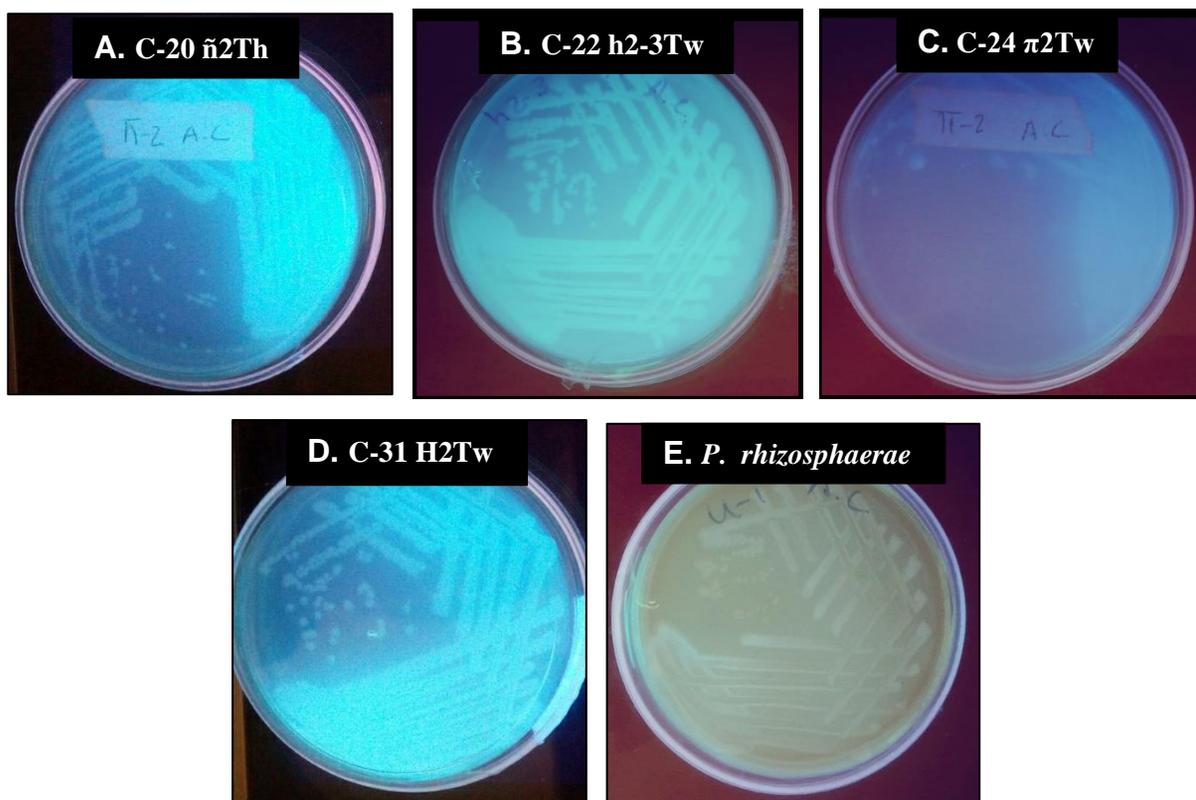
Para concluir el presente trabajo de investigación, se evaluaron las propiedades fisiológicas y bioquímicas para la caracterización de las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31

H2Tw seleccionadas por su capacidad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides*. Como se muestra en la Tabla 3, las cepas bacterianas seleccionadas y *Pseudomonas rhizosphaerae* desarrollaron a temperaturas de 6, 28 y 37°C. Asimismo, las cepas bacterianas desarrollaron levemente en Agar MacConkey, sin fermentar lactosa. Se reporta que los bacilos gram-negativos con leve o no desarrollo en agar MacConkey pertenecen al grupo de los no fermentadores (Koneman *et al.*, 2006). Para confirmar que las cepas bacterianas pertenecen a este grupo se empleó el test O/F basado en la oxidación y fermentación de la glucosa descrito por Hugh & Leifson. Se reveló que todas las cepas bacterianas y *Pseudomonas rhizosphaerae* poseen la capacidad de oxidar glucosa, pero no son fermentadoras. Por tanto, las cepas bacterianas evaluadas se clasifican como bacilos gram-negativos no fermentadores. Se ha descrito que los bacilos gram-negativos no fermentadores como los del género *Pseudomonas*, constituyen un grupo microorganismos aerobios que no necesariamente utilizan hidratos de carbono como fuente de energía o los degradan a través de vías metabólicas distintas a la fermentación. Por otro lado, las cepas endófitas bacterianas desarrollaron en agar selectivo Cetrimida, y se observó la producción de pigmentos fluorescentes, en contraste a *Pseudomonas rhizosphaerae* que no produce pigmentos fluorescentes (Fig. 21), lo que revela que las cepas seleccionadas pertenecen al género *Pseudomonas* del grupo fluorescente.

Por otro lado, respecto a las propiedades bioquímicas, las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* poseen actividades catalasa y oxidasa positivas, asimismo, las cepas bacterianas evaluadas poseen motilidad, hidrolizan caseína y gelatina, excepto las cepas C-24 π2Tw con respuesta variable a hidrólisis de gelatina y *Pseudomonas rhizosphaerae* que no presentó actividad gelatinasa. Adicionalmente, se observó una respuesta negativa a la producción de H<sub>2</sub>S e Indol. En medio TSI se observó crecimiento abundante de las cepas bacterianas sobre la superficie del agar, pero no existió acidificación del medio, lo que confirma su naturaleza no fermentadora (Tabla 3).

Las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw y C-31 H2Tw presentaron características fisiológicas y bioquímicas similares entre sí (Tabla 3). Así como morfología macro y microscópica similar (sección 6.2.2.). Contrariamente, a pesar de que las características fisiológicas y bioquímicas, excepto la respuesta a hidrólisis de gelatina, fueron similares para la cepa C-24 π2Tw respecto a las demás bacterias evaluadas, existieron diferencias en sus características morfológicas

macroscópicas. Las cepas en estudio presentaron características fisiológicas y bioquímicas similares a *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas rhizosphaerae*, sin embargo, para asignación de especie y su ubicación taxonómica son necesarias pruebas moleculares adicionales, aun así, no todas las cepas de una misma especie podrían poseer características homogéneas. Dados los problemas inherentes que presentan los sistemas de identificación fenotípicos, los métodos moleculares son empleados como procedimientos complementarios, alternativos o incluso de referencia. El ARN ribosómico (ARNr) 16S es la macromolécula más ampliamente utilizada en estudios de filogenia y taxonomía bacterianas actuando como un marcador eficiente de evolución. Su estructura y función han permanecido constantes durante un tiempo muy prolongado (Rodicio & Mendoza, 2004; Reller, Weinstein, & Petti, 2007). Sin embargo, la identificación molecular de las cepas en estudio queda pendiente para futuras investigaciones.



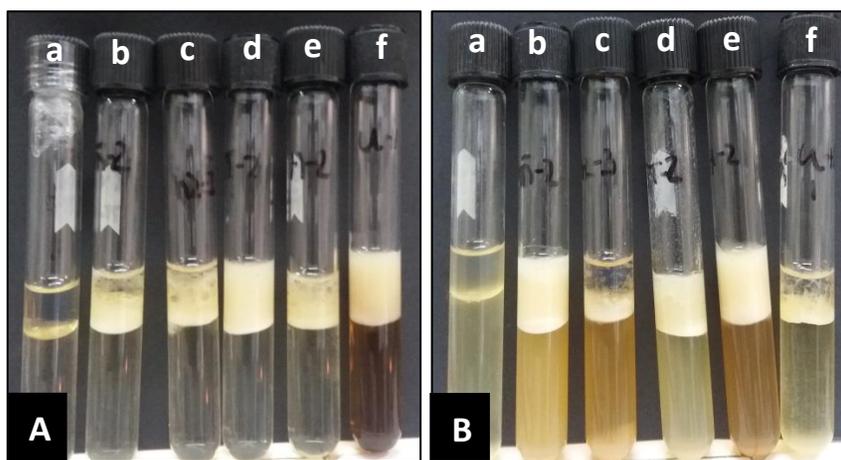
**Figura 21.** Pigmento fluorescente de las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) bajo luz UV en medio agar Cetrimida.

El género *Pseudomonas* posee un metabolismo adaptativo y produce una gran variedad de compuestos antifúngicos para el control biológico de patógenos. Por ello, en el presente

trabajo de investigación se evaluó las propiedades antagonistas de las cepas que inhiben a *Fusarium verticillioides*. En primer lugar, se determinó la capacidad de producción de biosurfactantes por las cepas bacterianas en estudio y *Pseudomonas rhizosphaerae*. Los resultados obtenidos como se muestra en la Tabla 3, revelan que solo las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw y C-31 H2Tw formaron halos de hemólisis en agar sangre y no así las cepas C-24 π2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae*. La formación de halos de hemólisis es provocada por la disminución de la tensión superficial y el rompimiento de la membrana de los hematíes del medio a causa de los biosurfactantes secretados. El crecimiento de bacterias productoras de biosurfactantes en agar sangre es un método útil para la selección preliminar de estos microorganismos; más no se considera un método definitivo por las limitaciones que tiene, debido a que no todas las bacterias con actividad hemolítica son productoras de biosurfactantes, ya que otro tipo de compuestos también pueden causar hemólisis (Narendra, Swapna, Khan, Reddy, & Hameeda, 2015). Otro método de detección preliminar de la producción de biosurfactantes es la actividad lipolítica. Los resultados obtenidos muestran que las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae*, sembradas en agar Tween 80, poseen actividad lipolítica positiva revelada mediante la formación de un halo transparente que indica la degradación de lípidos del medio, posiblemente para la síntesis de ácidos grasos que conforman la estructura del biosurfactante. Debido a que no todos los cultivos con actividad lipolítica presentaron actividad hemolítica, la producción de biosurfactantes fue evaluada en medio mínimo de sales suplementado con glicerol como fuente de carbono, en ese sentido los sobrenadantes libres de células de C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* mostraron capacidad emulsificante del diésel (Tabla 3), por la formación de anillos de emulsificación entre los dos líquidos inmiscibles que se mantuvieron estables y densos por más de 24 horas. Como resultado, esta evaluación permitió establecer que las cepas bacterianas en estudio y *Pseudomonas rhizosphaerae* son productoras de biosurfactantes como metabolitos secundarios.

Adicionalmente, en el presente estudio se evaluó la capacidad emulsificante de los filtrados crudos bacterianos, producidos por CEL y CES, empleando diésel. Los resultados obtenidos revelaron que los filtrados crudos de las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* producidos por CEL y CES mostraron actividad

emulsificante positiva sobre el diésel (Fig. 22). Esto demuestra que entre los distintos metabolitos bioactivos solubles producidos por CEL y CES de las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae*, se encuentran los biosurfactantes que posiblemente están involucrados en la inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides*. Se ha reportado que los biosurfactantes tienen la capacidad de modificar las propiedades de un medio líquido o su interfase, reduciendo la tensión superficial. Esta condición permite a los biosurfactantes penetrar e intercalarse dentro de la membrana plasmática de las estructuras reproductivas del fitopatógeno, conduciendo al rompimiento de la membrana y la liberación del contenido citoplasmático (Rivera, Martínez, Osorio, & Martínez, 2010; Martínez & Osorio, 2007).



**Figura 22.** Prueba de emulsificación positiva de diésel, producida por los filtrados crudos bacterianos obtenidos por: A. Cultivo líquido (CEL) y B. Cultivo en estado sólido (CES). **a.** Control negativo (medio de cultivo sin inoculación), **b.** C-20 ñ2Th, **c.** C-22 h2-3Tw, **d.** C-24 π2Tw, **e.** C-31 H2Tw y **f.** *Pseudomonas rhizosphaerae*.

Por otro lado, también se evaluaron otras propiedades antagonistas como la producción de cianuro de hidrogeno y amoníaco por las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae*. Estos metabolitos bioactivos volátiles son de tipo inorgánico y su producción ha sido descrita para algunas especies del género *Pseudomonas*. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 3 las cepas bacterianas en estudio y *Pseudomonas rhizosphaerae* fueron negativas a la producción de cianuro de hidrogeno y amoníaco.

El género *Pseudomonas* se encuentra entre los grupos más importantes de bacterias que contribuyen a la defensa natural de las raíces de las plantas (Weller *et al.*, 2007). Estas bacterias se hallan en la rizósfera y en el interior de los tejidos vegetales, poseen una

maquinaria de control biológico de vanguardia contra muchos patógenos del suelo (Mishra & Arora, 2017). Se ha reportado que especies de *Pseudomonas* poseen muchas características, por lo que son consideradas como agentes de biocontrol y promotores del crecimiento vegetal, tienen la capacidad de crecer rápidamente utilizando exudados de semillas y raíces, colonizando y multiplicándose en la rizósfera o en el interior de la planta, produciendo a su vez un amplio espectro de metabolitos bioactivos (antibióticos, sideróforos, sustancias volátiles, biosurfactantes y promotoras del crecimiento), compiten agresivamente con otros microorganismos, sobreviven en diferentes condiciones ambientales y también inducen resistencia sistémica en las plantas. Por tanto, estos microorganismos son utilizados para el desarrollo de bioinoculantes, para reducir las enfermedades de cultivos agrícolas causadas por fitopatógenos (Villa, Frías, & González, 2005; Madbouly, 2018; Weller, 2007).

El género *Pseudomonas* tienen la capacidad de sintetizar un amplio espectro de metabolitos bioactivos que están involucrados en la inhibición de hongos patógenos de las plantas mediante la inhibición de la germinación de las esporas, lisis de micelios fúngicos o ejerciendo efectos fungicidas (Mishra & Arora, 2017; Santoyo, Orozco, & Govindappa, 2012). Por ejemplo, Jain & Das, (2016) menciona que las *Pseudomonas* productoras de fenazina contribuye a la supresión natural del marchitamiento provocado por *Fusarium sp.* En el presente trabajo de investigación se reporta que los metabolitos bioactivos producidos por las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw C-24 π2Tw y C-31 H2Tw pertenecientes al género *Pseudomonas* y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control), inhiben el crecimiento de *Fusarium verticillioides*, siendo una alternativa biotecnológica, para el control biológico de *Fusarium verticillioides*. El uso de metabolitos bioactivos bacterianos para reducir enfermedades en varios cultivos de importancia agronómica y disminuir el uso de agroquímicos se considera uno de los métodos más prometedores en las prácticas de manejo de cultivos. La prioridad de la agricultura moderna es la protección de los cultivos agrícolas frente a los fitopatógenos y su erradicación mediante enfoques alternativos y ecológicos.

**Tabla 3.** Características fisiológicas, bioquímicas y antagonistas de las cepas bacterianas endófitas C-20 n2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw seleccionadas por su capacidad de inhibir a *Fusarium verticillioides*.

CARACTERÍSTICAS	C-20 n2Th	C-22 h2-3Tw	C-24 π2Tw	C-31 H2Tw	<i>P. rhizosphaerae</i> Este estudio	<i>P. rhizosphaerae</i> IH5 <sup>T</sup> Peix <i>et al.</i> , 2003	<i>P. fluorescens</i> Koneman <i>et al.</i> , (2006)
<b>Propiedades fisiológicas</b>							
Temperatura de crecimiento (C)							
6	+	+	+	+	+	+	+
28	+	+	+	+	+	ND	+
37	+	+	+	+	+	ND	+
42	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento en medio selectivo							
Agar MacConkey	+	+	+	+	+	ND	+
Agar Cetrimida	+	+	+	+	+	ND	+
Pigmento fluorescente	+	+	+	+	-	-	+
Tipo de metabolismo	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo	Oxidativo	ND	Oxidativo
<b>Propiedades bioquímicas</b>							
Oxidasa	+	+	+	+	+	-	+
Catalasa	+	+	+	+	+	ND	+
TSI	-	-	-	-	-	ND	-
Producción de H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-	ND	-
Producción de Indol	-	-	-	-	-	ND	-
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólisis de caseína	+	+	+	+	-	-	+
Hidrólisis de gelatina	+	+	+/-	+	-	-	+
<b>Propiedades antagonistas</b>							
Hemólisis	+	+	-	+	-	ND	+
Hidrólisis de lípidos	+	+	+	+	+	ND	+
Capacidad emulsificante	+	+	+	+	+	ND	+
Producción de HCN	-	-	-	-	-	ND	-
Producción de Amoníaco	-	-	-	-	-	ND	-

**Nota:** "+" Positivo para el crecimiento y / o actividad, "-" No hay crecimiento o actividad y "+/-" crecimiento o actividad baja. ND: no determinado.

Fuente: Elaboración propia.

## 7. Conclusiones

- a) En el presente estudio, cuatro cepas bacterianas endófitas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw fueron seleccionadas por su actividad inhibitoria directa contra *Fusarium verticillioides*, presentando porcentajes de inhibición superiores al 50%.
- b) Entre las diferentes estrategias de cultivo evaluadas para la producción de metabolitos bioactivos producidos por las cepas seleccionadas, se concluye que:
- El CEL en etapa de idiofase permitió producir metabolitos solubles, empleando las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw, que exhibieron porcentajes de inhibición entre el 45-50% contra *Fusarium verticillioides*.
  - El empleo de salvado de trigo como sustrato sólido en CES permitió obtener metabolitos solubles, producidos por las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw, capaces de inhibir el crecimiento de *Fusarium verticillioides* entre el 52-54%.

La evaluación preliminar de la actividad inhibitoria de metabolitos volátiles orgánicos producidos por las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw frente a *Fusarium verticillioides* revelaron porcentajes de inhibición elevados entre el 87-90%.

- Los metabolitos volátiles producidos por el endofito C-20 ñ2Th en CEL y CES, empleando salvado de trigo como sustrato sólido, inhibieron el crecimiento de *Fusarium verticillioides* entre el 59-65%.
  - La evaluación de la inhibición de *Fusarium verticillioides* por el efecto combinado de metabolitos volátiles y solubles producidos por la cepa C-20 ñ2Th en CEL y CES reveló porcentajes de inhibición entre el 63-84%, siendo el CES la mejor condición para la producción de metabolitos solubles y volátiles para la cepa C-20 ñ2Th con mayor actividad inhibitoria contra *Fusarium verticillioides* (84%).
- c) Las cepas en estudio C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw presentaron características fisiológicas y bioquímicas similares al género *Pseudomonas*. Entre las propiedades antagónicas, las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw y C-31 H2Tw son productoras de biosurfactantes, enzimas hidrolíticas y metabolitos bioactivos solubles y volátiles.

## 8. Análisis prospectivo del impacto de la investigación

El maíz es el cereal más importante y tradicional cultivado en diferentes regiones de Bolivia, constituye una fuente importante de nutrientes, tanto para consumo humano como animal, comercial e industrial. Según el Instituto Nacional de Estadística (INE) en su última encuesta relata que la superficie de maíz sembrada en el año 2017-2018 alcanzó las 462.187,00 ha con una producción de 1.260.926,00 toneladas métricas y un rendimiento de 2,728 t/ha. En nuestro país el rendimiento en la producción de maíz es limitado en relación a los principales productores de maíz, siendo EEUU líder en productividad con 10,64 t/ha, seguido por Argentina con 8,19 t/ha y Brasil con 5,37 t/ha (EMAPA, 2018), considerando que estos países son los principales productores de maíz transgénico.

Las sequías, vientos, escasa precipitación durante el ciclo del cultivo, baja fertilidad de suelo, presencia de plagas y enfermedades afecta el rendimiento del cultivo de maíz en nuestro País. Entre estas condiciones adversas, se destaca la incidencia de plagas en el maíz, como el gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) y enfermedades, como *Fusariosis*, que en los cultivos de maíz provocan pérdidas considerables en el rendimiento alcanzando el 50% e inclusive hasta el 100%, si no existe un control fitosanitario adecuado. Este hecho ha obligado al productor, a realizar resiembras con la consecuente pérdida de recursos, esfuerzos y tiempo. Como consecuencia, se invierten recursos económicos para emplear medidas fitosanitarias, entre ellas, el uso de pesticidas químicos con 3 a 4 aplicaciones, que afectan al ecosistema y la biodiversidad.

Una interesante alternativa de control de plagas y enfermedades es el control biológico que permite reducir las pérdidas de los cultivos. El Centro de Investigaciones Agrícola Tropical (CIAT) propone dos nuevas alternativas para reducir la incidencia del gusano cogollero en los cultivos de maíz con el uso de feromonas y enemigos naturales como agentes de control biológico. Sin embargo, el cultivo de maíz es susceptible a la infección de una gran variedad de plagas como es la afectación de gran importancia por *Fusarium sp.* que reduce la calidad del grano. Por ello, es necesario contar con nuevas alternativas para su control. Entre estas alternativas, se propone el uso de metabolitos bioactivos producidos por bacterias endófitas, que ha demostrado ser eficiente para el control de *Fusarium verticillioides in vitro* inhibiendo su crecimiento en un 50-84% aproximadamente, empleando diferentes estrategias de cultivo,

como se observó en el presente trabajo (sección 6.5). Entre las diferentes estrategias evaluadas en el presente trabajo, el cultivo en estado sólido demostró ser efectivo para la producción de filtrados bacterianos conteniendo metabolitos bioactivos, con capacidad biofungicida de *Fusarium verticillioides*. Por ello, se realizó una estimación básica de los costos de producción del filtrado bacteriano (250 L/mensuales) que podría ser producido en el Laboratorio de Biotecnología Microbiana (IIFB). Como se muestra en el Anexo 3, un litro de filtrado bacteriano, producido en cultivo en estado sólido empleando salvado de trigo como sustrato, tendría un costo de 1,70 Bs., esta estimación incluye insumos básicos (sustrato, agua, filtros, electricidad) y excluye el costo de mano de obra, otros insumos menores (material de vidrio, etc.), transporte y otros (infraestructura y equipamiento básico). Sin embargo, es importante mencionar que el empleo de residuos agroindustriales (salvado de trigo) puede ser rentable.

Es así, que de emplearse este filtrado bacteriano para el control de *fusariosis* en cultivos de maíz, por su efectividad demostrada en laboratorio podría mejorar la productividad y la calidad del grano, si el producto es evaluado en campo. Actualmente, el rendimiento del cultivo de maíz es de 2,728 t/ha, para ello se invierte alrededor de 421,5 \$/ha teniendo un ingreso bruto de 490 \$/ha y una utilidad de 68,5 \$/ha, resultando en ingresos muy bajos para el productor (Tabla 4). Ahora, considerando que este rendimiento (2,728 t/ha) sólo representa el 50% de producción, ya que las pérdidas alcanzan el restante 50%, debido a la incidencia enfermedades, entre ellas *fusariosis*. La aplicación del filtrado bacteriano, producido por *Pseudomonas sp.* en cultivo en estado sólido, podría recuperar el 25% de esas pérdidas, tomando en cuenta que en este estudio se ha demostrado un porcentaje de inhibición de *Fusarium verticillioides* superior al 50%. Esto significaría, un incremento del rendimiento en la producción de maíz de aproximadamente 4,092 t/ha (75% de producción y 25% de pérdidas) con una inversión de 496,5 \$/ha que incluye el costo del filtrado bacteriano estimado en 75 \$/ha (de acuerdo a la densidad de plantación). La cantidad del producto a utilizar, fue estimada tomando en cuenta el volumen del producto empleado para la inhibición de *Fusarium verticillioides in vitro* en un área determinada, y fue relacionado con el número de plantas por hectárea (densidad de plantación), para una estimación real estos datos pueden ser utilizados preliminarmente para la evaluación de efectividad del producto. En conclusión, en base a esta estimación (Tabla 4), el producto (filtrado bacteriano con capacidad biofungicida) con un costo estimado de 75 \$/ha mejoraría el ingreso bruto a 716,1 \$/ha con una utilidad de

219,6 \$/ha mayor a la actual (68,5 \$/ha), sin embargo, en esta prospección tendría que considerarse que al aumentar el rendimiento en la producción de maíz el costo de operaciones en la cosecha y transporte también podría incrementarse.

El uso de metabolitos bioactivos provenientes de microorganismos categorizados como agentes de control biológico, para la prevención de enfermedades que afectan cultivos agrícolas no solo incrementará el rendimiento y los ingresos económicos del productor, sino también al sustituir el uso de plaguicidas químicos, reducirá el impacto ambiental. La demanda consiente del consumidor relacionada con el impacto negativo de los plaguicidas químicos sobre el medio ambiente y la salud humana, incrementará la demanda por bioplaguicidas de origen natural. Sin embargo, actualmente en nuestro país los bioplaguicidas sólo representan menos del 5% del mercado entre los productos para la protección de los cultivos. Esta situación conlleva a la necesidad del desarrollo de nuevas investigaciones para búsqueda de agentes para el control biológico.

**Tabla 4.** Análisis prospectivo del empleo de bifungicidas en el control biológico de fusariosis

<b>PRODUCCIÓN DE MAÍZ</b>				
	<b>Rendimiento (t/ha)</b>	<b>Inversión (\$/ha)</b>	<b>Ingreso bruto (\$/ha)</b>	<b>Utilidad (\$/ha)</b>
<b>Datos operativos actuales (Agronegocios, 2018)</b>	2,728	421,5	490	68,5
<b>Prospección del uso de Biofungicida (esta investigación)</b>	4,092	496,5*	716,1	219,6

\*Esta cifra incluye el costo del biofungicida que es 75 \$/ha.

## 9. Referencias bibliográficas

- Abanda**, N. D., Krimm, U., Schreiber, L., & Wilfried, S. (2006). Dual antagonism of aldehydes and epiphytic bacteria from strawberry leaf surfaces against the pathogenic fungus *Botrytis cinerea* *in vitro*. *BioControl*, 279-291.
- Abrunhosa**, L., Morales, H., Soares, C., Calado, T., Vila-Chã, A. S., & Pereira, M. y. (2012). Micotoxinas detectadas en productos alimenticios en Portugal: revisión. *Rev. Bio Ciencias*, 5-31.
- Afolabi**, C. G., Bandyopadhyay, R., Leslie, J. F., & Ekpo, E. J. (2006). Effect of Sorting on Incidence and Occurrence of Fumonisin and *Fusarium verticillioides* on Maize from Nigeria†. *Journal of Food Protection*, 2019-2023.
- Agricultura en Bolivia es el tercer pilar económico.** (2017). Obtenido de EABOLIVIA.COM: <http://www.eabolivia.com/economia/17242-agricultura-en-bolivia-es-tercer-pilar-economico.html>
- Agronegocios.** (30 de Septiembre de 2017). *Estudio revela creciente importancia del maíz y siembra sin control de OGM.* Obtenido de Negocios: <https://agronegocios.com.bo/estudio-revela-creciente-importancia-del-maiz-y-siembra-sin-control-de-ogm/>
- Agronegocios.** 2018.
- Aguaysol**, N. C., Gonzáles, V., De Lisi, V., Reznikov, S., Stegmayer, C. A., Henríquez, D., & Ploper, L. D. (2013). Incidencia de *Fusarium verticillioides* y *Fusarium graminearum* en granos de híbridos comerciales de maíz, cosechados en la campaña 2011/2012 en seis localidades de las provincias de tucumán y salta. *Publicación Especial EEAOC N° 46* .
- Alvarez**, M., Rodrigo, G., Huici, O., Barbieri, F., & Renjel, E. S. (2010). Plaguicidas Organofosforados en los cultivos de tomates. *Investigación Científica- PlagBol*, 1-40.
- Alviz**, M. L., Pérez, G. A., & Pérez, C. A. (2017). Efecto inhibitorio de compuestos tipo metabolitos de bacterias endófitas contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Burkholderia glumae*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 18-25.
- Arroyo**, M. N., Huertas, P. J., Gámiz, G. L., & García, C. A. (2014). Control de micotoxinas en alimentos. *Boletín GRASEQA N° 7*, 16-31.
- Ascarrunz**, M. E., Tirado, N., Gonzáles, A. R., Cuti, M., Cervantes, R., Huici, O., & Jors, E. (2006). Evaluación de riesgo genotóxico: biomonitorización de trabajadores agrícolas de

Caranavi, Guanay, Palca y Mecapaca, expuestos a plaguicidas. *Cuadernos del hospital de clinica*, 7-18.

**Audrain**, B., Farag, M. A., Ryu, C. M., & Ghigo, J. M. (2015). Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology. *FEMS Microbiology Reviews*, 1-12.

**Bach**, E., Dubal, d. S., De Carvalho, F. G., Brito, L. B., & Pereira, P. L. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology*, 141-149.

**Backman**, P. A., & Sikora, R. A. (2008). Endophytes: An emerging tool for biological control. *Biological Control*, 1-3.

**Bacon**, C. W., & Hinton, D. M. (2011). *Bacillus mojavensis*: Its Endophytic Nature, the Surfactins, and Their Role in the Plant Response to Infection by *Fusarium verticillioides*. *D.K. Maheshwari (ed.), Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*, 21-39.

**Bacon**, C. W., Glenn, A. E., & Yates, I. E. (2008). *Fusarium verticillioides*: Managing the endophytic association with maize for reduced fumonisins accumulation. *Toxin Reviews*, 411-446.

**Bacon**, C. W., Hinton, D. M., Glenn, A. E., & Kuldau, G. (2004). Fusaric acid, a *Fusarium verticillioides* metabolite, antagonistic to the endophytic biocontrol bacterium *Bacillus mojavensis*. *NRC Research Press*, 878-885.

**Barraza**, R. Z., Bravo, J. A., & Perez, C. A. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* productora de metabolito con actividad antimicrobiana contra *Burkholderia glumae*. *Revista Colombiana de ciencia animal*, 114-121.

**Becerra**, G. L., & Horna, A. M. (2016). Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. *Scientia Agropecuaria*, 23-31.

**Berg**, G., & Hallmann, J. (2006). Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes. *B. Schulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.) Microbial Root Endophytes, Soil Biology*, 53-69.

**Blacutt**, A. A., Mitchell, T. R., Bacon, C. W., & Gold, S. E. (2016). *Bacillus mojavensis* RRC101 Lipopeptides Provoke Physiological and Metabolic Changes During Antagonism Against *Fusarium verticillioides*. *The American Phytopathological Society*, 713-723.

- Borah**, S. N., Goswami, D., Sarma, H. K., Cameotra, S. S., & Deka, S. (2016). Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to control stalk and ear rot disease of maize. *Frontiers in Microbiology*, 1-10.
- Borries**, I. V., Santos, G. B., Balcázar, M. A., Heredia, G. H., Poma, L. J., & Montaña, N. H. (9 de Febrero de 2018). *Money, diario digital financiero*. Obtenido de Money, diario digital financiero: <https://www.money.com.bo/consumo/2049-la-fao-preve-que-la-produccion-mundial-de-cereales-marcara-nuevo-record>
- Botta**, G., & Gonzalez, M. (2012). Enfermedades fúngicas, bacetrianas, y abióticas del maíz. En G. H. Eyhéabide, *Bases para el Manejo del Cultivo de Maíz* (págs. 125-150). Buenos Aires: INTA.
- Cavaglieri**, L. R., Passone, A., & Etcheverry, M. G. (2004). Correlation between screening procedures to select root endophytes for biological control of *Fusarium verticillioides* in *Zea mays* L. *Biological Control*, 259-267.
- Cavaglieri**, L., Orlando, J., Rodríguez, M. I., Chulze, S., & Etcheverry, M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 178-754.
- Cervantes**, M. R. (2010). Plaguicidas en Bolivia: sus implicaciones en la salud, agricultura y medio ambiente. *Revista Virtual REDESMA*, 1-12.
- Chandra**, N. S., Udaya, S. A., Reddy, M. S., Niranjana, S. R., Prakash, H. S., Shetty, H. S., & Mortensen, C. N. (2008). Control of *Fusarium verticillioides*, cause of ear rot of maize, by *Pseudomonas fluorescens*. *Society of Chemical Industry*, 769-775.
- Chang**, W. T., Hsieh, C. H., Hsieh, H. S., & Chen, C. (2009). Conversion of crude chitosan to an anti-fungal protease by *Bacillus cereus*. *World J Microbiol Biotechnol*, 375-382.
- Chebotar**, V. K., Malfanova, N. V., Shcherbakov, A. V., Ahtemova, G. A., Borisov, A. Y., Lugtenberg, B., & Tikhonovich, I. A. (2015). Endophytic Bacteria in Microbial Preparations that Improve Plant Development . *Applied Biochemistry and Microbiology*, 271-277.
- Cho**, G., Kim, J., Park, C. G., Nislow, C., Weller, D. M., & Kwak, Y. S. (2017). Caryolan-1-ol, an antifungal volatile produced by *Streptomyces spp.*, inhibits the endomembrane system of fungi. *Open Biology*, 1-9.
- Chung**, E. J., Toajjal, H. M., Khan, A., Hyun, K. K., & Ok, J. C. (2015). *Bacillus oryzicola* sp. nov., an Endophytic Bacterium isolated from the roots of rice with antimicrobial, plant growth

promoting, and systemic resistance inducing activities in rice. *The Plant Oathology Journal*, 152-164.

**Cirillo**, T., Ritieni, A., Galvano, F., & Coohieri, R. A. (2003). Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B1 Natural co-occurrence of deoxynivalenol and fumonisins B1. *Food Additives and Contaminants*, 566-571.

**Compant**, S., Clément, C., & Sessitsch. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology & Biochemistry*, 669-678.

**Compant**, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., & Ait, B. E. (2005). Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and environmental microbiology*, 4951-4959.

**Cordero**, P., Príncipe, A., Jofré, E., Mori, G., & Fischer, S. (2014). Inhibition of the phytopathogenic fungus *Fusarium proliferatum* by volatile compounds produced by *Pseudomonas*. *Arch Microbiol* , 803-809.

**Cuevas**, A. (2 de Diciembre de 2015). Identifican en lechugas de La Paz 4 tipos de plaguicidas. Obtenido de La Razón: [http://www.la-razon.com/sociedad/Salud-identifican-lechugas-La\\_Paz-tipos-plaguicidas\\_0\\_2391960816.html](http://www.la-razon.com/sociedad/Salud-identifican-lechugas-La_Paz-tipos-plaguicidas_0_2391960816.html)

**Cumagun**, C. J., Ramos, J. S., Dimaano, A. O., Munaut, F., & Hove, F. V. (2009). Genetic characteristics of *Fusarium verticillioides* from corn in the Philippines. *Journal of General Plant Pathology*, 405-412.

**D'Mello**, F. J., Macdonald, A. M., Postel, D., Dijksma, W. T., Dujardin, A., & Placinta, C. M. (1998). Pesticide use and mycotoxin production in *Fusarium* and *Aspergillus* phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 741-751.

**Danesh**, A., Mamo, G., & Mattiasson, B. (2011). Production of haloduracin by *Bacillus halodurans* using solid-state fermentation. *Biotechnol Lett*, 1339-1344.

**De la Torre**, H. M., Sánchez, R. D., Galeana, S. E., & Plasencia, D. I. (2014). Fumonisin-síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-Maíz. *Revista Especializada en Ciencias Químicas - Biológicas*, 77-91.

**De Oliveira**, R. L., Martins, R. G., Nascimento da Silva, V., Braghini, R., Geraldes, T. M., & Correa, B. (2011). Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium*

*verticillioides* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 9-21.

**Deepa**, N., & Sreenivasa, M. Y. (2017). *Fusarium verticillioides*, a Globally Important Pathogen of Agriculture and Livestock: A Review. *Journal of Veterinary Medicine and Research*, 1-8.

**Deras**, F. H. (s.f.). Guía técnica: El cultivo del maíz. Obtenido de <http://repiica.iica.int/docs/b3469e/b3469e.pdf>

**Desjardins**, A. E., & Plattner, R. D. (2000). Fumonisin B1-Nonproducing Strains of *Fusarium verticillioides* Cause Maize (*Zea mays*) Ear Infection and Ear Rot. *J. Agric. Food Chem*, 5773-5780.

**Duncan**, K. E., & Howard, R. J. (2010). Biology of Maize Kernel Infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6-16.

**Duvick**, J. (2001). Prospects for Reducing Fumonisin Contamination of Maize through Genetic Modification. *Environmental Health Perspectives* , 337-342.

**El Bendary**, M. A., Moharam, M. E., & Foda, M. S. (2008). Efficient mosquitocidal toxin production by *Bacillus sphaericus* using cheese whey permeate under both submerged and solid state fermentations. *Journal of Invertebrate Pathology*, 46-53.

**Eljounaidi**, K., Lee, K. S., & Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases – Review and future prospects. *Biological Control* , 62-68.

**Elkahoui**, S., Djébal, N., Yaich, N., Azaiez, S., Hammami, M., Essid, R., & Limam, F. (2014). Antifungal activity of volatile compounds-producing *Pseudomonas P2* strain against *Rhizoctonia solani*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1-12.

EMAPA, Empresa de Apoyo a la Producción de Alimentos. 2018. Programa de Operaciones Anual (POA). Obtenido de: <http://www.emapa.gob.bo/document/auditoria/POA2018.pdf>.

**Etminani**, F., & Harighi, B. (2018). Isolation and Identification of Endophytic Bacteria with Plant Growth Promoting Activity and Biocontrol Potential from Wild Pistachio Trees. *The Plant Pathology Journal*, 208-217.

**Ewuola**, E. O., & Egbunike, G. N. (2010). Effects of dietary fumonisin B1 on the onset of puberty, semen quality, fertility rates and testicular morphology in male rabbits. *Reproduction*, 439-445.

- FAO**, Food and Agriculture Organization of the United Nations (12 de Junio de 2019). Obtenido de <http://www.fao.org/giews/countrybrief/country.jsp?code=UKR>
- Fassio**, A., Carriquiry, A. I., Tojo, C., & Romero, R. (1998). *Maíz: Aspectos sobre fenología*. Montevideo: Editado por la Unidad de Difusión e Información Tecnológica del INIA.
- 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 & Biochemistry*, 955-964.
- Figuroa**, G. R. (2006). Estudio de las especies de *Fusarium* (sección Liseola) aisladas de maíz, control de *Fusarium verticillioides* y fumonisinas mediante extractos de alcaloides de *Lupinus exaltatus*. (Tesis de Maestría). Universidad de Guadalajara. Jalisco-México.
- Figuroa**, L. A. (2011). Escrutinio masivo de un banco de germoplasma para obtener microorganismos antagonistas a *Fusarium verticillioides*. (Tesis de Maestría). Instituto Politécnico Nacional de México.
- Figuroa**, L. A., Cordero, R. J., Martínez, Á. J., López, M. M., Lizárraga, S. G., Félix, G. R., & Maldonado, M. I. (2016). Rhizospheric bacteria of maize with potential for biocontrol of *Fusarium verticillioides*. *SpringerPlus*, 1-12.
- Forero**, R. C. (2015). Evaluación de la capacidad infectiva de *Fusarium spp.* a partir de aislamientos de origen vegetal, humano y animal en modelo murino (ratones BALB/c). (Tesis de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogota Colombia.
- Gamarra**, E. (18 de Septiembre de 2017). *El maíz representa el 2.46% de PIB agrario nacional*. Obtenido de El Día : [https://www.eldia.com.bo/index.php?c=&articulo=El-maiz-representa-el-2.46%--de-PIB-agrario-nacional--&cat=357&pla=3&id\\_articulo=235288](https://www.eldia.com.bo/index.php?c=&articulo=El-maiz-representa-el-2.46%--de-PIB-agrario-nacional--&cat=357&pla=3&id_articulo=235288)
- Garbeva**, P., Gera Hol, W., Termorshuizen, A. J., Kowalchuk, G. A., & De Boer, W. (2011). Fungistasis and general soil biostasis e A new synthesis. *Soil Biology & Biochemistry*, 469-477.
- Ghribi**, D., Abdelkefi Mesrati, L., Mnif, I., Kammoun, R., Ayadi, I., Maktouf, S., & Chaabouni Ellouze, S. (2012). Investigation of Antimicrobial Activity and Statistical Optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 Biosurfactant Production in Solid-State Fermentation. *Hindawi Publishing Corporation*, 1-12.

- Glare**, Travis; Caradus, John; Gelernter, Wendy; Jackson, Trevor; Keyhani, Nemat; Kohl, J.; Marrone, Pamela; Morin, Louise; Stewart, Alison. (2012). Have biopesticides come of age? *Trends in Biotechnology*, 250-258.
- Glenn**, A. E., Richardson, E., & Bacon, C. W. (2004). Genetic and morphological characterization of a *Fusarium verticillioides* conidiation mutant. *Mycologia*, 968-980.
- Guacho**, A. E. (2014). Caracterización agro-morfológica del maíz (*Zea mays L.*) de la localidad san José de Chazo. (Tesis de Licenciatura). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba – Ecuador.
- Guerra**, L. M., & Zúñiga, D. D. (2018). Producción de *Pseudomonas sp.* LMTK32 en medio modificado para peletizar semillas de maca (*Lepidium meyenii* Walp.). *Revista peruana de biología*, 161-168.
- Gutierrez**, L. (2018). Agricultura en Bolivia . Obtenido de Academia: [http://www.academia.edu/9300710/AGRICULTURA\\_EN\\_BOLIVIA](http://www.academia.edu/9300710/AGRICULTURA_EN_BOLIVIA)
- Haas**, D., & Keel, C. (2003). Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas spp.* and relevance for biological control of plant disease. *Rev. Phytopathol.*, 117-153.
- Haque**, M., Lee, J., & Cho, K. (2015). Endophytic bacterial diversity in Korean kimchi made of Chinese cabbage leaves and their antimicrobial activity against pathogens. *Food Control*, 24-33.
- Harish**, S., Kavino, M., Kumar, N., Saravanakumar, D., Soorianathasundaram, K., & Samiyappan, R. (2008). Biohardening with Plant Growth Promoting Rhizosphere and Endophytic bacteria induces systemic resistance against Banana bunchy top virus. *Applied Soil Ecology*, 187-200.
- Hassan**, M. N., Afghan, S., & Hafeez, F. Y. (2011). Biological control of red rot in sugarcane by native pyoluteorin - producing *Pseudomonas putida* strain NH-50 under field conditions and its potential modes of action. *Society of Chemical Industry*, 1147-1154.
- Hernández**, G. H. (2014). Evaluación de bacterias rizosféricas de *Jatropha curcas* contra *Fusarium verticillioides* y *Leptoglossus zonatus*. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

- Hernández, L. A.,** Bautista, B. S., & Velázquez, d. V. (2007). Uso de Microorganismos Antagonistas en el Control de Enfermedades Postcosecha en Frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 66-74.
- Höfte, M.,** & Altier, N. (2010). Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems. *Research in Microbiology*, 464-471.
- Holker, U.,** Hofer, M., & Lenz, J. (2004). Biotechnological advantages of laboratory-scale solid-state fermentation with fungi. *Appl Microbiol Biotechno*, 175-186.
- Hubálck, Z.** (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 205-229.
- Ibarra, J. E.,** Del Rincón, C. M., Galindo, E., Patiño, M., Serrano, L., García, J. A., . . . Pardo, L. (2006). Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 113-120.
- IBCE, I. B.** (2015). BOLIVIA: Importaciones de plaguicidas. *Boletín Electrónico Bisemanal N° 440*, 1.
- IBCE, I. B.** (15 de Febrero de 2018). Cereales en Bolivia. Obtenido de CIFRAS: [http://ibce.org.bo/images/ibcecifras\\_documentos/CIFRAS-674-Cereales-Bolivia.pdf](http://ibce.org.bo/images/ibcecifras_documentos/CIFRAS-674-Cereales-Bolivia.pdf)
- Imran, H.,** Darine, T. H., & Mohamed, E. G. (2012). *In vitro* screening of soil bacteria for inhibiting phytopathogenic fungi . *African Journal of Biotechnology*, 14660-14670.
- INE,** Instituto Nacional de Estadística. 2019. Obtenido de: <https://www.ine.gob.bo/index.php/estadisticas-por-actividad-economica/industria-manufacturera-y-comercio-4>
- Islam, A.,** Nain, Z., Alam, K., Banu, N. A., & Islam, R. (2018). In vitro study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 1-11.
- Jacquat, A. G.** (2017). Actividad metabólica de la vía lox en cariopsis de *zea mays* L. ssp. *mays*, en respuesta a covs emitidos por *Fusarium verticillioides* (sacc.) nirenberg. (Tesina de Grado). Universidad Nacional de Cordova -Argentina.
- Jain, A.,** & Das, S. (2016). Insight into the Interaction between Plants and Associated Fluorescent *Pseudomonas spp.* *International Journal of Agronomy* , 1-9.
- Joseph, C.,** & Cumagun, R. (2007). Female fertility and mating type distribution in a Philippine population of *Fusarium verticillioides*. *J Appl Genet*, 123-126.

- Juárez**, B. G., Sosa, M. M., & López, M. A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y metodos de control. *Temas selectos de Ingeniería de alimentos*, 14-23.
- Kai**, M., Haustein, M., Molina, F., Petri, A., Scholz, B., & Piechulla, B. (2009). Bacterial volatiles and their action potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1001-1012.
- Kanchiswamy**, C. N., Malnoy, M., & Maffei, M. E. (2015). Chemical diversity of microbial volatiles and their potential for plant growth and productivity. *Frontiers in Plant Science*, 1-24.
- Kandoliya**, U. K., & Vakharia, D. N. (2013). Antagonistic effect of *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* esp. ciceri causing wilt in chickpea. *Agricultural research communication centre*, 569-575.
- Koenning**, S. (1 de enero de 2003). Disease Management in Corn. Obtenido de Corn Production Guide: <https://content.ces.ncsu.edu/corn-production-guide/disease-management-in-corn>
- Koneman**, E., Winn, W., Allen, S., Procop, G., Janda, W., Schreckenberger, P., & Woods, G. (2006). *Koneman Diagnóstico microbiológico*. Madrid: Panamericana.
- Krishna**, K. P., & McSpadden, B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1-25.
- Lanubile**, A., Ferrarino, A., Maschietto, V., Delledonne, M., Marocco, A., & Bellin, D. (2014). Functional genomic analysis of constitutive and inducible defense responses to *Fusarium verticillioides* infection in maize genotypes with contrasting ear rot resistance. *BMC Genomics*, 1-16.
- Lodewyckx**, C., Vangronsveld, J., Porteous, F., Moore, E. R., Taghavi, S., Mezgeay, M., & Lelie, D. v. (2002). Endophytic Bacteria and Their Potential Applications. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 583-606.
- Logrieco**, A., Bottalico, A., Mulé, G., Moretti, A., & Perrone, G. (2003). Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 645-667.
- Loredo**, O. C., López, R. L., & Espinosa, V. D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. *TERRA Latinoamericana*, 225-239.

- Luna, A. L.** (2016). Evaluación de recubrimiento a semillas de maíz con productos químicos y biológicos para contrarrestar *Fusarium moniliforme*. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México.
- Madbouly, A. K.** (2018). Efficacy of *Pseudomonas spp.* as biocontrol agents of phytopathogens. *Novel Research in Microbiology Journal*, 48-52.
- Mamani, H. L., Vasques, E. C.,** (2018). Manuscrito en elaboración.
- Mamani, M. M.** (2017). Estrategias bioquímicas para la producción de compuestos con actividad biológica inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos que afectan a cultivos del mango en la región de La Plazuela, Irupana La Paz. (Tesis de Maestría). Universidad Mayor de San Andrés, La Paz-Bolivia.
- Manejo integrado de Plagas.** (2011). Obtenido de <http://www.fao.org/3/a-as952s.pdf>
- Manejo integrado de plagas.** (2011). Obtenido de Ayuda Humanitaria de Asistencia y Recuperación para Comunidades Afectadas por la Sequía en el Chaco: <http://www.fao.org/3/a-as952s.pdf>
- Mannaa, M., Yeon, O. J., & Deok, K. K.** (2017). Biocontrol Activity of Volatile-Producing *Bacillus megaterium* and *Pseudomonas protegens* against *Aspergillus flavus* and Aflatoxin Production on Stored Rice Grains. *Mycobiology*, 213-219.
- Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., & Banerjee, U. C.** (2005). Influence of Process Parameters on the Production of Metabolites in Solid-State Fermentation . *Malaysian Journal of Microbiology*, 1-9.
- Marasas, W. F., Ploetz, R. C., Wingfield, M. J., Wingfield, B. D., & Steenkamp, E.** (2006). Mango Malformation Disease and the Associated *Fusarium* Species. *Phytopathology*, 667-672.
- Mardanov, A. M., Hadieva, G. F., Lutfullin, M. T., Khilyas, I. V., Minnullina, L. F., Gilyazeva, A. G., . . . Sharipova, M. R.** (2017). *Bacillus subtilis* Strains with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi . *Agricultural Sciences* , 1-20.
- Marín, G. P.** (2010). Análisis de factores ecofisiológicos que influyen en la expresión de genes relacionados con la biosíntesis de toxinas en especies de *Fusarium*. (Tesis de Doctorado). Universidad Complutense de Madrid.

- Marquez**, S. H., Hernandez, L. R., Orozco, M. M., Velazquez, S. I., & Santoyo, G. (2010). Diversity of bacterial endophytes in roots of Mexican husk tomato plants (*Physalis ixocarpa*) and their detection in the rhizosphere. *Genetics and Molecular Research*, 2372-2380.
- Martínez**, E. P., & Osorio, J. A. (2007). Estudios preliminares para la producción de un biosurfactante bacteriano activo contra *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. *Corpoica – Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 5-16.
- Martínez**, S., Terrazas, E., Alvarez, T., Mamani, O., Vila, J., & Mollinedo, P. (2010). Actividad antifungica in vitro de extractos polares de plantas del género *Baccharis* sobre fitopatogenos. *Revista Boliviana de Química* , 13-18.
- McSpadden**, G. B., & Fravel, D. R. (2002). Biological Control of Plant Pathogens: Research, Commercialization, and Application in the USA. *Plant Health Progress*, 1-18.
- Meena**, P., Tripathi, A. D., Srivastava, S. K., & Jha, A. (2013). Utilization of agro-industrial waste (wheat bran) for alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* in SSF using Taguchi (DOE) methodology. *Biocalysis and Agricultural Biotechnology*, 210-216.
- Merrill**, A. H., Sullards, M. C., Wang, E., Voss, K. A., Riley, R., & T. (2001). Sphingolipid Metabolism: Roles in Signal Transduction and Disruption by Fumonisin. *Environmental Health Perspectives*, 283-289.
- Metabolismo Secundario**. (2011). Obtenido de [http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes\\_Finales\\_Investigacion/Octubre\\_2011/IF\\_DECHECO%20EGUSQUIZA\\_FIPA/CAPITULO%20N%BA%2011.pdf](http://www.unac.edu.pe/documentos/organizacion/vri/cdcitra/Informes_Finales_Investigacion/Octubre_2011/IF_DECHECO%20EGUSQUIZA_FIPA/CAPITULO%20N%BA%2011.pdf)
- Milo**, R., & Phillips, R. (2010). *Cell biology by the numbers*. Obtenido de BioNumbers: <http://book.bionumbers.org/what-quantities-of-nutrients-need-to-be-supplied-in-growth-media/>
- Mishra**, J., & Arora, N. K. (2017). Secondary metabolites of fluorescent pseudomonads in biocontrol of phytopathogens for sustainable agriculture . *Applied Soil Ecology*, 1-11.
- Mitchell**, D. A., Berovic, M., & Krieger, N. (2002). Overview of solid state bioprocessing . *Biotechnology Annual Review*, 183-225.
- Mitchell**, D. A., De Lima, L. L., & Krieger, N. (2011). Bioreactors for Solid-State Fermentation. *Comprehensive Biotechnology (second edition)*, 347-360.

- Mizumoto, S., & Shoda, S. (2007).** Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. *Appl Microbiol Biotechnol*, 101-108.
- Mohammed, A., & Ravishankar, R. (2015).** Antifungal activity of novel Indole derivative from endophytic bacteria *Pantoea ananatis* 4G9 against *Mycosphaerella musicola*. *Biocontrol Science and Technology*, 1-35.
- Mohd, Z. N., Hanzah, F. A., Kusai, N. A., Zambri, N. S., & Salleh, S. (2017).** Characterization and pathogenicity of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium verticillioides*, causal agents of *Fusarium* ear rot of corn. *Turkish Journal of Biology*, 220-230.
- Montealegre, J., Reyes, R., Pérez, L. M., Herrera, R., Silva, P., & Besoain, X. (2003).** Selection of bioantagonistic bacteria to be used in biological control of *Rhizoctonia solani* in tomato. *Electronic Journal of Biotechnology*, 115-127.
- Morant, R. C. (2010).** Plaguicidas en Bolivia: sus implicaciones en la salud, agricultura y medio ambiente. *Revista Virtual REDESMA*, 1-12.
- Moreno, G. B., Jiménez, F. B., García, M. E., & Preciado, O. R. (2012).** Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por plantas: una síntesis. *Revista Fitotec*, 9-21.
- Moretti, A., Mulé, G., Susca, A., Gonzáles, J. M., & Logrieco, A. (2004).** Toxin profile, fertility and AFLP analysis of *Fusarium verticillioides* from banana fruits. *European Journal of Plant Pathology*, 601-609.
- Murillo, W. A., & Munkvold, G. P. (2008).** Systemic infection by *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three temperature regimes. *Plant Disease*, 1695-1700.
- Nalini, S., & Parthasarathi, R. (2017).** Optimization of rhamnolipid biosurfactant production from *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its biocontrol efficacy against *Fusarium* wilt of eggplant. *Annals of Agrarian Science*, 1-8.
- Narendra, K. P., Swapna, T. H., Khan, M. Y., Reddy, G., & Hameeda, B. (2015).** Statistical optimization of antifungal iturin A production from *Bacillus amyloliquefaciens* RHNK22 using agro-industrial wastes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 1-47.
- Nayaka, C. S., Niranjana, S. R., Uday, S. A., Niranjana, R. S., Reddy M., S., Prakash, H. S., & Mortensen, C. N. (2010).** Seed biopriming with novel strain of *Trichoderma harzianum* for the

control of toxigenic *Fusarium verticillioides* and fumonisins in maize. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 264-282.

**Noriega**, T. D., Hernández, R. L., Acebo, G. Y., & Luis, P. M. (2016). Aislamiento y selección de *Pseudomonas* con actividad antagonica in vitro ante *Phytophthora nicotianae* y *Phytophthora palmivora*. *Citrifruta*, 12-20.

**Olanrewaju**, O. S., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Mechanisms of action of plant growth promoting bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, 1-16.

**Oñate**, Z. L. (2016). Duración de las etapas fenológicas y profundidad radicular del cultivo de maíz (*Zea mays*) var. blanco harinoso criollo, bajo las condiciones climáticas del cantón cevallos. (Tesis de Licenciatura). Universidad Técnica de Ambato, Cevallos-Ecuador.

**Oren**, L., Ezrati, S., Cohen, D., & Sharon, A. (2003). Early Events in the *Fusarium verticillioides*-Maize Interaction Characterized by Using a Green Fluorescent Protein-Expressing Transgenic Isolate. *Applied and environmental microbiology*, 1695-1701.

**Ospina**, R. J. (2015). Manual Técnico del Cultivo de Maíz bajo buenas prácticas agrícolas. Medellín .

**El País**. (19 de junio de 2018). Bolivia triplicó en dos décadas el uso de agroquímicos. Obtenido de <https://elpais.bo/bolivia-triplico-en-dos-decadas-el-uso-de-agroquimicos/>

**Paliwal**, R. L. (2001). El maíz en los trópicos: Mejoramiento y producción. Obtenido de <http://www.fao.org/3/x7650s/x7650s00.htm#toc>

**Pandey**, A. (2003). Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 81-84.

**Pandey**, A., Soccol, C. R., & Mitchell, D. (2000). New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 1153-1169.

**Park**, Y. S., Dutta, S., Ann, M., & Raaijmakers, J. M. (2015). Promotion of plant growth by *Pseudomonas fluorescens* strain SS101 via novel volatile organic compounds. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1-5.

**Peix**, A., Rivas, R., Mateos, P. F., Martfínez, M. E., Rodríguez, B. C., & Velázquez, E. (2003). *Pseudomona rhizosphaerae* sp. nov., a novel species that actively solubilizes phosphate in vitro. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2067-2072.

**Peraica**, M., Radic, B., Lucic, A., & Pavlovic, M. (1999). Toxic effects of mycotoxins in humans. *World Health Organization*, 754-766.

- Pereira, P., Nesci, A., Castillo, C., & Etcheverry, M.** (2011). Field Studies on the Relationship between *Fusarium verticillioides* and Maize (*Zea mays* L.): Effect of Biocontrol Agents on Fungal Infection and Toxin Content of Grains at Harvest. *International Journal of Agronomy*, 1-8.
- Piechulla, B., & Degenhardt, J.** (2014). The emerging importance of microbial volatile organic compounds. *Plant, Cell and Environment*, 811-812.
- Poritsanos, N. J.** (2015). Molecular Mechanisms involved in secondary metabolite production and biocontrol of *Pseudomonas chlororaphis* PA23. Obtenido de: <https://www.collectionscanada.gc.ca/obj/s4/f2/dsk3/MWU/TC-MWU-192.pdf>
- Plan de manejo de plagas.** (Febrero de 2009). Proyecto Alianzas Rurales. Obtenido de: <http://documents.worldbank.org/curated/en/872511468229479607/E111110v40P08301IC10LCR1EA1P083051v2.doc>
- Prabhali, D., & Dhruva, K. J.** (2015). Antimicrobial Activity of Bacterial Endophytes from Medicinal Endemic Plant *Garcinia lancifolia* Roxb. *Annals of Plant Sciences*, 1243-1247.
- Pringle, G.** (14 de Abril de 2017). Maize production: Managing critical plant growth stages. Obtenido de Maize production: Managing critical plant growth stages: <https://www.farmersweekly.co.za/crops/field-crops/maize-production-managing-critical-plant-growth-stages/>
- Purnawati, A., Rochdjatun, S. I., Latief, A. A., & Hadiastono, T.** (2014). Endophytic Bacteria as Biocontrol Agents of Tomato Bacterial Wilt Disease. *The Journal of Tropical life Science*, 33-36.
- Ramírez, J. A., & Lacasaña, M.** (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. 67-75.
- Ransom, J.** (Mayo de 2013). Cron Growth and Management Quik Guide. Obtenido de <https://www.ag.ndsu.edu/pubs/plantsci/crops/a1173.pdf>
- Raza, W., Ling, N., Liu, D., Wei, Z., Huang, Q., & Shen, Q.** (2016). Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*. *Microbiological Research*, 103-113.
- Reinhold, H. B.** (2011). Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, 435-443.

- Reinozo**, P. Y., Vaillant, F. D., Casadesús, R. L., García, P. E., & Álvarez, R. V. (2007). Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, 35-40.
- Reller**, L. B., Weinstein, M. P., & Petti, C. A. (2007). Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Medical microbiology*, 1108-1114.
- Rivera**, H. F., Martínez, E. P., Osorio, J. A., & Martínez, E. (2010). Respuesta de biosurfactantes producidos por *Pseudomonas fluorescens* para el control de la gota de la papa *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary, bajo condiciones controladas. *Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria*, 21-30.
- Robinso**, T., Singh, D., & Nigam, P. (2001). Solid-state fermentation: a promising microbial technology for secondary metabolite production. *Appl Microbiol Biotechno*, 284-289.
- Robinson**, T., Singh, D., & Nigam, P. (2002). Fermentación en estado sólido: una tecnología microbiana promisoría para la producción de metabolitos secundarios. *Revista de la facultad de Química Farmacéutica*, 27-36.
- Robles**, C. Á. (s.f.). Uso de microorganismos antagonistas y sustancias naturales como una alternativa ecológica en el control de enfermedades en cultivos. *Centro de biotecnología*, 34-43.
- Rodicio**, M. D., & Mendoza, M. d. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 238-245.
- Rodríguez**, I. C., & Flores, J. (2018). Capacidad antagonica in vitro de *Trichoderma spp.* frente a *Rhizoctonia solani* Kuhn y *Fusarium verticillioides* Nirenberg. *Bioagro*, 49-58.
- Rojas**, B. M., Sánchez, C. D., Rosales, P. K., & Lugo, M. D. (2017). Antagonismo de *Bacillus* frente a hongos fitopatógenos de cultivos hortícolas . *Protección vegetal*, 1-9.
- Ruiz**, Beatriz; Chávez, Adán; Forero, Angela; García, Huante, Yolanda; Romero, Alba; Sánchez, Mauricio; Rocha, Diana; Sánchez, Brenda; Rodríguez, Sanoja, Romina; Sánchez, Sergio; Langley, Elizabeth (2010). Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. *Critical Reviews in Microbiology*, 146-167.
- Ryan**, R. P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D. J., & Dowling, D. N. (2008). Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiol Lett*, 1-9.

- Salas, A. M., & Salazar, S. E.** (2003). Importancia del uso Adecuado de Agentes de Control Biológico. *Acta Universitaria*, 29-35.
- Samsudin, N. I., & Magan, N.** (2016). Efficacy of potential biocontrol agents for control of *Fusarium verticillioides* and fumonisin B1 under different environmental conditions. *World Mycotoxin Journal*, 205-213.
- Santoyo, G., Moreno, H. G., Orozco, M. M., & Bernard, R. G.** (2015). Plant Growth-Promoting Bacterial Endophytes. *Microbiological Research*, 92-99.
- Santoyo, G., Orozco, M. M., & Govindappa, M.** (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol Science and Technology*, 855-872.
- Santoyo, G., Valencia, C. E., Orozco, M. M., Peña, C. J., & Farías, R. R.** (2010). Papel de los sideróforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra Latinoamericana*, 53-60.
- Schulz, S., & Dickschat, J. S.** (2007). Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Natural Product Reports*, 814-842.
- Seifert, K. A.; Aoki, T.; Baayen, R., P.; Brayford, D.; Burgess, L. W.; Chulze, S.; Gams, W.; Geiser, D.; De Gruyter, J.; Leslie, J. F.; Logrieco, A.; Marasas, W. F. O.; Nirenberg, H. I.; O'Donnell, K.; Rheeder, J.; Samuels, G. J.; Summerell, B. A.** (2003). The name *Fusarium moniliforme* should no longer be used. *Mycological Research*, 643-644.
- Serrano, C. H., & Cardona, C. N.** (2015). Micotoxicosis y micotoxinas: generalidades y aspectos básicos. *Rev CES Med*, 143-152.
- Sessitsch, A., Reiter, B., Pfeifer, U., & Wilhelm, E.** (2002). Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and Actinomycetes-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 23-32.
- Sgroy, V., Cassán, F., Masciarelli, O., Florencia Del Papa, M., Lagares, A., & Luna, V.** (2009). Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Appl Microbiol Biotechnol-Springer-Verlag*, 371-381.
- Sharifi, R., & Ryu, C. M.** (2018). Biogenic Volatile Compounds for Plant Disease Diagnosis and Health Improvement. *The Plant Pathology Journal*, 459-469.

- Shephard**, G. S., Vander, W. L., Gatyeni, P. M., Somdyala, N., Burger, H. M., & Marasas, W. F. (2005). Fumonisin Mycotoxins in Traditional Xhosa Maize Beer in South Africa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9634-9637.
- Shim**, W. B., & Woloshuk, C. P. (2001). Regulation of Fumonisin B1 Biosynthesis and Conidiation in *Fusarium verticillioides* by a Cyclin-Like (C-Type) Gene, FCC1†. *Applied and environmental microbiology*, 1607-1612.
- Simón**, M. R., & Golik, S. I. (2018). Cereales de verano. Buenos Aires: Editorial de la Universidad de La Plata .
- Singh**, M., Kumar, A., Singh, R., & Pandey, K. D. (2017). Endophytic bacteria: a new source of bioactive compounds. *Biotech*, 1-14.
- Singhaniaa**, R. R., Patel, A. K., Soccolc, C. R., & Pandeya, A. (2009). Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13-18.
- Snook**, M. E., Mitchell, T., Hinton, M. D., & Bacon, C. W. (2009). Isolation and Characterization of Leu7-Surfactin from the Endophytic Bacterium *Bacillus mojavensis* RRC 101, a Biocontrol Agent for *Fusarium verticillioides*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4287-4292.
- Solano**, B. A., De León, G. d., Valdovinos, P. G., Silva, R. H., & Soto, R. L. (2011). La pigmentacin de *Fusarium verticillioides* (sacc.) como factor de virulencia en plántulas de maíz. *Agronoma Mesoamericana* , 297-307.
- Song**, G. C., & Ryu, C. M. (2013). Two Volatile Organic Compounds Trigger Plant Self-Defense against a Bacterial Pathogen and a Sucking Insect in Cucumber under Open Field Conditions . *Int. J. Mol. Sci*, 9803-9819.
- Soriano**, J. M., Gonzáles, L., & Catal, A. I. (2005). Mechanism of action of sphingolipids and their metabolites in the toxicity of fumonisin B1. *Progress in Lipid Research*, 345-356.
- Sowanpreecha**, R., & Rerngsamran, P. (2018). Biocontrol of Orchid-pathogenic Mold, *Phytophthora palmivora*, by Antifungal Proteins from *Pseudomonas aeruginosa* RS1. *Mycobiology*, 129-137.
- Stanier**, R. Y., Wheelis, M. L., & Painter, P. R. (1996). *Microbiologia- Segunda Edición*. Obtenido de Books-Google: <https://books.google.com.bo/books?id=2u-6Q2XCMDgC&pg=PA196&lpg=PA196&dq=tiempo+de+generacion+de+pseudomonas+putida&source=bl&ots=4Vgmp5qFSr&sig=WZWBEhddJ2plFRPqO5m6KkzUha4&hl=es->

419&sa=X&ved=2ahUKEwjb\_avar-

XdAhXkY98KHf9hDxMQ6AEwAHoECAkQAQ#v=onepage&q=tiem

**Steciow, M.** (s.f.). *Rizósfera*. Obtenido de <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Rizosfera.htm>

**Stockmann-Juvala, H., & Savolainen, K.** (2008). A review of the toxic effects and mechanisms of action of fumonisin B1. *Human & Experimental Toxicology*, 799-809.

**Suárez, C. L., & Rangel, R. A.** (2013). Aislamiento de microorganismos para control biologico de *Moniliophthora rozeri*. *Acta Agronmica*, 62(4):370-378.

**Subramaniyam, R., & Vimala, R.** (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: a comparative study. *I.J.S.N.*, 480-486.

**Summerell, B. A., Salleh, B., & Leslie, J. F.** (2003). A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification . *The American Phytopathological Society*, 117-128.

**Tortone, C. A., & Lucchesi, G. I.** (2005). Participación del Glutamato en la Adaptación Osmótica de *Pseudomonas aeruginosa*. *Ciencia Veterinaria* , 45-64.

**Trivedi, P., Pandey, A., & S. Palni, L. M.** (2008). In vitro evaluation of antagonistic properties of *Pseudomonas corrugata*. *Microbiological Research*, 329-336.

**Trujillo, I., Díaz, A., Hernández, A., & Heydrich, M.** (2007). Antagonismo de cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *Burkholderia cepacia* contra hongos fitopatógenos del arroz y del maíz. *Revista Protección*, 41-46.

**Tyc, O., Song, C., Dickschat, J. S., Vos, M., & Garbeva, P.** (2016). The Ecological Role of Volatile and Soluble Secondary Metabolites Produced by Soil Bacteria. *Trends in Microbiology*, 1-13.

**UK Standards for Microbiology Investigations, (.** (2015). Identification of *Pseudomonas* species and other Non Glucose Fermenter. *Public Health England*, 1-43.

**Usta, C.** (2013). Microorganisms in Biological Pest Control - A Review (Bacterial Toxin Application and Effect of Environmental Factors). *Current Progress in Biological Research*, 287-317.

**Uyar, F., & Baysal, Z.** (2004). Production and optimization of process parameters for alkaline protease production by a newly isolated *Bacillus sp.* under solid state fermentation. *Process Biochemistry*, 1893-1898.

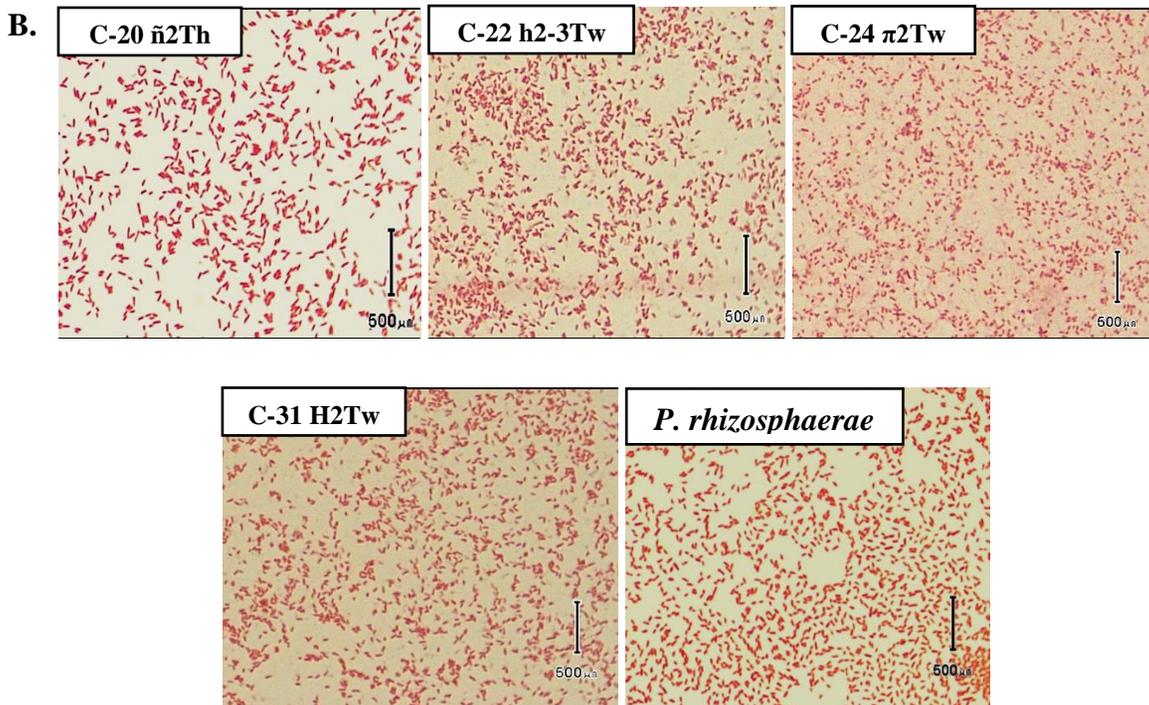
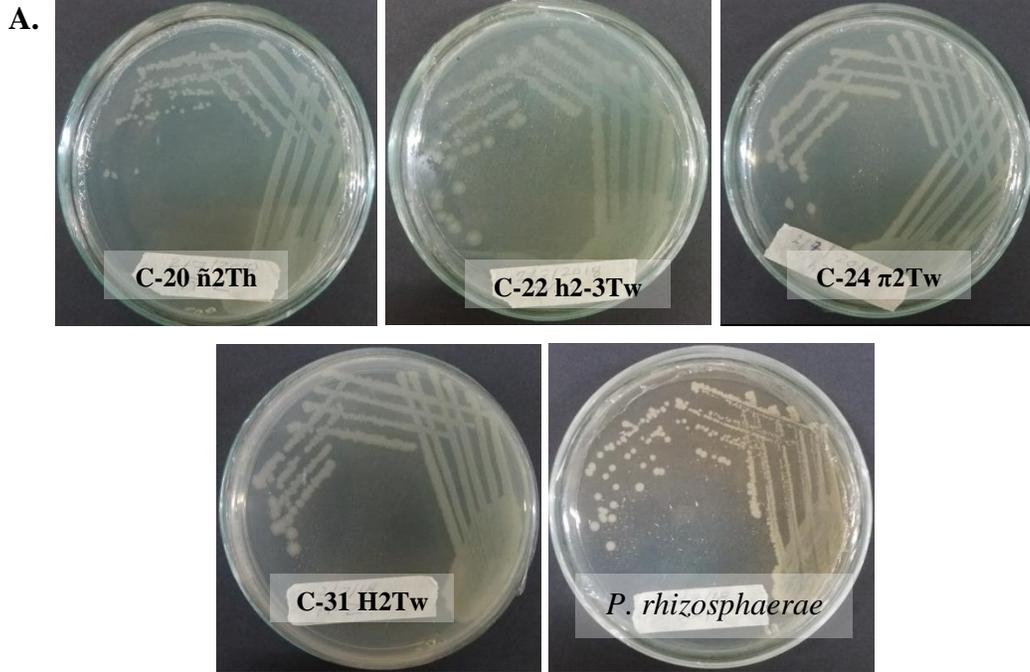
- Vaishnav**, P., & Demain, A. L. (2011). Unexpected applications of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 223-229.
- Valencia**, G. M., Quevedo, H. B., Franco, C. M., Díez, O. H., Parra, G. C., & Rodríguez, B. M. (2011). Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium spp.*, aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. *Universitas Scientiarum*, 147-159.
- Van Lenteren**, J. C., Bolckmans, K., Kohl, J., Ravensberg, W. J., & Urbaneja, A. .. (2017). Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *Biological control using invertebrates and microorganisms*, 1-21.
- Vargas**, C. Y., & Pérez, P. L. (2018). Aprovechamiento de residuos agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 1-14.
- Vásquez**, E. C. (2018). Aislamiento, selección y caracterización de bacterias endófitas promotoras del crecimiento de plantas. (Tesis de Licenciatura). Universidad Mayor de San Andrés. La Paz-Bolivia.
- Vespermann**, A., Kai, M., & Piechulla, B. (2007). Rhizobacterial Volatiles Affect the Growth of Fungi and Arabidopsis thaliana. *Applied and Environmental Microbiology*, 1-4.
- Villa**, M. A., Pérez, L. R., Morales, M. H., Basurto, S. M., Soto, P. J., & Martínez, E. E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium spp.* y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 194-205.
- Villa**, P. M., Frías, A., & González, G. (2005). Evaluación de cepas de *Pseudomonas sp.* para el control de hongos fitopatógenos que afectan cultivos de interés económico. *Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)*, 40-44.
- Villacide**, J., & Corley, J. (2012). Manejo integrado de plagas forestales. En C. J. Villacide j, *Introducción a la teoría del control biológico de plagas*. Rio Negro- Argentina: INTA EEA Bariloche.
- Wang**, S. L., Yieh, T., & Shih, I. L. (1999). Production of antifungal compounds by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme and Microbial Technology*, 142-148.
- Weisskopf**, L. (2013). The potential of bacterial volatiles for crop protection against phytopathogenic fungi. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education* (A. Méndez-Vilas, Ed.), 1352-1363.

- Weller, D. M.** (2007). *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years . *Phytopathology* , 250-256.
- Weller, D., M.; Landa, B., B.; Mavrodi, O., V.; Schroeder, K., L.; De La Fuente, L.; Blouin, Bankhead, S.; Allende, Molar, R.; Bonsall, R., F.; Mavrodi, D., V.; Thomashow, L., S.** (2007). Role of 2,4-Diacetylphloroglucinol-Producing Fluorescent *Pseudomonas spp.* in the Defense of Plant Roots. *Plant Biology* , 4-20.
- Wilson, C., Solar, J., El Ghaouth, A., & Wisniewski, M.** (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis*, 204-210.
- Xie, X., Cui, S. W., Li, W., & Tsao, R.** (2008). Isolation and characterization of wheat bran starch. *Food Research International*, 882-887.
- Zanabria, B. R., Bickel, U., Jacobi, J., & Delgado, F.** (2018). Plaguicidas altamente tóxicos en Bolivia. *Diálogos Textos breves sobre desarrollo rural solicitados por el IPDRS-Bolivia*, 1-5.
- Zarrin, F., Saleemi, M., Zia, M., Sultan, T., Aslam, M., Rehman, R. -U., & Chaudhary, M. F.** (2009). Antifungal activity of plant growth-promoting rhizobacteria isolates against *Rhizoctonia solani* in wheat. *African Journal of Biotechnology*, 219-225.
- Zhun, Z., Zhang, G., Luo, Y., Ran, W., & Shen, Q.** (2012). Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soybean flour and rice straw as the substrate. *Bioresource Technology*, 254-260.
- Ziayoddin, M., Manohar, S., & Junna, L.** (2012). Orthogonal Array Approach for Optimization of Carrageenase Production by Solid State Fermentation of *Pseudomonas aeruginosa* ZSL-2. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, 96-102.
- Zinniel, Denise, K.; Lambrecht, Pat; Harris, Beth, N.; Feng, Zhengyu; Kuczmariski, Daniel; Higley, Phyllis; Ishimaru, Coral, A.; Arunakumari, Alahari; Barletta, Raúl, G., Vidaver, Anne, K.** (2002). Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. *Applied and environmental microbiology*, 2198-2208.

**10. ANEXOS**

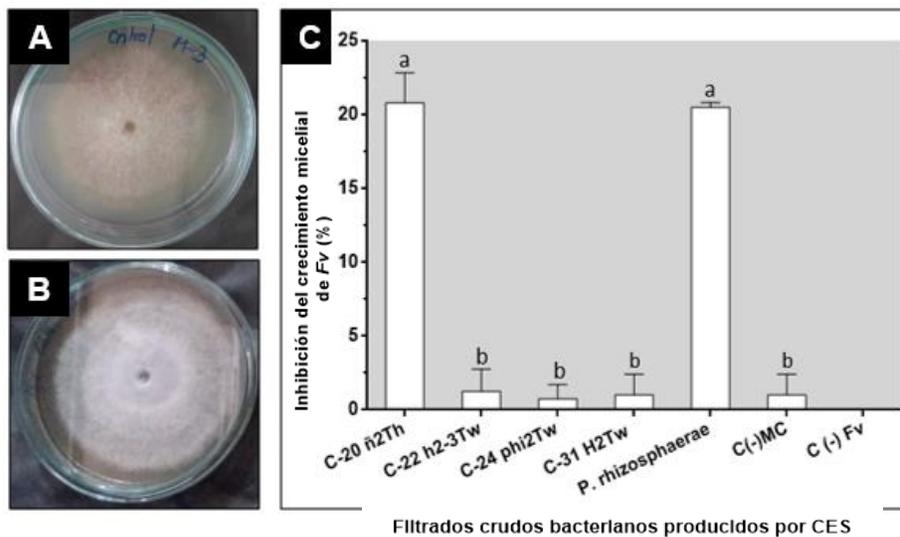
**Anexo 1. Características macroscópicas y microscópicas de las cepas bacterias endófitas seleccionadas.**

Características A. macroscópica y B. microscópicas de las cepas C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control).



**Anexo 2. Actividad inhibitoria de metabolitos solubles producidos por las cepas bacterianas endófitas seleccionadas producidas por cultivo en estado sólido, empleando como sustrato solido cascarilla de arroz, contra *Fusarium verticillioides*.**

Los filtrados crudos producidos por C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) mediante CES empleando como sustrato cascarilla de arroz, exhibieron porcentajes de inhibición leves o inexistentes entre el 0.8-21% contra *Fusarium verticillioides*, durante 7 días de incubación. Se observó un crecimiento micelial normal de *Fusarium verticillioides*, no existiendo alteraciones en su morfológica.



**Figura 1. A.** Crecimiento normal de *Fusarium verticillioides* en medio PDA. **B.** Inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* en medio PDA con el filtrado crudo bacteriano. **C.** Actividad inhibitoria de filtrados crudos de C-20 ñ2Th, C-22 h2-3Tw, C-24 π2Tw, C-31 H2Tw y *Pseudomonas rhizosphaerae* (cepa control) producidos por cultivo en estado sólido, empleando como sustrato cascarilla de arroz. Las barras representan la media y la desviación estándar de cuatro replicas. Letras no comunes indican diferencias significativas para la prueba Tukey ( $p < 0,05$ ). C(-)MC refiere al control negativo de medio de cultivo y C(-)Fv al control negativo de *Fusarium verticillioides*.

**Anexo 3**

**Costos de producción de filtrado crudo bacteriano mediante cultivo en estado sólido.**

Costos de producción de filtrado crudo bacteriano mediante cultivo en estado sólido a escala laboratorio. Esta estimación incluye insumos básicos (sustrato, agua, filtros, electricidad) y excluye el costo de mano de obra, otros insumos menores (material de vidrio, etc.), transporte y otros (infraestructura y equipamiento básico).

<b>Costos de producción de filtrado crudo bacteriano por CES a escala laboratorio</b>		
<b>Descripción</b>		<b>Costo para 250 litros (Bs)</b>
<b>Insumos</b>	Salvado de trigo	437,5
	Agua	10,9
	Energía	170
	Filtros de nitrocelulosa	1250
<b>Equipos</b>	Centrifugadora	166,7
	Bomba al vacío	200
<b>Costos adicionales</b>	Impuestos (15%)	335,3
	Mantenimiento de equipos (20%)	67,1
	Improvistos 10 %	435,9
	<b>Costo por litro (Bs.)</b>	<b>1,7</b>