

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE INGENIERIA Y NEGOCIOS SAN QUINTIN



**Aislamiento de Microorganismos del Suelo con Capacidad Antagónica y
Entomopatogénica en San Vicente, Baja California**

Por:

SALVADOR ELIZARRARÁS LÓPEZ

TESIS

Presentada como Requisito Parcial para

Obtener el Título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

DEDICATORIA

Respetuosamente con mucho afecto

A mis padres:

Sr. Salvador Elizarrarás Alatorre

Sra. Clementina López Partida

Quienes me brindaron la vida, amor incondicional y dieron todo lo que estuvo en sus manos a mí y a mis hermanas para poder guiarnos por el buen camino y gracias a sus esfuerzos lograron darme la herencia más grande, mi carrera profesional.

A mis hermanas:

Susana Elizarrarás López

Marisol Elizarrarás López

Quienes compartieron a mi lado los momentos tanto felices como los más tristes, con quienes he aprendido a salir adelante, que a pesar de los tropiezos siguen y seguirán a mi lado siempre apoyándome y motivándome a ser mejor.

A mis abuelos:

Sr. José Valentín Elías Elizarrarás Cabrera

Sra. María Elena Alatorre Cruz

Sra. Alejandra Partida Hermosillo

Por ser siempre el apoyo que desde niño necesité, por todo el cariño, amor y confianza que me brindaron.

A mi Tío Y Padrino:

José Evaristo López Partida

Por cada uno de los consejos que me ayudaron desde niño hasta lo que ahora soy, por orientarme y estar pendiente de cada uno de mis pasos.

Con mucho amor a:

Paola Nalleli Mijares Padilla por estar en todo momento junto a mí, por creer en mí y compartir conmigo gran parte de tu tiempo, cariño y comprensión.

A mis amigos: Gabriel, Uriel, Rafael, Alberto, Sergio, Ángel, Favian, Bryant, Gilberto, Eliazar, Christian's, Pedro, Mario, Alfredo, Erick.

A todos ellos gracias por su amistad y compañerismo.

A MI ALMA MATER

Con cariño, por brindarme la gran oportunidad de formarme como profesionalista.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr.Salvador Ordaz Silva**, por su valiosa aportación de conocimientos y el tiempo que me dedico dándome asesorías a lo largo de la investigación y durante el periodo de clases.

Al **M.B.C Jorge Luis Delgadillo Ángeles**, por el apoyo y asesorías que me brindo durante la investigación.

Al M.C. **José Guadalupe Pedro Méndez**, por su disponibilidad de tiempo, por el apoyo y la ayuda brindada durante la investigación y en clases.

A **Salvador Elizarrarás Alatorre**, por el apoyo que me brindó y su contribución a lo largo de la realización de la tesis.

INDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION	1
2. JUSTIFICACIÓN	3
2.1 Objetivo General.....	4
2.2 Objetivo Específico.....	4
3. ANTECEDENTES	5
3.1. Hongos	5
3.1.1 Hongos Entomopatógenos	5
3.1.2 Aislamiento.....	6
3.2 Nematodos Entomopatógenos.....	8
3.2.1 Modo de acción.	8
3.2.2 Factores que influyen en su efectividad	9
3.2.3 Aislamiento.....	9
3.3 <i>Beauveria bassiana</i>	10
3.3.1 Antecedentes	10
3.3.2 Clasificación taxonómica.	11
3.3.3 Descripción del Hongo.	11
3.3.4 Modo de acción.	12
3.4 <i>Metarhizium anisopliae</i>	13
3.4.1 Descripción	13
3.4.2 Antecedentes.	14
3.4.3 Ciclo de vida de <i>Metarhizium anisopliae</i>	14
3.5 Bacterias.....	16
3.5.1 <i>Bacillus</i>	16
3.5.2 Antagonismo.	17
3.5.3 Antibiosis.	17
3.5.4 Competencia.....	17
4. MATERIALES Y METODOS	19
4.1 Planteamiento del problema.....	19
4.2 Descripción geográfica y antecedentes del poblado san vicente.....	19
4.3 Recolección de las muestras.....	20
4.3.1 Aislamiento de microorganismos	21
4.3.2 Aislamiento de hongos.	21
4.3.3 Aislamiento de Bacterias	22
4.4 Bio Ensayos.....	23
4.4.1 Prueba de antagonismo.....	23
5. HIPOTESIS	25

6. RESULTADOS	26
6.1 Prueba De Antagonismos	29
7. CONCLUSIONES	31
8. BIBLIOGRAFÍA.....	32

Índice de Cuadros

cuadro 1. Coordenadas de los puntos donde se obtuvieron las muestras.	20
cuadro 2. Microorganismos obtenidos de las muestras.	26
cuadro 3. Porcentaje de inhibición de las cepas vs hongo patógeno	29

Índice de Figuras

figura 1. Larva de <i>tenebrio</i> infectada completamente por <i>beauveria bassiana</i>	27
figura 2. Larva de tenebrio infectada por metarhizum.....	28
figura 3. Nematodos entomopatógenos invadiendo larva de <i>tenebrio</i>	28
figura 4. Tinción de gram, identificación de <i>bacillus</i>	30
figura 5. Antagonismo de bacteria vs <i>botrytis cinerea</i>	30

1. INTRODUCCION

Una de las principales características que definen al suelo, son la inmensa cantidad de microorganismos presentes que trabajan en conjunto dándole las propiedades que éste posee. Es de suma importancia mencionar que la mayor parte de estos seres vivos se sitúan en la rizosfera, para que exista tal interacción y actividad microbiana, influirá de manera positiva el tipo de suelo y características ideales del mismo como: Temperatura, Humedad, Aireación.

Algunos de los microorganismos más comunes son: Hongos, Bacterias, Algas, Protozoarios, Nematodos, virus entre otros. Para su explotación en el ámbito comercial ya sea para usos agrícolas o de interés en medicina, se encuentran las bacterias, nematodos y hongos, de los cuales podemos desglosar varios que giran en torno a la agricultura. El aislamiento de ciertos microorganismos es una técnica utilizada para obtener géneros o cepas antagonistas o entomopatógenos de hongos y bacterias, así como nematodos.

La agricultura hoy en día dio un cambio significativo en la manera de combatir plagas y enfermedades, la explotación desmedida de los químicos ha vuelto más resistentes a las plagas y enfermedades que hace años no representaban un daño significativo en los cultivos. En respuesta a esto, se han buscado nuevas alternativas para disminuir el uso de plaguicidas, los cuales están perdiendo su efectividad.

Una estrategia ecológicamente segura para utilizar entomopatógenos en el combate de plagas de suelo, es basarse en la identificación del complejo de especies plaga y sus patógenos nativos para posteriormente seleccionar el microorganismo con mayor potencialidad, tomando como criterios de referencia la

virulencia, movilidad, persistencia, especificidad y los costos de producción del patógeno (Villalobos 1992).

Los microorganismos que se sitúan en el suelo, han demostrado tener actividad antagonista y entomopatógena, lo cual abrió la posibilidad de combatir plagas y dio paso a una nueva alternativa de control eficiente de plagas.

Un claro ejemplo del control de plagas son los hongos. Catalogados como un grupo mundialmente reconocido de agentes microbianos a usarse tanto en los programas de control biológico de plagas como en los de manejo integrado de plagas (MIP). Esto es debido a su forma de actuar que es por contacto directo con la cutícula del hospedero y por la disponibilidad de tecnologías para producirlos masivamente. Algunos géneros además, se pueden formular en aceites y así aplicarse con técnicas de ultrabajo volumen (Bateman et al., 1993, 1996).

Una vez aislado el agente es necesaria una correcta identificación ya sea de manera tradicional por medio de características morfológicas, las cuales mantienen un peso relevante, aunque se han introducido conceptos nuevos que conllevan algún tipo de marcador molecular que permita, entre otras cosas, identificar al agente incluso después de su liberación (Bridge y Arora, 1998 citados por Bielíková et al., 2002)

2. JUSTIFICACIÓN

La siguiente investigación se realiza con el fin de buscar cepas nativas adaptadas a la región para facilitar el control de plagas, debido a que la mayoría de los productos utilizados a base de microorganismos en el Valle de San Quintín no tienen éxito a consecuencia de las condiciones climáticas de la región, las cuales difieren mucho de las condiciones con las cuales la cepa se desarrolla de manera adecuada en su lugar de origen.

2.1 Objetivo General

Aislar Microorganismos del Suelo con Capacidad Antagónica y Entomopatogénica en un área con las condiciones que se adapten a las de la región.

2.2 Objetivo Específico.

*Aislar microorganismo Entomopatógenos.

*Aislar Bacterias antagonistas.

*Realizar pruebas de antagonismo con Bacterias.

3. ANTECEDENTES

3.1. Hongos

Los hongos son un inmenso grupo diverso de organismos, comprendiendo una enorme variedad de formas microscópicas únicas llamadas levaduras hasta grandes hongos, como se ejemplifica en el bien conocido grupo de setas comestibles y venenosas. Publicaciones recientes reportan 72065 especies distribuidas en 11 phyla y 7745 géneros (Hawksworth et al., 1995). Especies nuevas de hongos continúan siendo descritas, y para el año 2000 se estimaban ya entre 80 a 100,000 especies de hongos.

Una de las principales funciones de los hongos en el suelo es que actúan como degradadores o desintegradores primarios de la materia orgánica que existe en el mismo. El ciclo de vida clásico de este grupo de organismos es el crecimiento micelial en materia orgánica en el suelo, para posteriormente dar origen a cualquier cuerpo fructífero en la superficie o subsuperficie (Christensen, 1989). Muchos hongos de suelo tienen otros roles o interacciones, uno de los más ampliamente estudiados son las micorrizas (Brundrett et al., 1996).

3.1.1 Hongos Entomopatógenos

Está demostrado que para llegar a obtener un producto altamente efectivo para controlar una especie plaga se debe partir de un amplio rango de aislados, seleccionados en principio en cuanto a su virulencia. Los aislados que causan epizootias espectaculares, como es el caso de algunos de los géneros fúngicos imperfectos entomopatógenos, son candidatos promisorios para usarse en el control de plagas, siempre y cuando cumplan con ciertas características esenciales, tales como un nivel de especificidad de hospedante estrecho, buena tolerancia a factores ambientales adversos, facilidad de reproducción, comportamiento en almacenaje adecuado y alta seguridad en mamíferos (Bateman et al., (1996).

3.1.2 Aislamiento

El medio de cultivo es una sustancia o solución que permite el desarrollo de microorganismos, mientras que el cultivo es el producto del crecimiento de un organismo. Los medios utilizados en micología deben contener los nutrientes suficientes para asegurar el desarrollo y reproducción de los hongos (carbono, nitrógeno, vitaminas, oligoelementos, etc.) y un pH ligeramente ácido (6-6.3) para facilitar su crecimiento e inhibir al mismo tiempo el desarrollo de otros microorganismos. Se pueden añadir antibióticos para inhibir el crecimiento de bacterias saprofitas que suelen contaminar las muestras (Cañedo V. Ames T 2004)

Los medios pueden ser sólidos o líquidos. Para conseguir un medio sólido se debe agregar una sustancia solidificante como el agar (gelatina vegetal) o el agar agar (polisacáridos provenientes de algas), el cual no tiene valor nutritivo sino que sirve simplemente para mantener la humedad por un tiempo más o menos prolongado. La humedad es fundamental para el desarrollo de los hongos, porque cuando esta comienza a disminuir, la formación del micelio también disminuye y el hongo tiene que asegurar su perpetuidad formando estructuras propagativas (esporas, conidias) y de conservación (clamidosporas). El agar empieza a derretirse a partir de 80°C y soporta temperaturas altas sin descomponerse, solidificándose entre los 35°C.

Los medios de cultivo se vierten en placas Petri o en tubos inclinados. Los primeros ofrecen la ventaja de tener mayor superficie para el desarrollo del hongo y se utilizan para trabajos rutinarios de aislamientos, aspecto del cultivo, velocidad de crecimiento, etc. Sin embargo, son más fáciles de contaminarse. Los tubos a pesar de tener una superficie mucho más reducida, ofrecen seguridad en su manipulación y buena resistencia a la deshidratación y a la contaminación. Se utilizan para conservar cultivos por tiempo más o menos prolongado. Los medios se seleccionan en base al tipo de muestra que queremos reproducir.

El pH recomendado para el cultivo de hongos en el laboratorio es de alrededor de 7, un pH neutro o ligeramente ácido (6.8).

Para seguridad del que opera y evitar contaminaciones, los medios de cultivo se deben manipular en campanas de flujo laminar (Cañedo., 2004)

Los microorganismos son ubicuos, por lo que la preparación de un cultivo puro implica no solo el aislamiento de un determinado microorganismo a partir de una población microbiana natural mixta, sino también del mantenimiento del individuo aislado y de su descendencia, en un ambiente artificial al que se impide el acceso de otras. Los microorganismos no requieren mucho espacio para su desarrollo de ahí que puede crearse un ambiente artificial dentro de los confines de un tubo de ensayo, de un matraz o de una placa petri (Ingraham., 1992).

Un método más efectivo para obtener nuevos aislados de hongos es el aislamiento unidades formadoras de colonias (ufc) a partir de muestras de suelo por diluciones seriadas, según procedimiento detallado por Lecuona (1996). No obstante, este método es muy caro y se prefiere usar en el aislamiento y selección de especies bacterianas, como por ejemplo *Bacillus thuringiensis* (Johnson y Bishop, 1996).

El fracaso de la adecuada identificación y caracterización de hongos por técnicas morfológicas ha dado paso al desarrollo de métodos moleculares para la identificación de hongos (Brunset *al.*, 1991, 1992).

3.2 Nematodos Entomopatógenos

Otros microorganismos que ha sido de gran relevancia para el control de insectos plaga son los nematodos, conocidos como nematodos entomopatógenos, (EPN's), los cuales fueron descritos en 23 familias (Koppenhöfer, 2007). De las cuales, las más importantes para el control biológico de insectos son:

Steinernematidae y *Heterorhabditidae*, debido a que cumplen con la mayoría de las características para su uso como biocontroladores (Kaya and Gaugler, 1993; Grewal et al., 2005^a; Koppenhöfer, 2007) en programas de control biológico aumentativo, conservativo y clásico. La vasta mayoría de investigación aplicada se ha enfocado en su potencial como control de agentes biológicos (Grewalet al., 2005^a). Una investigación extensa en las últimas tres décadas han demostrado sus éxitos tanto como sus fracasos para el control de insectos plaga de cultivos, ornamentales y pastizales (Shapiro-Ilanet al., 2002; Georgiset al., 2006)

3.2.1 Modo de acción.

Los nematodos entomopatógenos son organismos pseudocelomados vermiformes muy similares a los que parasitan plantas y que pueden asociarse con los insectos de tres formas: forecia (adherencia pasiva y transporte), parasitismo obligado y parasitismo facultativo. Por lo general, los nematodos entomopatógenos presen-tan una estrecha asociación (simbiosis) con bacterias específicas, las cuales son los agentes primarios que inician la infección en el hospedante.

Los nematodos transportan internamente bacterias específicas que son liberadas en el interior del cuerpo del insecto después de que el nematodo penetra a través de aberturas naturales como boca, espiráculos y ano. Estas bacterias se

multiplican dentro del in-secto y lo matan al causarle septicemia (infección generalizada).

3.2.2 Factores que influyen en su efectividad

La selección de nematodos entomopatógenos para el control un insecto plaga en particular es basada en varios factores que incluyen la gama de huéspedes de los nematodos, y las estrategias de alimentación, tolerancia de los factores ambientales y sus efectos en la eficacia de supervivencia (temperatura, humedad, tipo de suelo, exposición a los rayos ultravioleta, salinidad y contenido de materia orgánica del suelo, medios de aplicación, agroquímicos y otros). Los 4 factores más críticos son humedad, temperatura, patogenicidad del insecto objetivo, y estrategia de alimentación (Kung et al., 1991; Kaya y Gaugler, 1993; Gampbellet *al.*, 2003; Grewalet *al.*, 2005a).

Los efectos de los factores ambientales sobre los nematodos entomopatógenos tales como temperatura, humedad, aireación, y tipo de suelo así como algunos factores bióticos (especies de nematodos entomopatogenos, insectos objetivo, edad del insecto, fauna del suelo) han sido documentados por numerosos investigadores (Gaugler y Kaya, 1990; Kaya y Gaugler, 1993; Shapiro-ilanet *al.*, 2012; Grewalet *al.*, 2005; Geogiset *al.*, 2006)

3.2.3 Aislamiento

Los nematodos entomopatógenos son predominantemente aislados de hábitats del suelo y muchos de los insectos subterráneos han recibido atención para el esfuerzo de control con este grupo de organismos, principalmente las larvas blancas de la familia de *Scarabidae* y gorgojos, (Klein et al 2007).

3.3 *Beauveria bassiana*

3.3.1 Antecedentes

El hongo *Beauveria bassiana* es conocido como entomopatógeno desde 1835 año en que se descubrió causando la muerte de gusanos de seda (Commonwealth Mycological Institute, 1979). Se ha usado en forma comercial en diferentes partes del mundo, por ejemplo en Rusia, se ha empleado por más de 15 años para el control de *Leptinotarsa decemlineata*, en combinación con insecticidas y en Europa para el control de *Laspeyresia pomonella*, plaga del manzano (Ferron, 1978) Se cita también su uso contra picudo *Anthonomus grandis* en plaga del algodón con una buena significancia de mortalidad lo que se reflejó en incremento de los rendimientos con un 74 y 113% comparándolo con otros tipos de control (Wright y Chandler, 199; citados por Ramirez, 1998).

Se encuentra de forma natural en suelos y sobre diversos ordenes de insectos (*Coleóptera*, *Díptera*, *Heteróptera*, *Homóptera*, *lepidóptera*, *Thysanóptera*) así como sobre ácaros principalmente tetraníquidos, por lo que ha sido utilizado para el control de plagas de dichos órdenes en diversos países. Contra aleuródidos ha sido utilizado para el control de *Bemisia tabaci* (Genn.) (Wright y Knau, 1994; Kurogi et al., 1993; Landa et al., 1994).

Hasta 1954 se habían descrito 14 especies de *Beauveria* y McLeond las redujo a dos, que son *B. bassiana* y *B. tenella*, después Dehoog incluyó a *B. tenella* en *B. brongniartii* (Tanada y Kaya, 1993, citado por Berlanga, 2001).

Las propiedades que hacen de mayor interés a los insecticidas microbiales según Lezama (1991) son: su alto potencial patogénico, suficientemente residual en campo; la conservación de la virulencia en almacenamiento hasta la aplicación; diferentes especialidades que presentan (adaptación recíproca entre el entomopatógeno y su huésped); sus posibilidades de producción.

3.3.2 Clasificación taxonómica.

La posición taxonómica de *Beauveria bassiana*, Alexopoulos y Mims (1979) es la siguiente:

Reino: Mycetae.

Division: Amastigomycotina.

Subdivision: Deuteromycotina.

Clase: Deuteromycetes.

Subclase: Hypomycetes.

Orden: Moniliales.

Familia: Moniliaceae.

Género: *Beauveria*.

Especie: *B. bassiana*.

3.3.3 Descripción del Hongo.

De acuerdo a Humbert y Roberts, (1981) citado por Berlanga, (2001), *Beauveria bassiana* forma conidióforos simples e irregulares que terminan en vértices en forma de racimos, la célula conidiógena tiene la base globosa o abultada presentando un adelgazamiento en la parte superior formando un estigma curvado en forma de zig-zag. Se caracteriza por presentar una apariencia polvosa de color blanco algodónoso o amarillento cremoso.

3.3.4 Modo de acción.

Beauveria bassiana al igual que otros hongos entomopatógenos, antes de matar a su hospedero le causa síntomas importantes como son: pérdida de sensibilidad, falta de coordinación, letargo, inapetencia, melanización y parálisis. Con la muerte del insecto, el beneficio se incrementa pues la esporulación y posterior dispersión del hongo, permite un control más allá de la aplicación (Estrada *et al.*, 1997; Vargas, 2003; Malpartida, 2004).

El hongo *Beauveria bassiana* es uno de los agentes de control más importantes para la represión de muchas plagas (Ferron 1978; Evans 1982).

La germinación de las conídias de *B. bassiana* ocurre en un periodo de 12 horas después de la inoculación. El hongo penetra a través del integumento por acción mecánica y efectos enzimáticos, lo cual toma otras 12 horas. Después de unas 72 horas de la inoculación, el insecto está totalmente colonizado. La duración de las diferentes fases de este ciclo depende de la especie atacada y de las condiciones ambientales presentes durante la infección (Alves 1986^a).

La habilidad de un hongo entomopatógeno para sobreponerse a los mecanismos de defensa de sus huéspedes se debe a la producción de toxinas, lo cual constituye uno de los componentes principales de la patogenicidad y uno de los más difíciles de establecer. La muerte causada por toxinas puede ser considerada cuando los insectos mueren rápidamente después de la infección y a menudo no muestran evidencia de una infección fungal extensiva.

Las enzimas extracelulares o metabolitos secundarios como lecitinas, coagulasas, hialuronidasas son otro tipo de sustancias frecuentemente encontradas en ciertos microorganismos que contribuyen a la patogenicidad de hongo (Khachatourians 1991).

La patogenicidad de un microorganismo y el desarrollo de la infección son el resultado de un número de componentes tanto del patógeno como del huésped,

tales como la rápida germinación, la velocidad de reproducción, la tasa de esporulación, el tiempo de exposición, la producción de toxinas y el estado fisiológico del huésped (Kachatourians 1991).

3.4 *Metarhizium anisopliae*

3.4.1 Descripción

El *metarhizium* es un hongo imperfecto que tiene un amplio rango de insectos huéspedes (más de 200 especies, primariamente larvas de coleópteros) en la naturaleza, y que ha sido recientemente aislado de larvas salvajes colectadas de *Culex sp* (Sorokin, 1883).

El hongo tiene un amplio rango de mosquitos huéspedes y sus conidios pueden producir altas tasas de mortalidad en larvas *Culexsp* y *Anophelessp* en dosis de 300-600 mg/m². El principal modo de acción en la mayoría de los casos es la obstrucción del pasaje de aire a través de los dos conductos traqueales de las larvas de mosquitos. Aunque *Metarhizium anisopliae* es un género cosmopolita, no se han reportado infecciones en animales de sangre caliente, y no hay reportes sobre susceptibilidad humana al hongo.

Los conidios de este hongo pueden ser producidos en masa sobre un sustrato de arroz en cantidades suficientes para aplicaciones locales de campo. Las grandes cantidades de sustrato que son necesarias para producir conidios para tasas efectivas de aplicación de campo requieren desarrollo de métodos específicos de producción en masa para hacer practico el uso de este agente fungoso en un futuro inmediato; también requiere el uso de aislados altamente virulentos.

3.4.2 Antecedentes.

El *Metarhizium* fue uno de los primeros microorganismos en ser usado para el control biológico de insectos. Fue primeramente aislado por Metschnikoff del *Anisopliae austriaca* Herbst (1879-1) y fue descrito por Sorokin (1883-1).

Fue más recientemente aislado en 1959 de larvas enfermas de elatérios (Clickbeetle, gusano de alambre) *Conderusvespertinus* colectadas en Carolina del Norte en los EE.UU. (variedad F-84-1-1) (1996-1a) y de larvas de abejorro *Melolontha melolontha* en Checoslovaquia (1965-1). Recientemente se han aislado en Brasil, Australia y Austria variedades altamente virulentas (1979-3). También fue recientemente aislado de larvas muertas o enfermas de *Culex quinquefasciatus*, colectadas de pozos de desagüe en Pondicherry, India (1979-1).

3.4.3 Ciclo de vida de *Metarhizium anisopliae*

El ciclo inicia con la germinación, formación de apresorios, formación de estructuras de penetración, colonización y reproducción.

El proceso se inicia cuando la espora o conidia se adhiere a la cutícula del insecto, luego desarrolla un tubo germinativo y un apresorio, con éste se fija en la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto. La germinación ocurre aproximadamente a las 12 horas post-inoculación y la formación de apresorios se presenta de 12 a 18 horas después (Vicentini y Magalhaes, 1996). En la penetración participa un mecanismo físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por la estructura de penetración, la cual rompe las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas, las cuales causan descomposición del tejido en la zona de penetración, lo que facilita el ingreso del hongo. Después de la penetración, la hifa se ensancha y ramifica dentro del tejido

del insecto, colonizando completamente la cavidad del cuerpo del insecto, esto sucede en 3 ó 4 días después de la inoculación. A partir de la colonización se forman estructuras del hongo, lo que corresponde a la fase final de la enfermedad del insecto, ocurre 4 ó 5 días después de la inoculación (Hajek y Leger, 1994).

Otra forma mediante la cual el hongo puede causar la muerte del insecto, es mediante la producción de toxinas. Los hongos entomopatógenos tienen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de la relación patógeno-hospedante. Entre estas toxinas se han encontrado destruxinas, dimetil destruxina y protodestruxina, las cuales son sustancias de baja toxicidad, pero de mucha actividad tóxica sobre insectos, ácaros y nematodos (Sandino, 2003). Las destruxinas afectan varios organelos tales como mitocondrias, retículo endoplásmico y membrana nuclear, paralizando las células y causando disfunción del intestino, túbulos de Malpighi, hemocitos y tejido muscular. La esporulación ocurre en 2 a 3 días, dependiendo de las condiciones de temperatura y humedad relativa del ambiente. La infección por el entomopatógeno puede ser afectada principalmente por la baja humedad relativa y por la falta de habilidad para utilizar los nutrientes disponibles sobre la superficie de la cutícula ó por la falta de factores necesarios para el reconocimiento de un hospedero susceptible o sitio de infección penetrable. El reconocimiento de un hospedero susceptible involucra signos químicos y topográficos. También puede fracasar la invasión del hongo por la presencia de compuestos inhibitorios tales como fenoles, quinonas y lípidos en la superficie de la cutícula (Hajek y Leger, 1994).

Los síntomas que causan los entomopatógenos son variables: las ninfas disminuyen sus movimientos, disminuyen la producción de espuma y pueden abandonar los lugares de ataque. Los adultos infectados presentan movimientos lentos, no se alimentan, reducen su radio de vuelo y las hembras no ovipositan. Pueden morir en lugares distantes de donde fueron contaminados. El ciclo total de la enfermedad es de 8 a 10 días. Después de la muerte, los individuos presentan un crecimiento micelial blanco seguido por la típica esporulación verde. En algunas ocasiones no se presenta la esporulación sobre el tegumento, solamente se ve la

presencia de micelio y se debe a condiciones inadecuadas de humedad durante el proceso de esporulación (Lecuona, 1996).

3.5 Bacterias

3.5.1 *Bacillus*.

El género *Bacillus* spp consta de una gran variedad de especies que se han reportado con efecto antagonista contra diferentes hongos que causan enfermedades en los cultivos, una característica de este género es que puede presentar endosporas que le dan resistencia para soportar condiciones adversas (Delgadillo, 2015)

Una de las alternativas al uso de agroquímicos son las bacterias del genero *Bacillus* spp que poseen características especiales que los hacen buenos candidatos como agentes de control biológico, estas bacterias tienen como fuente de producción enzimas extracelulares, se distinguen por ser Gram positivas, formadoras de esporas, catalasa positiva. Generalmente su habilidad es el suelo formando parte de la rizosfera de plantas. Diversas investigaciones han señalado que este género de *Bacillus* producen enzimas hidrolíticas, tales como proteasas y quitinasas, lo cual ha permitido su utilización tanto industrial como en el control biológico. Ente las especies mas utilizadas se encuentran *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumillas* y *B. polymyxa*(Reinoso y col., Rodas y col.)

Los antagonistas tienen varios modos de acción y la combinación de estos es importante para poder elegir un antagonista ideal. Si estos poseen diversos modos de acción, se reducen los riesgos de que los microorganismos fitopatógenos adquieran resistencia lo cual se logra mediante el uso de combinaciones antagonistas con diferente modo de acción. Así, se han descrito varios mecanismos mediante los cuales los antagonistas ejercen su acción para controlar el desarrollo de microorganismos fitopatógenos (Aceves, 2001- Vero, 2006)

Mediante el uso de hongos y bacterias antagonistas se han podido conocer estrategias con mayor potencial para el control de enfermedades desarrolladas por patógenos del suelo (Cook y Baker, 1983).

3.5.2 Antagonismo.

Es una interacción entre microorganismos donde uno interfiere con el otro, es decir causa la pérdida o la actividad de uno de ellos. Esta es la base sobre la que se sustenta el verdadero control biológico de microorganismos fitopatógenos en las plantas (Perez, 2004).

3.5.3 Antibiosis.

Es el proceso de interacción entre organismos en el cual uno o mas metabolitos son excretados (enzimas hidrolíticas, metabolitos secundarios volátiles y pequeñas moléculas tóxicas) por un organismo y tienen efecto dañino sobre uno o más organismos, actúan normalmente en bajas concentraciones, además, los antibióticos y otros productos tóxicos que son volátiles (como el cianuro de hidrogeno), son capaces de afectar el crecimiento de las células de los microorganismos fitopatógenos.

3.5.4 Competencia.

La competencia surge cuando al menos dos organismos requieren para su funcionamiento del mismo alimento. El consumo de uno reduce la cantidad disponible del otro; al final se impone uno de ellos. La competencia por nutrientes y espacio dentro de su nicho ecológico se realiza en la superficie de la hoja, es el principal mecanismo involucrado en el control de bacterias fitopatógenas; en el caso de hongos es variable. La competencia es un modo de acción indirecto (Aceves, 2001)

Fungistasis. Un buen antagonista es capaz de superar el efecto fungistático que resulta de la presencia de los diferentes metabolitos producidos por otras

especies, incluyendo plantas y sobrevive bajo condiciones adversas o competitivas (Benitez, 2004)

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Planteamiento del problema.

Para poder llevar a cabo el aislamiento de microorganismos, se llevó a cabo un muestreo el cual consistió en la recolección de 8 muestras de distintos puntos de la zona, estos se escogieron preferentemente de áreas donde abundaba la hojarasca, debajo de arbustos o arboles con el fin de asegurar la presencia de microorganismos, posteriormente se procedió a identificar una por una, se tomaron coordenadas y se llevó a laboratorio, donde se utilizaría como primer lugar el bioensayo del insecto cebo, dándole humedad a cada muestra en un pequeño contenedor para brindarle a los microorganismos las condiciones para estos poder invadir a el insecto, una vez identificados los microorganismos se procedería a aislarlos de estos insectos cebo.

4.2 Descripción geográfica y antecedentes del poblado San Vicente.

San Vicente es un poblado con un promedio de 3951 habitantes, está a 100m de altitud, es una zona semi-árida, en la cual abunda una flora de cactáceas, a unos 10 km de San Vicente aprox. en el rancho “Viñedos San José “ se encuentran tierras fértiles, vírgenes las cuales fueron tentadoras a investigar, en este rancho hay flora como el nogal, el sauco, cactáceas entre otros, lo cual fue idóneo para realizar este muestreo, en el cual las coordenadas de cada muestra fueron las siguientes:

Cuadro 1. Coordenadas de los puntos donde se obtuvieron las muestras.

MUESTRA	COORDENADA
1	P1025, 31°16.664N, 116° 00.186O, Altitud: 220m.
2	P1026, 31° 16.610N, 116° 00.804O, Altitud: 222m.
3	P1027, 31° 16.617N, 116° 00.810O, Altitud: 226m.
4	P1028, 31° 16.467N, 116° 02.005O, Altitud: 185m.
5	P1029, 31° 16.466N, 116° 02.004O, Altitud: 193m.
6	P1030, 31° 16.275N, 116° 02.539O, Altitud: 186m.
7	P1031, 31° 16.244N, 116° 02.652O, Altitud: 191m.
8	P1032, 31° 16.444N, 116° 02.601O, Altitud: 186m.

4.3 Recolección de las muestras

Los microorganismos encontrados fueron obtenidos de 8 muestras de suelo, las cuales se obtuvieron de la región de San Vicente, Baja California en una zona donde hasta la fecha no se han aplicado productos benéficos, con el fin de que los microorganismos sean nativos o la probabilidad de esto sea mucho mayor. Dichas

muestras se obtuvieron con ayuda de una barrena a profundidad de 30 cm, se colocaron en bolsas de plástico, se rotularon y se trasladaron al Laboratorio de microbiología de la FINSQ.

4.3.1 Aislamiento de microorganismos

Las muestras de suelo obtenidas, se llevaron a laboratorio para su procesamiento. Se colocaron aproximadamente 50 g de cada muestra de suelo en recipientes de plástico, el cual se humedeció con agua destilada para proporcionar a los hongos y/o bacterias las condiciones para su esporulación e infección; posteriormente se adicionaron 10 larvas de tenebrios (*Tenebrio molitor*, *Coleoptera: Tenebrionidae*). Las muestras se revisaron periódicamente cada 24 horas para observar la mortalidad de las larvas realizando anotaciones en una bitácora.

En las muestras de suelo empezaron a causar efectos sobre las larvas, algunas mostraron necrosis en su cuerpo, causado por bacterias, en otras muestras se mostraron micelios blancos saliendo de las uniones de los segmentos de la larva que al cabo de una semana invadían por completo la larva mostrándose el hongo *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* sobre el cuerpo de las larvas, también se observaron nematodos entomopatógenos alimentándose de las larvas.

4.3.2 Aislamiento de hongos.

Una vez identificados los hongos se toman en probetas para tenerlos apartados de la muestra del suelo, estos serán aislados en un medio de cultivo de PDA en el cual con la ayuda de un aza y un mechero para su desinfección, se colocaran en el medio de cultivo con la técnica estriada, tomando esporas del insecto invadido por el hongo y se sellara para evitar la entrada de otros microorganismos. Se utilizaron medios de cultivo de (Papa Dextrosa Agar) PDA preparando 700 ml a 15 PSI de presión por 20 minutos, el cual posteriormente se

vaciara en cajas Petri en el cual se solidificaran. Una vez observado el crecimiento peculiar de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium*, sobre las larvas de *Tenebrio* de las muestras obtenidas en la región de san Vicente, con ayuda de un aza, se colocaran en el medio de cultivo PDA con la técnica estriada, tomando esporas directamente del insecto invadido por el hongo y se selló para evitar la entrada de otros microorganismos, incubándolas a una temperatura $28\pm 3^{\circ}\text{C}$ por 4 a 6 días. Una vez transcurrido este tiempo, se tomaron explantes de las cepas ya puras para posteriormente colocarlas en caldo nutritivo el cual fue preparado con 200 gramos de papa en 1 litro de agua, hirviéndose por 20 minutos, el caldo nutritivo se esterilizo a 15 PSI de presión por 20 minutos, posterior a esto se colocaron las cepas por 3 días en el agitador a 120 rpm.

4.3.3 Aislamiento de Bacterias

4.3.3.1 Diluciones seriadas.

Para el aislamiento de bacterias se realizaron diluciones de 1 gramo de suelo en tubos de ensayo con 10 ml de agua esterilizada, estas a una concentración de 1×10^{-8} .

Se tomó la concentración de 1×10^{-8} y se depositaron 500 µl en caja petri con medio de cultivo de infusión cerebro corazón y agar bacteriológico, después con una varilla se esparció dentro del medio para el posterior crecimiento de estas.

4.3.3.2. Prueba de Gram

Una vez obtenidas las diluciones de 1×10^{-8} se les dio una prueba térmica que consistió en un tratamiento en baño maria a 80°C por 30 minutos, después se transfirieron 500 µl de la muestra en cajas petri y se incubaron a $28\pm 3^{\circ}\text{C}$.

Posterior a esto las bacterias presentes en las cajas de petri se seleccionaron de acuerdo a sus características morfológicas, se les realizo la prueba de tinción de Gram y se aislaron por el método de estría.

4.4 BIO ENSAYOS

4.4.1 Prueba de antagonismo.

De los *Bacillus* obtenidos en las diluciones se utilizaron las bacterias Gram positivas para evaluar si existe antagonismo con 3 cepas diferentes de hongos fitopatógenos (*Sclerotinia* sp., *Botrytis cinérea*, *Fusarium* sp.). Estos hongos fueron seleccionados debido a la gran relevancia que tienen en cultivos, al causar enfermedades en ellos y disminuir la producción agrícola.

Se enfrentaron cada una de las cepas contra los hongos ya mencionados en medio de PDA, colocando el hongo patógeno en un extremo de la caja y la cepa de *Bacillus* del otro extremo enfrentándolas para evaluar el porcentaje de inhibición de estas cepas, las cajas se rotulo con los datos correspondientes.

En otra caja petri se inoculo el hongo en un extremo de esta, para evaluar el crecimiento del hongo que nos serviría como testigo. Una vez identificados se incubaron a una temperatura variable y se monitoreo el tiempo de llenado del testigo de cada uno de los hongos en la caja petri y el porcentaje de inhibición de la bacteria contra cada uno de los hongos.

Para transformar el crecimiento del hongo en porciento de inhibición, se utilizo la fórmula propuesta por Skidmore (1976) citado por García (2002):

$$GI = \frac{Kr-r1}{Kr} \cdot 100$$

Donde:

GI= Por ciento de inhibición

Kr= Distancia (cm) del crecimiento del hongo, medida del punto de inoculación al margen de la colonia en la caja Petri utilizada como testigo.

r 1= Distancia del crecimiento del hongo a partir del punto de inoculación al margen de la colonia en dirección del antagonista.

5. HIPOTESIS

Los suelos ricos en materia orgánica, aislados de la explotación agrícola, muestran un alto porcentaje de probabilidades de encontrar en ellos microorganismos de capacidad antagónica y entomopatogénica, con características más agresivas que las cepas comerciales.

6. RESULTADOS

De las muestras de suelo obtenidas, los microorganismos entomopatógenos encontrados en larvas de *Tenebrio* fueron los siguientes:

Cuadro 2. Microorganismos obtenidos de las muestras.

MUESTRA	MICROORGANISMO OBTENIDO
1	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Nematodos</i> .
2	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Nematodos</i> .
3	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Nematodos</i> .
4	<i>Nematodos</i> .
5	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Nematodos</i>
6	<i>Metarhizium</i> , <i>Nematodos</i> .
7	<i>Nematodos</i> .
8	<i>Beauveria bassiana</i> , <i>Nematodos</i> .



Figura 1. Larva de *Tenebrio* infectada completamente por *Beauveria bassiana*.



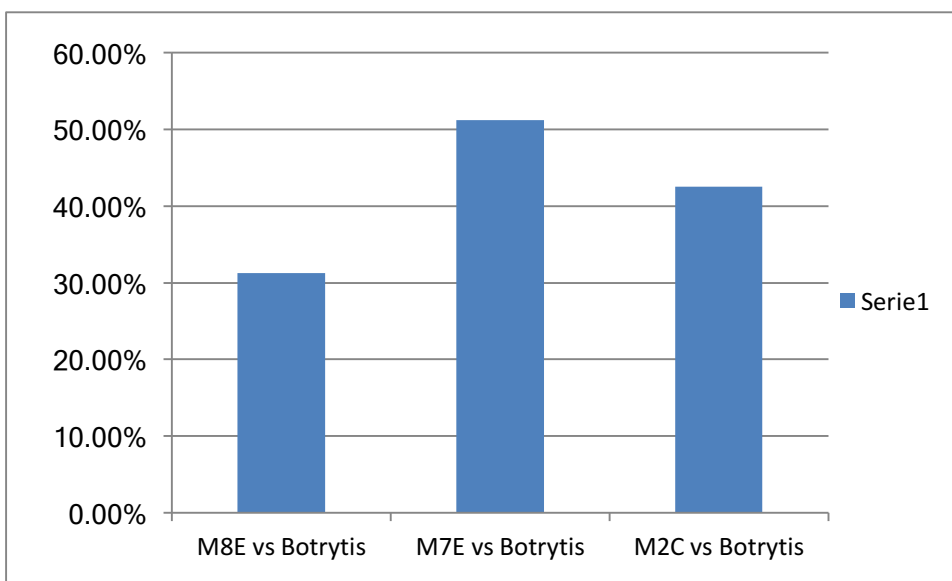
Figura 2. Larva de Tenebrio infectada por Metarhizium.



Figura 3. Nematodos entomopatógenos invadiendo larva de Tenebrio.

6.1 PRUEBA DE ANTAGONISMOS

De cada una de las cepas se realizaron 3 repeticiones para evaluar la inhibición de la cepa contra el hongo patógeno, en base a los resultados obtenidos a lo largo de este bioensayo, se pudo observar que ninguna de las cepas utilizadas presentó antagonismo con *Fusarium* y *Sclerotinia*, solamente se presentó contra *Botrytis C.*, de las cuales la cepa más agresiva contra *Botrytis cinerea* fue la M7E, la cual alcanzo el 50% de inhibición contra este patógeno. Como se puede observar en el cuadro 3:



Cuadro 3. Porcentaje de inhibición de las cepas vs hongo patógeno.

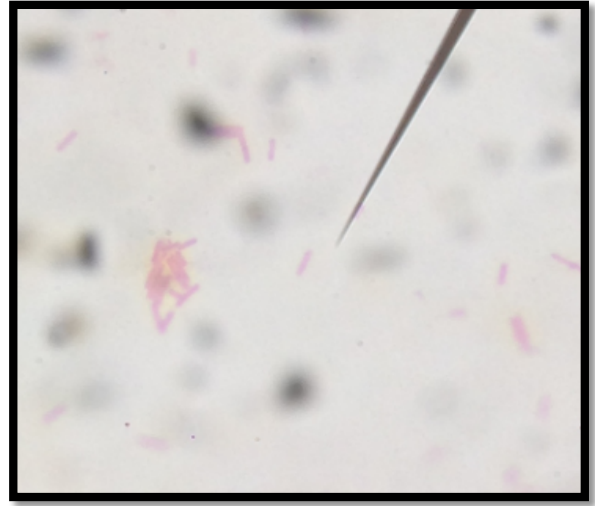


Figura 4. Tinción de Gram, identificación de Bacillus.

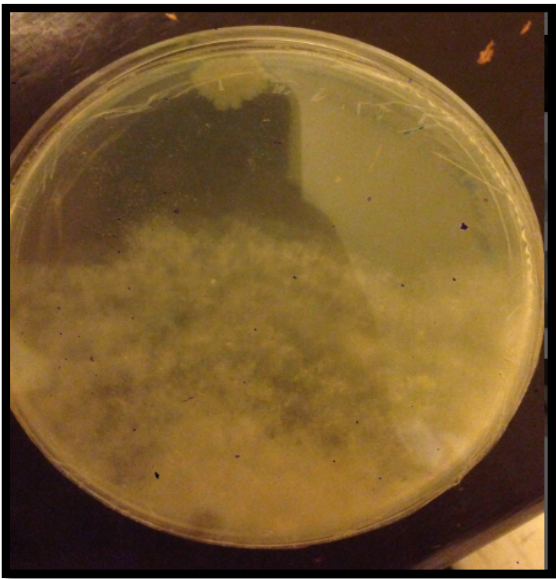


Figura 5. Antagonismo de Bacteria vs Botrytis cinerea

7. CONCLUSIONES

Al realizar los diferentes bioensayos en las muestras tomadas, se observó que la zona cuenta con una gran cantidad de microorganismos entomopatógenos y también antagonistas, cada una de las muestras (M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7 y M8) mostraron microorganismos que servirán para seguir realizando pruebas contra insectos, se pudo observar que la muestra 6 es la única que contenía *Metarhizium*, la cual al realizar el bioensayo del insecto sebo, fue el más agresivo en cuanto a la mortandad de insectos, en cambio la muestra 8 tuvo mayor impacto en el insecto sebo con *Beauveria bassiana*.

En todas las muestras se obtuvieron nematodos entomopatógenos, lo cual nos indica que esa zona nos servirá para una investigación más a fondo, obteniendo estos microorganismos para realizar bioensayos con insectos.

Las pruebas de antagonismo indican que la cepa M7E tiene un porcentaje alto de inhibición contra el hongo patógeno de *Botrytis cinerea*, al haber alcanzado el 50% de su inhibición, por lo cual se seguirá trabajando con esta cepa en bioensayos de campo determinando su adaptación a las condiciones edafoclimáticas de la zona.

8. BIBLIOGRAFÍA

(Michel-Aceves, 2001; Pérez, 2004; Mondinoy Vero, 2006; Ezziyyani et al., 2006)

Alexopoulos, C. J. and Mims, C.W. 1979 introductory mycology. 3 ed. John Wiley and sons. Nueva York. P 632.

Bateman, R.; M. Carey; D. Moore; C. Prior: << The Enhanced Infectivity of *Metarhizium flavoviride* in Oil Formulations to Desert Locusts at Low Humidities >>, *Annals of Applied Biology* 122:145-52, 1993.

Bateman, R.; M. Carey; D. Moore; C. Prior; Y Abraham; D. Moore; N. E. Jenkins; J. Fenlon: << Screening for Virulent Isolates of Entomopathogenic Fungi Against the Dessert Locust *Schistocerca gregaria* (Forsk.) >> *Biocontrol Science and Technology* 6:549-60, 1996.

Benítez T, Rincón A.M., Limón M.C., and Codón A. 2004. Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. 7: 249-260.

Chase ET AL., 1986; Ilud ET AL., 1993; AlveS ET AL., 1998
Kaya, H. K., and Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. *Annual Review of Entomology* 38: 181-206.

Cook, R.J. and R. Baker 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota.

Hajek, A.E; Leger, R.J. St. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect hosts. *Annual Review of Entomology* 39:293-322.

Klein, M. G., Grewal, P. S., Jackson, T. A., and Koppenhofer, A. M. 2007. Lawn, turf and grassland pests. Pp 655-675 in L. A. Lacely and H. K. Kaya, eds. Field manual

of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and other invertebrate pests, second ed. Dordrecht: Springer.

Koppenhofer, A. M. 2007. Nematodes. Pp. 249-264 in L. A. Lacey and H. K. Kaya, eds. Field manual of techniques in invertebrate pathology: Application and evaluation of pathogens for control of insects and others invertebrate pests, second ed. Dordrecht: Springer.

Kung, S. P., Gaugler, R., and Kaya, H. K. 1991. Effects of soil temperature, moisture and relative humidity on entomopathogenic nematode persistence. *Journal of Invertebrate Pathology* 57:242-249.

Lecuona, R.E. ed. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. Argentina. Talleres gráficos Mariano. 338p.

Reinoso-Pozo, Yaritza, Casadesús-Romero, Luis, García-Suarez, Armando, Gutiérrez-Pérez, Jorge, Álvarez-Rivera, V, Pazos (2006). Aislamiento, Selección e Identificación de Bacterias del Género *Bacillus* Antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. *Fitosanidad*. 10 (3):187-191.

Rodas-Junco, B. Adriana, Quero-Bautista, Mireya, Magaña-Sevilla, H, Felipe, Reyes-Ramirez, Arturo (2009). Selecting native *Bacillus* sp. Strains having chitinolytic and proteolytic activity which have been isolated from tropical soils. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 11 (1):107-113

Sandino D., V.M. 2003. Manejo integrado de la salivita de la caña de azúcar. Nicaragua. FUNICA/UNA/CATIE, 26p.

Shapiro-Ilan, D. I., Duncan, L. W., Lacey, L.A., and Koppenhofer, A. M. 2002. Factors affecting commercial success: case studies in cotton, turf and citrus. Pp. 333-355 in Gaugler, R., ed., *Entomopathogenic nematology*. Wallingford: CABI Publishing.

Veronica Cañedo- Teresa Ames (2004). Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos. 18-19.

Vicentini, S; Magalhaes, B.P. 1996. Infection of the grasshopper, *Rhammatocerus schistocercoides* Rehn by the entomopathogenic fungus, *Metarhizium flavoviride* Gams & Rozsypal. *Anais da Sociedade Entomologica do Brasil* 25(2):309-314.