

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

**INSTITUTO DE INGENIERÍA  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



**“ANÁLISIS DE ENZIMAS HIDROLÍTICAS DE LA PARED Y LA MEMBRANA  
CELULAR SECRETADAS POR BACTERIAS ENDOFITAS COMO UN  
FACTOR ANTIFUNGICO CONTRA *Mycosphaerella fijiensis*  
”**

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**GLORIA MARGARITA MACEDO RAYGOZA**

**DIRECTOR**

**DR. MIGUEL JUAN BELTRÁN GARCÍA**

**CODIRECTOR**

**DRA. MONICA CARRILLO BELTRAN**

**Mexicali, B. C.**

## INDICE

INDICE DE FIGURAS.....	3
INDICE DE TABLAS.....	5
INTRODUCCION.....	6
ANTECEDENTES.....	7
Sigatoka negra.....	7
Control biológico.....	9
Factores biológicos antifúngicos.....	10
Lipopéptidos.....	10
Sideroforos.....	11
Ácido cianhídrico.....	13
Enzimas hidrolasas con características antifúngicas.....	14
Quitinasas.....	14
Glucanasas.....	15
Lipasas.....	16
Hidrolasas.....	17
Pared celular fúngica.....	18
JUSTIFICACION.....	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
OBJETIVOS.....	23
OBJETIVOS ESPEFIFICOS.....	23
MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	24
METODOLOGIA.....	26
RESULTADOS.....	32
Determinación de cinética bacteriana.....	32
Prueba del efecto antifúngico en sobrenadantes bacterianos.....	36
Actividad enzimática.....	47
Efecto antifúngico del sobrenadante obtenido a partir de bacteria contra micelio activo de hongo.....	54
Daño mecánico de la hifa.....	58
DISCUSION.....	61
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	69
BIBLIOGRAFIA.....	70

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa geográfico que se deriva del análisis de sensibilidad a fungicidas en dos regiones importantes para la producción de plátano del País, la región Pacífico-Centro (Jalisco y Colima) y la región del Golfo de México (Tabasco).....	8
<b>Figura 2.</b> Estructura de una fegnicina.....	11
<b>Figura 3.</b> Estructura de los ferricromos, sideróforo hidroxamato (Neilands, J.B. 1995).....	13
<b>Figura 4.</b> Estructura de una quitinasa.....	15
<b>Figura 5.-</b> Estructura de una metalo proteasa.....	18
<b>Figura 6.</b> Esquema de la pared celular fúngica.....	20
<b>Figura 7.</b> Curva de crecimiento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a diferentes concentraciones de micelio inactivo de hongo.....	33
<b>Figura 8.</b> Curva de crecimiento de <i>Enterobacter cloacae</i> en las diferentes concentraciones de micelio inactivo de hongo.....	34
<b>Figura 9.</b> Curva de crecimiento de <i>Bacillus cereus</i> en las diferentes concentraciones de micelio inactivo de hongo.....	35
<b>Figura 10.</b> Curva de crecimiento de <i>Enterococcus faecalis</i> en las diferentes concentraciones de micelio inactivo de hongo.....	36
<b>Figura 11.</b> Gráfica de comparación de las tres cepas contra el sobrenadante de <i>Bacillus cereus</i> .....	38
<b>Figura 12.</b> Gráfica de comparación de inhibición de las tres cepas fúngicas en contra del concentrado proteico obtenido del sobrenadante de <i>Bacillus cereus</i> .....	39
<b>Figura 13.</b> Gráfica de comparación de inhibición de las tres cepas fúngicas en contra del concentrado proteico obtenido del sobrenadante de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	40
<b>Figura 14.</b> Gráfica de comparación de las tres cepas contra el sobrenadante de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	41
<b>Figura 15.</b> Gráfico de comparación de inhibición de las tres cepas de <i>M. fijiensis</i> en contra del sobrenadante de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	43

<b>Figura 16.</b> . Gráfica de comparación de inhibición de las tres cepas fúngicas en contra del concentrado proteico obtenido del sobrenadante de <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	44
<b>Figura 17.</b> Gráfica de comparación de inhibición de las tres cepas fúngicas en contra del concentrado proteico obtenido del sobrenadante de <i>Enterobacter cloacae</i> .....	45
<b>Figura 18.</b> Gráfico de comparación de inhibición de las tres cepas de <i>M. fijiensis</i> en contra del sobrenadante de <i>Enterobacter cloacae</i> .....	46
<b>Figura 19.</b> Gráfico de inhibición de MF-1 en contra del sobrenadante obtenido de <i>B. cereus</i> en un cultivo de bacteria contra micelio activo.....	55
<b>Figura 20.</b> Gráfico de la cepa MF-1 en contra del sobrenadante de <i>E. faecalis</i> obtenido de un medio de bacteria contra micelio activo de hongo.....	56
<b>Figura 21.</b> Gráfico del comportamiento de la cepa MF-1 en contra del sobrenadante de <i>P. aeruginosa</i> obtenido del cultivo de la bacteria contra el micelio activo del hongo.....	57
<b>Figura 22.</b> Gráfico del comportamiento de la cepa MF-1 en contra del sobrenadante de <i>E. cloacae</i> obtenido de un cultivo de la bacteria con micelio activo del hongo.....	58
<b>Figura 23.</b> a) Hifas de <i>M. fijiensis</i> con medio PDB como control. b) Hifas de <i>M.fijiensis</i> con tratamiento de 75% de sobrenadante de <i>P. aeruginosa</i> .....	59
<b>Figura 24.</b> a) Hifa de <i>M. fijiensis</i> con PDB como control, teñida con azul tripan. b) hifa de hongo con sobrenadante al 75% de <i>P. aeruginosa</i> teñido con azul tripan.....	59
<b>Figura 25.</b> a) Hifas con PDB como testigo. b) Hifas con 1U de quitinasa comercial, ambas teñidas con azul tripan.....	60
<b>Figura 26.</b> a) Hifa control. b) Hifas con 1U de quitinasa comercial, ambas teñidas con azul de anilina.....	60
<b>Figura 27.</b> a) Hifas de <i>M. fijiensis</i> teñidas con naranja de acridina. b) Hifa de hongo en tratamiento con <i>P. aeruginosa</i> de manera directa.....	61
<b>Figura 28.</b> Gráfica estadística de medias y Fisher LSD, para la comparación de los diferentes medios utilizados en las cinéticas bacterianas.....	62
<b>Figura 23.</b> a) Hifas <i>B. sorokiniana</i> con <i>Bacillus</i> sp. a las 96 horas de inoculado obtenidas por Aktuganov <i>et al</i> en 2007. b) Hifas de <i>M. fijiensis</i> con <i>P. aeruginosa</i> después de 24 horas de inoculación.....	67

**Figura 30.** a) Hifas de *B. sorokiniana* con *Bacillus* sp después de 144 horas de incubación. b) Hifas de *M. fijiensis* con *P. aeruginosa* después de 72 horas de incubación.....68

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Características fenotípicas y fisiológicas de las cepas de hongo.....	32
<b>Tabla 2.</b> Actividad de enzimas hidrolíticas secretadas en el sobrenadante de un cultivo de <i>Bacillus cereus</i> en un medio de fragmentos de micelio.....	48
<b>Tabla 3.</b> Actividad de enzimas presentes en el concentrado proteico de <i>Bacillus cereus</i> .....	49
<b>Tabla 4.</b> Actividad de enzimas hidrolíticas secretadas en el sobrenadante de un cultivo de <i>Enterococcus faecalis</i> en un medio de fragmentos de micelio.....	48
<b>Tabla 5.</b> Actividad de enzimas presentes en el concentrado proteico de <i>Enterococcus faecalis</i> .....	51
<b>Tabla 6.</b> Actividad de enzimas hidrolíticas secretadas en el sobrenadante de un cultivo de <i>Pseudomona aeruginosa</i> en un medio de fragmentos de micelio.....	52
<b>Tabla 7.</b> Actividad de enzimas presentes en el concentrado proteico de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	52
<b>Tabla 8.</b> Actividad de enzimas hidrolíticas secretadas en el sobrenadante de un cultivo de <i>Enterobacter cloacae</i> en un medio de fragmentos de micelio.....	53
<b>Tabla 9.</b> Actividad de enzimas presentes en el concentrado proteico de <i>Enterobacter cloacae</i> .....	53
<b>Tabla 10.</b> Datos obtenidos por Aktuganov <i>et al</i> en 2007 al realizar el análisis de hidrolasas con <i>Bacillus</i> sp.....	65

## 1.- INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra del banano causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* (anamorfo pseudocercospora *fijiensis*) causa pérdidas económicas de hasta el 100% de la producción de banano comercial (variedad enano gigante o Cavendish) e impacta moderadamente algunas otras variedades de banano y plátano de importancia económica. La enfermedad es estrictamente foliar, sin embargo afecta el tamaño del racimo e induce su maduración prematura, lo que impide la comercialización del fruto. El control químico es la alternativa más usada, sin significar que sea la más efectiva. El costo del uso de fungicidas para el control de la enfermedad es alto en varios aspectos: a) se gastan cerca de 16,500 pesos/hectárea anualmente; b) se incrementan de los niveles de resistencia-tolerancia en el hongo ante la presión ejercida por los fungicidas; c) aumentan el daño ecológico y contaminación al medio ambiente cercano a las plantaciones, d) favorecen el desarrollo de enfermedades en el humano por exposición a los fungicidas, incluidas el cáncer, malformaciones genéticas y esterilidad.

Ante la necesidad de fortalecer la industria platanera en México, se ha buscado combatir la Sigatoka negra por medio de estrategias biotecnológicas eficientes y amigables con el medio ambiente y debido a la ineffectividad evidente de los fungicidas. Para esto es necesario buscar alternativas para el control de la enfermedad, donde el control biológico ejercido a través de bacterias tiene grandes oportunidades. Este proyecto es parte del avance científico que busca la consolidación del desarrollo de un biofungicida para el control de la Sigatoka negra que reduzca un 60% la aplicación de fungicidas.

En este trabajo de investigación se pretende analizar los factores antifúngicos (enzimas hidrolíticas de pared y membrana celular) producidos por algunas bacterias que fueron seleccionadas por su alto potencial antifúngico contra el hongo de la Sigatoka negra. Se probaron dos condiciones experimentales que ayudan a entender si durante la interacción bacteria-hongo *in vivo* se secretan las mismas enzimas. Este avance contribuye para el conocimiento del mecanismo potencial que las bacterias ejercen para el control de la enfermedad en las plantaciones de banano cuando son aplicadas en un producto biofungicida.

## **2.-ANTECEDENTES**

### **2.1 SIGATOKA NEGRA Y LA RESISTENCIA A LOS FUNGICIDAS**

La Sigatoka negra es la principal enfermedad que afecta el cultivo de banano en México y en el mundo. Es causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* (anamorfo pseudocercospora fijiensis) Deighton. Este hongo penetra por los estomas e invade el tejido foliar hasta causar la necrosis total de las hojas varias semanas después del ingreso. Causa pérdidas en la producción de la fruta de hasta un 55% por la destrucción foliar, pero se incrementa hasta el 100% porque la fruta tiene una maduración prematura, lo que baja su calidad para los mercados.

Desde hace más de 12 años, la única manera para controlar sigatoka negra ha sido mediante el control químico usando fungicidas de diversos grupos químicos y con distintos mecanismos de acción.

Hay dos tipos de fungicidas que se aplican para el control de la Sigatoka negra, los sistémicos que son capaces de penetrar el tejido foliar y distribuirse en toda la planta y además son unisitio es decir afectan un solo blanco en la estructura celular; y los protectantes, que son foliares, no penetran el tejido pero a diferencia de los sistémicos, tienen más de un blanco en la célula fúngica.

Los fungicidas más utilizados en México son el caberndazim, propiconazol y difeconazol; los tres son fungicidas sistémicos y el mancozeb, un fungicida protectante perteneciente al grupo químico de ditiocarbamatos. Para el tratamiento de la enfermedad anualmente se gastan alrededor de 500 millones de pesos (43.5 millones de dólares) para el combate de sigatoka negra (Beltrán-García *et al* 2009). Este gasto varía dependiendo de la región de la zona productora, por ejemplo, en la región productora de Tabasco, donde las condiciones climáticas son propicias para el crecimiento del hongo (2,500 a 3,000 mm de precipitación anual), se requieren de 45 a 60 ciclos de aspersion de fungicidas sistémicos-protectantes aproximadamente. Mientras tanto en la región productora del Pacífico Centro, son necesarias de 15 a 20 aplicaciones de fungicidas sistémico protectantes (Orozco-Romero, 1998). Uno de los grandes problemas asociados al uso intensivo es la resistencia desarrollada por el fitopatógeno.

En estudios realizados en 2010 (Macedo- Raygoza 2010) se determino que de 1999 hasta el 2010 la concentración requerida de carbendazim para inhibir el desarrollo del hongo aumento 40 veces aproximadamente y se necesitan hasta 120ppm.

En estudios recientes realizados en nuestro laboratorio en 2012(Castillo- Quiroz) se determino que diversas mutaciones en una proteína llamada CYP51 del grupo de proteínas del citocromo P450 (CYP) en *M. fijiensis* confieren resistencia a los fungicidas del tipo de los azoles como el propiconazol y difeconazol entre otros.

En estudios aun no publicados por nuestro grupo señalan que diversas poblaciones de *M. fijiensis* colectadas en diversas zonas productoras del país, muestran resistencia a los fungicidas sistémicos y una alta tolerancia a los agentes protectantes, lo que convierte en prácticamente insostenible el uso de los fungicidas.



**Figura 1.** Mapa geográfico que se deriva del análisis de sensibilidad a fungicidas en dos regiones importantes para la producción de plátano del País,

la región Pacífico-Centro (Jalisco y Colima) y la región del Golfo de México (Tabasco).

Debido a esto se han buscado alternativas para combatir la Sigatoka negra en el banano, así como otras enfermedades en otros cultivos donde la utilización de fungicidas no es sustentable. La utilización de microorganismos con potencial antifúngico, de biofertilización y ecológicamente sustentables es la opción que se está incorporando a los campos de cultivo.

## **2.2 CONTROL BIOLÓGICO: EJEMPLOS EN EL CONTROL DE FITOPATOGENOS.**

El control biológico usando microorganismos o metabolitos de los mismos para reprimir enfermedades en plantas ofrece una alternativa eco-amigable con el ambiente para el control de fitopatógenos en la agricultura.

El **arroz** es uno de los principales cultivos en el mundo, y también uno de los más vulnerables en todas las etapas de su desarrollo. El arroz sufre el tizón bacteriano ocasionado por *Xanthomonas oryzae* y la plaga de la vaina ocasionada por *Rhizoctonia solani* siendo de las más destructivas y generando pérdidas de alrededor de 50% mundialmente. Estudios realizados en 2001 (Ragurajan *et al* 2002) se midió la actividad antifúngica de cepas de *Pseudomonas spp.* en contra de estos dos patógenos, mostrando una inhibición de hasta 71% y 38% respectivamente.

*Pseudomonas spp.* es una bacteria conocida por su amplia distribución en el suelo, la habilidad para colonizar rápidamente la rizosfera de la planta hospedera y por su habilidad de producir un rango muy amplio de compuestos inhibidores de muchos fitopatógenos.

Otro cultivo de gran importancia agrícola es el **trigo**, este se ve afectado por el hongo *Fusarium graminearum* ocasionando enfermedades desde el suelo de la plántula, que se expresa en pérdida de la germinación, reducción del tamaño de la planta.

Dal bello *et al* (2001) utilizaron microorganismos benéficos de la rizosfera de trigo en contra *F. graminearum*. En el estudio se logró aislar del suelo *Trichoderma spp.* y bacterias que no fueron totalmente identificadas, al hacer los ensayos de inhibición, estas lograron inhibir hasta un 100% el crecimiento

del patógeno y algunas cuantas inclusive lograron los síntomas de la enfermedad en la planta.

Esto nos demuestra que el control biológico se está convirtiendo en componente importante en el control de enfermedades agrícolas. Es por eso que el desarrollo de técnicas para aislar y analizar microorganismos con potencial de agente de biocontrol es crucial.

Actualmente en el mercado ya existen productos con microorganismos como agente activo, algunos de los más utilizados son *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas fluorescens*, etc., estos están siendo aplicados en una gran cantidad de cultivos alrededor del mundo.

### **2.3.- FACTORES BIOLÓGICOS ANTIFÚNGICOS**

Muchas especies utilizadas en biocontrol emplean una serie de mecanismos como antibiosis, competencia, producción de ácido cianhídrico, sideróforos, pigmentos fluorescentes y compuestos antifúngicos para antagonizar patógenos.

#### **2.3.1 LIPOPEPTIDOS**

*Bacillus subtilis* es una de las bacterias más ampliamente utilizada para control biológico hoy en día y esto es debido a la habilidad para producir una amplia gama de antibióticos entre los cuales encontramos los lipopéptidos de las familias de surfactinas, iturinas y fengicinas.

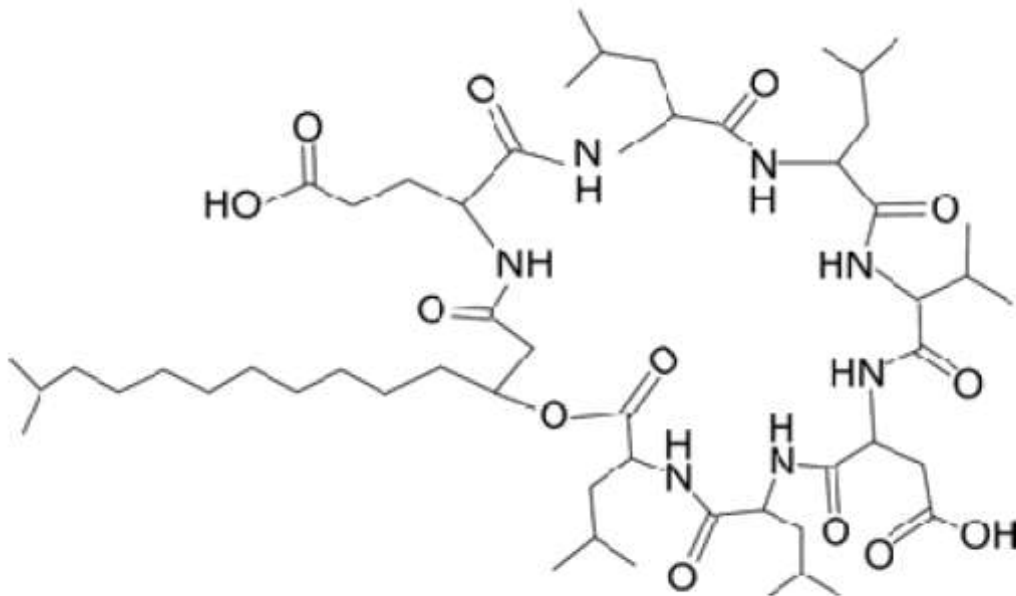
Los lipopéptidos de la familia de las iturinas, representados por iturina A, micosubtilina y bacilomicina, son los más estudiados por su fuerte actividad antifúngica en contra de un amplio rango de patógenos de plantas (Yanez-Mendiazábal *et al*, 2011). Las iturinas contienen un ácido graso  $\beta$ -amino y siete  $\alpha$ -aminoácidos con D-tirosina como segundo aminoácido y dos D-aminoácidos adicionales en la posición 3 y 6.

La surfactina es un heptapéptido cíclico que tiene propiedades anfifílicas, este lipopéptido no es fungitóxico por sí solo, pero presenta actividad antifúngica en sinergismo con iturina A, es por eso que ha sido investigado con gran interés en el área biomédica debido a su actividad microbiana, la inhibición de coágulos, su actividad antiviral y antitumoral y como inhibidor enzimático (Velho *et al* 2011).

Las fengicinas, que también son llamadas plipastatinas, comprenden fengicina A y B. Así como las iturinas, las fengicinas tiene una fuerte actividad antifúngica, pero actúan más específicamente en contra de hongos filamentosos. La molécula de fengicina es un péptido cíclico de diez aminoácidos con residuos de ácidos grasos de 14-18 carbonos enlazados al amino terminal del péptido.

El mecanismo de acción de este lipopéptido es menos conocido en comparación con los otros lipopéptidos, pero exhiben un gran potencial para alterar la estructura y permeabilidad de la membrana celular fúngica.

Estos lipopéptidos han sido asociados en el control de diversas enfermedades de hongo fitopatógenos así como de enfermedades presentes en los frutos.



**Figura 2.** Estructura de una fengicina.

### 2.3.2 SIDEROFOROS

Debido a que el hierro, es poco asimilable por las células, los microorganismos han desarrollado estrategias para absorber el hierro disponible en su medio ambiente sin importar la cantidad ( $10^{-18}$  M de  $Fe^{+3}$ ). Para su asimilación se requiere de la secreción de quelantes de hierro de alta afinidad llamados sideróforos (Mercado-Blanco, *et al* 2007).

Los sideróforos son agentes quelantes de hierro de bajo peso molecular, son producidos por bacterias y hongos bajo condiciones de estrés ocasionado por

una baja de hierro como en los suelos. Estos permiten que los microorganismos secuestren y solubilicen iones de hierro.

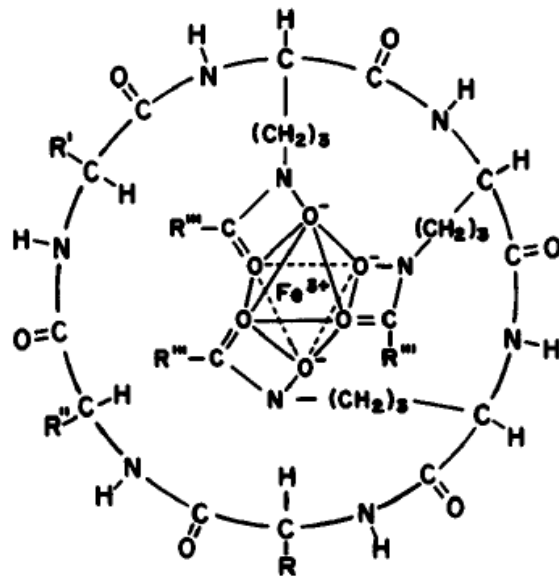
La capacidad de las bacterias para promover el crecimiento de la planta puede ser resultado de un mecanismo directo o indirecto, que incluye la producción de sideróforos.

Aunque algunos sideróforos varían generalmente en la estructura química se clasifican en dos grupos principales: catecol e hidroxamato, de acuerdo al grupo químico involucrado en la quelación de hierro (Tortora *et al* 2011).

El ácido salicílico ha sido reportado como un sideróforo de *Azospirillum*, se cree que este sideróforo puede incrementar los mecanismos de defensa de la planta, por lo que se piensa que la secreción de ácido salicílico excretado en el medio puede ser reconocido por las raíces de la planta induciendo señales para la resistencia sistémica.

La pioverdina o pseudobactinas son una clase prevalente de sideróforos producido por *Pseudomonas* spp. Este sideróforo tiene ambos grupos (catecol e hidroxamato). Algunas cepas *Pseudomonas* son capaces de usar sideróforos heterólogos para cumplir con su demanda de hierro. Esta estrategia le confiere ventajas importantes de selectividad en condiciones limitadas de hierro, además de economizar los esfuerzos metabólicos e incrementar la competitividad para la colonización en rizosfera, raíz y suelo, y como consecuencia, la capacidad de reprimir enfermedades en la planta. Además, esta estrategia también implica la inducción de otras proteínas de membrana externa específicas para los sideróforos exógenos.

En estudios de nuestro laboratorio (Cisneros-Reyes, 2012), se demostró que los géneros bacterianos como *B. cereus*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, entre otros, son capaces de producir compuestos que atrapan el hierro, pero desconocemos el tipo de sideróforo que utilizan para asimilarlo.



**Figura 3.** Estructura de los ferricromos, un sideróforo tipo hidroxamato (Neilands, J.B. 1995).

### 2.3.3 Ácido cianhídrico

El cianuro es producido naturalmente por plantas, bacterias, algas y hongos, esto es resultado de una unión con metaloproteínas, especialmente citocromos, que están relacionados con el proceso de respiración (Sarethy *et al* 2011). Hay algunos microorganismos cianotrofos que descomponen este cianuro en ácido cianhídrico a pH elevados.

La producción de HCN por parte de los microorganismos usados en biocontrol, crean un ambiente propicio para la proliferación de bacterias que promueven el crecimiento de la planta.

Además, ha sido documentado que la producción de HCN e hidrolasas pueden estar involucrados en el antagonismo hacia fitopatógenos y contribuir en el biocontrol de enfermedades de plantas (Guo Y. *et al* 2007).

## 2.4.- ENZIMAS HIDROLASAS CON CARACTERISTICAS ANTIFUNGICAS

### 4.1 QUITINASAS

La quitina es un homopolimero constituido por residuos de N-acetyl-D-glucosamina (Glc-NAc) mediante enlaces  $\beta$ -1,4; siendo de los compuestos más abundantes en la naturaleza, después de la celulosa. La quitina es un componente común de los exo-esqueletos de los insectos, el cascarón de crustáceos y de las paredes celulares de hongos.

Muchas especies de bacterias, hongos e incluso plantas tienen la capacidad de producir enzimas que degradan la quitina, denominadas quitinasas. Se piensa que la producción de quitinasas en plantas puede ser parte de un mecanismo de defensa en contra de hongos patógenos, mientras que la producción de estas enzimas en bacterias sea para la asimilación de quitina como fuente de carbono y nitrógeno (Chang *et al* 2009).

La producción de quitinasas por parte de hongos no solo es para un proceso de degradación de quitina exógena, sino también para una degradación de la pared celular fúngica y un proceso de remodelación de la misma (Hartl *et al* 2011).

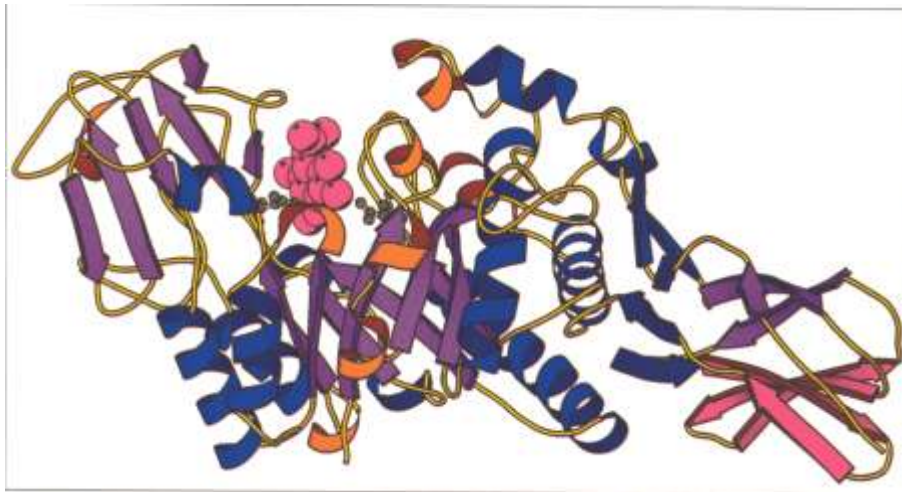
Se ha demostrado que los microorganismos quitinolíticos al igual que las enzimas quitiniolíticas tienen aplicaciones potenciales como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos e insectos.

Varios géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Serratia* y *Bacillus* son conocidas por producir quitinasas para la utilización de quitina como fuente de carbono y nitrógeno, además de presentar un aumento en su producción cuando el medio es suplementado con restos de pared celular fúngica, esto debido a que la pared celular fúngica está compuesta en su mayoría por quitina, y las quitinasas son conocidas por tener la capacidad de lisar la pared celular tanto de hongo activo como inactivo (Gomaa E.Z. 2011).

Estudios realizados por Chang *et al* en 2009 muestran que una cepa de *Bacillus subtilis*, bacteria que se utiliza ampliamente como microorganismo de biocontrol, es capaz de secretar 166U de quitinasa en un medio donde solo se utiliza quitina como fuente de carbono; después de purificar esta enzima, B.

*subtilis* mostró actividad antifúngica en contra del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum*.

Además se ha observado que las enzimas quitinolíticas producidas por *B.cereus* parecen estar involucradas en el biocontrol en contra de *Rhizoctonia solani*.



**Figura 4.** Estructura de una quitinasa.

#### 2.4.2 GLUCANASAS

El glucano es un polisacárido estructural de la pared celular fúngica, constituye aproximadamente 50-60% de la pared. Está compuesto de residuos de glucosa que se ensamblan en cadenas por medio de una gran variedad de enlaces químicos.

Una de las enzimas que se encuentran ampliamente distribuidas en plantas y bacterias son las  $\beta$ -1,3 glucanasas, clasificándose en glucanasas de plantas de la familia 17 de las hidrolasas glucósidas, mientras que las glucanasas bacterianas se encuentran en la familia 16.

Las glucanasas generalmente se clasifican en endo  $\beta$ -1,3- glucanasas y exo  $\beta$ -1,3 glucanasas de acuerdo a su acción hidrolítica de sustratos específicos.

Debido a que el  $\beta$ -1,3 glucano es el componente más abundante de la pared celular fúngica, una extensiva hidrólisis de la pared celular ocasionada por estas enzimas puede debilitar la fuerza mecánica de la pared, llevando a la lisis celular del hongo (Cheng, Y., *et al*, 2008).

Se ha reportado que juegan un papel fisiológico y ecológico como proveedor y transportador de fuentes de carbono, factores de infección y defensa en parasitismo o patogénesis (Arlorio, M. *et al*, 1992).

Estas enzimas tienen diversas aplicaciones, pero son ampliamente utilizadas en el sector agrícola como agente de biocontrol en plantas para protegerlas de hongos patógenos, por ejemplo, las glucanasas de *Pseudomonas* sp. inhiben *Rhizoctonia solani* y *Fusarium solani* (Cheng *et al* 2008).

La enfermedad de Hickman que causa el pudrimiento de la raíz en frambuesa ha sido suprimido por la aplicación de actinomicetos que fueron seleccionados por la producción de  $\beta$ -1,3;  $\beta$ -1,4 y  $\beta$ -1,6 glucanasas (Whipps, J., 2000).

Junto con las quitinasas, estas enzimas han sido llamadas hidrolasas antifúngicas, debido a que son capaces de inhibir el desarrollo de hongos, principalmente fitopatógenos.

La mayoría de los hongos de crecimiento lento, como los fitopatógenos, son insensibles a quitinasas o glucanasas solas, pero la mayoría de ellos son fuertemente inhibidos por la combinación de estas dos enzimas (Arlorio, M. *et al*, 1992).

#### 2.4.3 LIPASAS

Las lipasas son triacilglicerol hidrolasas que en tiempos recientes, han sido enzimas clave para una industria biotecnológica en crecimiento.

Estas enzimas son ampliamente producidas por microorganismos, y específicamente las lipasas bacteriana juegan un papel importante comercialmente hablando. Entre los géneros bacterianos más importantes que las producen son *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter* y *Chromobacterium*. De estos géneros, las lipasas de *Pseudomonas* son las más ampliamente usadas en diferentes aplicaciones biotecnológicas.

Las lipasas actúan bajo condiciones acuosas en los enlaces carboxil-éster presentes principalmente en triacilgliceroles para liberar ácidos grasos y glicerol. El sustrato natural de las lipasas son cadenas largas de triacilgliceroles, que tiene poca solubilidad en el agua y su reacción es catalizada por lípidos en la interface (Gupta *et al* 2004).

Bajo condiciones micro acuosas, las lipasas poseen la habilidad única de llevar a cabo reacciones reversas, llevando a una esterificación. Además poseen una actividad estereolítica permitiéndoles tener un amplio rango de sustratos.

#### 2.4.4 HIDROLASAS

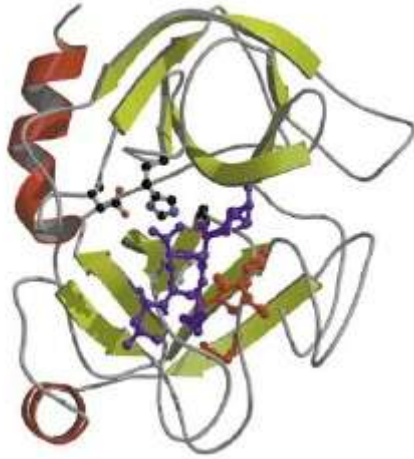
La producción de antibióticos por parte de las bacterias utilizadas como agentes de biocontrol parecer ser el mecanismo más probable de acción, pero si las células fúngicas son lisadas y la pared celular degradada, entonces se asume este fenómeno por lo general, a la secreción de enzimas degradadoras de pared celular fúngica o hidrolasas, incluso si son producidas al mismo tiempo que los antibióticos.

Se han hecho innumerables investigaciones para identificar estas hidrolasas en bacterias utilizadas como biocontrol, aunque se ha encontrado evidencia de la presencia y actividad en la rizosfera.

Las proteasas constituyen un grupo importante entre las hidrolasas utilizadas industrialmente.

Las proteasas se clasifican de acuerdo a su sitio catalítico en cuatro clases: serin proteasas, cisteín proteasas, aspartico proteasas y metalo proteasas.

Muchas de estas enzimas se encuentran en bacterias, hongos y plantas siendo las responsables micoparasitismo de algunos *Streptomyces* spp. y la supresión parcial de las enfermedades en plantas observadas cuando se encuentran en presencia de pared celular fúngica, quitina, o laminarin (Trejo-Estrada *et al* 1998).



**Figura 5.-** Estructura de una metalo proteasa.

## **2.5.- PARED CELULAR FÚNGICA**

La pared celular fúngica es un organelo dinámico que funciona en incontables procesos. Debe de proveer a la célula con la fuerza mecánica suficiente para resistir los cambios de presión osmótica ocurridos en el ambiente. Además, debe de tener una plasticidad adecuada para permitir el crecimiento, la división celular y la formación de una gran variedad de tipos de células durante todo el ciclo de vida del hongo. Es por eso, que para mantener su integridad en contra del estrés ambiental, la pared permite a las células fúngicas interactuar con su alrededor (Bowman *et al* 2006).

La pared celular fúngica, compuesta de polímeros complejos de  $\beta$ -1,3 glucanos y  $\beta$ -1,6 glucanos, manoproteínas y pequeñas cantidades de quitina, son esenciales para la integridad celular aportando mecanismos de protección en contra del estrés ambiental. Existe evidencia de entrecruzamiento entre glucanos, quitina y otros componentes de la pared celular.

Esta complejidad estructural implica que el rompimiento celular pueda requerir una acción de sinergismo de varias enzimas (Cheng, Y. M. *et al* 2008).

La pared celular es una estructura altamente dinámica que está sujeta a cambios constantes, por ejemplo durante la expansión celular, la germinación de esporas, etc. (Adams D.J. 2004).

El entrecruzamiento y la unión de los diferentes polímeros y el mantenimiento de la plasticidad durante la morfogénesis, pueden depender de un amplio rango de enzimas hidrolíticas que se encuentran asociadas con la pared celular

fúngica. La mayoría de estas enzimas hidrolíticas tiene actividad de quitinasas o glucanasas y un gran número de estas también exhiben actividad de transglicosilasas. Por lo tanto, estas pueden contribuir al rompimiento y reconstrucción de los enlaces dentro y entre los polímeros llevando una remodelación de la pared durante el crecimiento y la morfogénesis.

En los hongos filamentosos, las microfibrillas de quitina están formadas por puentes de hidrógeno. Este polímero cristalino tiene una enorme fuerza tensil y contribuye significativamente a la integridad total de la pared celular. Es por eso que cuando se interrumpe la síntesis de quitina, la pared se vuelve desordenada y las células fúngicas se malforman y se vuelven osmóticamente inestables.

La síntesis de quitina esta mediada por quitina sintasa, una enzima integral de membrana que cataliza la transferencia de N-acetylglucosamina de un uridin-fosfato (UDP)-N-acetylglucosamina para crear una cadena de quitina nueva.

El  $\beta$ -1,3 glucano sirve como constituyente principal al cual los otros constituyentes de membrana están covalentemente unidos. Como resultado, la síntesis de  $\beta$ -1,3 glucano es esencial para una formación apropiada de la pared celular y un desarrollo normal del hongo.

Los polímeros de  $\beta$ -1,3 glucano, así como los de quitina, son generados por complejos enzimáticos asociados con el plasma de membrana y llevado al espacio extracelular.

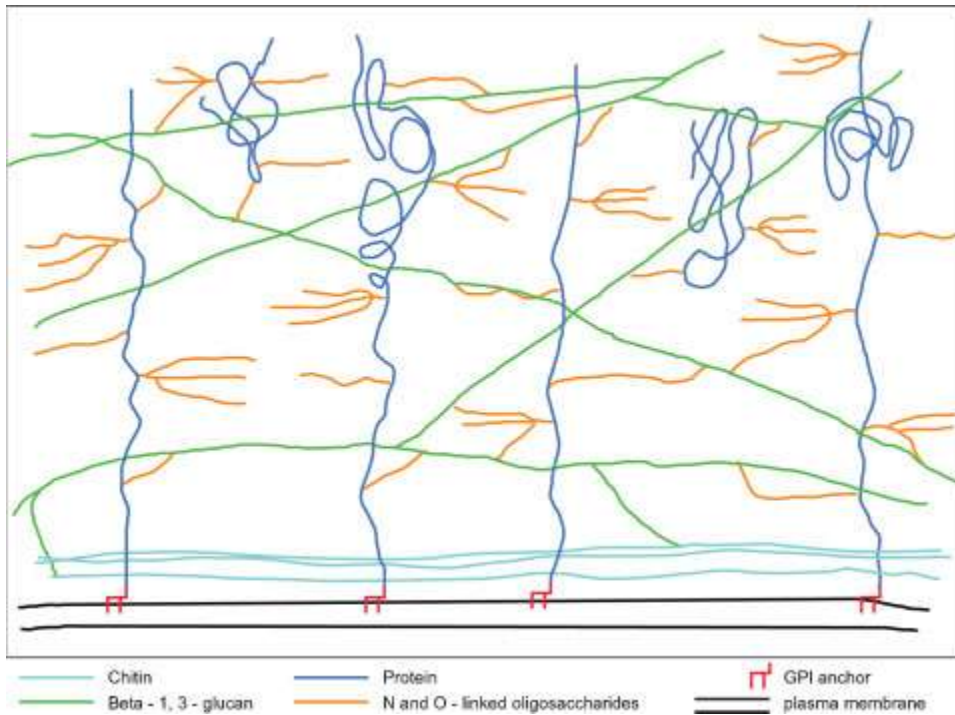
Las glucano sintasas son las responsables de catalizar la formación de largas cadenas lineares de glucano, cada uno compuesto de aproximadamente 1500 residuos de glucosa unidos por enlaces  $\beta$ -1,3. Dentro de cada cadena de glucano, la posición del carbono 6 de aproximadamente 40-50 residuos de glucosa se convierte en sitios en los cuales  $\beta$ -1,3 glucanos adicionales se unen para generar una estructura ramificada.

La mayoría de las proteínas de pared celular son glicoproteínas que han pasado a través de una ruta de secreción que llevan a la pared celular.

Estudios proteomicos con varios hongos han identificado un número pequeño de proteínas citosolicas y mitocondriales asociadas con pared celular.

Las proteínas tradicionales de pared celular son glicoproteínas que son extensamente modificadas con N- u O-oligosacaridos.

La estructura de las cadenas de oligosacáridos pegados a estas glicoproteínas difiere entre el género de los hongos.



**Figura 6.** Esquema de la pared celular fúngica. Líneas azul claro corresponden a quitina, líneas azul fuerte a proteínas, líneas verdes a beta-1,3-glucanos, líneas naranjas a –N y –O oligosacáridos, líneas rojas corresponden a anclas y líneas negras a plasma de membrana.

### 3.- JUSTIFICACIÓN

El uso excesivo de fungicidas para el control de la Sigatoka negra, representa una amenaza para la sustentabilidad de la industria bananera, ya que hay un gasto económico excesivo y esto provocó un aumento en la resistencia del hongo a dichos productos. En función de esto, pensamos que a través del uso de bacterias endófitas de la planta del banano seleccionadas por su capacidad antifúngica se convierte en una alternativa biotecnológica para el control de esta enfermedad. En los últimos 6 años en nuestro laboratorio se ha enfocado en el desarrollo de un biofungicida que disminuya la utilización de fungicidas hasta en un 60% y aumente el vigor de las plantas, y por lo tanto fruta de mejor calidad. Este trabajo se enfoca a entender uno de los posibles mecanismos que participan en la actividad antifúngica de bacterias incluidas en la mezcla biofungicida.

### 4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los microorganismos beneficios para las plantas son de interés para su aplicación en agricultura así como para ser utilizados en biofertilizantes o pesticidas, con fines de aplicación en fitorremediación, principalmente aquellos microorganismos que viven asociados a las plantas durante su ciclo de vida, llamados endófitos. Estas bacterias, por el manejo agrícola, son disminuidas o desaparecidas del microambiente de la planta o del suelo.

Se han seleccionado 50 bacterias con alto potencial de control biológico sobre cepas resistentes a los fungicidas del hongo de la Sigatoka negra, a partir de un muestreo inicial que logro obtener 400 aislados. Dicho análisis se enfocó principalmente a bacterias nativas del ambiente de banano, pensando que en su reintroducción a los huertos las bacterias soportaran el medio ambiente del cultivo y el exceso de pesticidas (cosa que no ocurre con los productos comerciales a base de *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*). Se ha observado la presencia de las bacterias comunes entre los huertos y en otras su presencia es específica de algún rancho. Los géneros que se han aislado con actividad antifúngica contra *M. fijiensis* corresponden a *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Klebsiella* (*Raoultella*), *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Serratia*, *Escherichia*, *Paenibacillus*, *Acinetobacter*, *Aerococcus*, *Escherichia*,

*Burkholderia* y *Pantoea*. De acuerdo a estos análisis estas comunidades microbianas suelen comportarse como bacterias endófitas, endófitas facultativas y epífitas. Estudios recientes de nuestro laboratorio muestran que estas bacterias tienen la capacidad de secretar metabolitos de naturaleza proteica quitinasas, quitosanas y lipasas (Torres-Cruzaley, 2010). Un estudio en curso muestra la capacidad antifúngica de los sobrenadantes bacterianos sobre el desarrollo del micelio *in vitro* desarrollados en un medio de quitina coloidal obtenida de la cáscara de camarón (Cruz-González, 2010). Por lo que según estudios reportados en la literatura son microorganismos potenciales para ser usados dentro de una formulación biofungicida comercial.

Debido a los resultados obtenidos en previas investigaciones de nuestro laboratorio, esta investigación seguirá con la búsqueda de una alternativa para controlar *Sigatoka* negra, que sea amigable con el ambiente y además, sea obtenido a partir de la producción de metabolitos bacterianos y que muestre una alta actividad antifúngica en contra de *M. fijiensis*.

## **5.- OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la actividad antifúngica de hidrolasas de la pared y membrana celular secretadas por bacterias endófitas del banano usando como sustrato de crecimiento un medio de cultivo a base de micelio inactivado de *M. fijiensis* (polvos de cetona) y un micelio activo del hongo para probar la actividad antifúngica de los sobrenadantes en cultivos de *M. fijiensis*.

### **6.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- A. Evaluar el efecto antifúngico del sobrenadante de cultivos bacterianos utilizando un medio de fragmentos de micelio inactivo de *Mycosphaerella fijiensis* inactivos (polvos de acetona) sobre el desarrollo de micelio de cepas resistentes a los fungicidas.
- B. Medir las actividades de las enzimas quitinasas, glucanasas, lipasas y proteasas en el sobrenadante con actividad antifúngica.
- C. Determinar el porcentaje de inhibición del sobrenadante y las actividades de las enzimas hidrolasas en cultivos mixtos de bacterias y micelio activo de *M. fijiensis*, en caldo papa dextrosa.

## 7.- MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.

### Equipos, Materiales y Reactivos

- Cajas de petri (KLINICUS).
- Microplacas de 12 pozos (Falcon).
- Matraces Erlenmeyer de 250ml (Pyrex).
- Espátulas (CORNING).
- Embudo (Pyrex).
- Asas microbiológicas
- Lámpara de alcohol de vidrio
- Micropipetas (Beta-Pette, CLP).
- Puntillas de 1ml (CLP).
- Puntillas de 200µl (CLP).
- Puntillas de 5ml (CLP).
- Microtubos (Ependorff).
- Viales
- Gasa
- Gradilla
- Celdas para espectrofotómetro (Perkin Elmer).
- Pizeta
- Plancha (Cimarec-2).
- Tubos de ensayo haach
- Cubre objetos
- Porta objetos.
- Agar soya tripticaseína (bioxon).
- Caldo soya tripticaseína (bioxon).
- Tween 80.
- $Mg_2SO_4$  (JT BAKER).
- $K_2HPO_4$  (JT BAKER).
- $KH_2PO_4$  (JT BAKER).
- Para- nitro fenol (SIGMA).
- Para nitro fenol butirato (SIGMA).
- Tirosina (SIGMA).
- Caseína (SIGMA).
- Ácido tricloroacético (SIGMA).
- Ácido 3,5- dinitro salicílico (SIGMA).
- Laminarin (SIGMA).
- Quitina de camarón (SIGMA).
- Quitinasa (SIGMA).
- Agar para métodos estándar (Bioxon).
- Agar bacteriológico (BIOXON)
- Peptona de carne (Bioxon).

### Reactivos y Fungicidas

- Agar PDA (BD bioxon).
- Caldo PDB (difco).

### EQUIPOS

- Espectrofotómetro UV-Vis lambda 25 (PERKIN ELMER).

- Incubadora (FELISA).
- Agitador orbital (Lab-Line).
- Balanza analítica (OHAUS).
- Autoclave.
- Campana de flujo laminar (VECO).
- Centrifuga con condiciones controladas.
- Micro centrifuga (Eppendorf).

## 8.- METODOLOGIA

### *MEDIO DE FRAGMENTOS DE MICELIO DE HONGO*

Se colectó micelio de *M. fijiensis* de cultivos puros obtenidos en el laboratorio de diversas cepas del laboratorio, entre ellas Mf-1, 85, Ch63d, NHR2K, etc. El micelio proveniente de medio de cultivo líquido se separó del agar, se filtró con gasa y se lavó con agua destilada. Una vez eliminada el agua, se le agregó acetona cubriendo todo el micelio y se permitió su evaporación con la finalidad de deshidratarlo completamente, complementando el secado con estufa a 65 °C. El material seco se fragmentó utilizando mortero y nitrógeno líquido hasta obtener un polvo que se tamizó por malla de 100 µm.

Se prepararon medios líquidos con fragmentos de hongo al 0,7% y se complementaron con 0,25g de Sulfato de Magnesio (MgSO<sub>4</sub>) y 0,5g de Fosfato de potasio dibásico (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) por cada 100 ml y se verificó que el pH del medio este ente 6.5 y 7. Posteriormente se esterilizó.

### *DETERMINACIÓN DE CINETICA BACTERIANA POR EL MÉTODO DE CONTEO EN PLACA*

En un medio de fragmento de micelio de hongo a 0.7%, se inocularon inicialmente 1 000 000 UFC/ml de medio de cultivo, ajustando absorbancia a 0.2 (600nm) y se medió el desarrollo bacteriano cada 4 horas las primeras 24 horas, posteriormente cada 12 horas hasta completar 48 horas totales de incubación.

La cuantificación del numero de UFC/ml se hizo por la técnica de conteo en placa, que consistió en tomar 1ml de la muestra y diluirlo en 9ml de solución salina isotónica (0.9%) estéril, siendo esta dilución la correspondiente a 1:10, a partir de este tubo se realizaron las siguientes diluciones tomando 1ml del tubo anterior hasta llegar a la dilución deseada.

De las diluciones que se desearon medir, se tomó 1ml y se colocó en una caja de petri con agar método estándar, se extendió perfectamente por la superficie y se dejó secar. Una vez seco, se incubaron a 35°C por 24 horas y se procedió a hacer

el conteo de las colonias, cabe mencionar que se cuenta aquella caja que tenga de 30 a 300 UFC.

#### *OBTENCIÓN DEL SOBRENADANTE BACTERIANO*

Se activaron las cepas que se mantienen en un agar-peptona-NaCl al agregar 2mL de caldo nutritivo casoy y se incubaron a 35°C por 18-24hrs o más si la bacteria en cuestión así lo requiere. Una vez transcurrida la incubación, se sembró en agar casoy. Se incubaron en el agar por 24hrs a 35°C. Se tomó una colonia y se inoculó en 10mL de solución salina isotónica (0.9%) previamente esterilizada hasta que alcanzó una absorbencia de 0,2 a una longitud de onda de 600nm. La suspensión obtenida se agregó a un medio líquido de fragmentos de micelio. Se incubaron a 16 hrs en un agitador orbital a 150 rpm, 30°C. Pasada la incubación, en una campana de flujo laminar y usando un sistema de filtración Millipore, estéril se obtuvo el sobrenadante

#### *PRUEBA DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE LOS SOBRENADANTES LIBRES DE BACTERIAS*

Con el sobrenadante libre de bacterias se añadió en las siguientes concentraciones en función del medio papa dextrosa (PDB).

Concentración	Sobrenadante	Medio PDB
25 %	1500 µl	4.5ml
50 %	3000 µl	3.0ml
75 %	4500 µl	1.5ml

En una microplaca de 12 pozos se colocó la mezcla del sobrenadante más el medio PDB de la siguiente forma: Del vial que contiene la mezcla añadir 2ml a cada pozo indicando en las microplacas el porcentaje que corresponde. Posteriormente se añadieron 100mg del micelio de una cepa de *Mycosphaerella fijiensis* a cada pozo que contenga la mezcla, realizar el mismo procedimiento para

las cepas de hongos, 85 Y MF-1. Se incubaron por 8 días con agitación de 24 rpm y se recolectó la biomasa obtenida.

#### Recolección de Biomasa

De las microplacas se retiró la biomasa del medio de cultivo y se colocó en pequeños sobres de papel de aluminio previamente pesados. Se secó en una estufa por 10 días a 65° C hasta obtener un peso constante. Una vez transcurrido este tiempo se registró la biomasa y se comparó con la obtenida en el cultivo testigo.

### *MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE HIDROLASAS*

#### Obtención del precipitado de proteínas

Los ensayos de actividad y zimograma se realizaron usando sobrenadante concentrado, preparado de la siguiente forma: el sobrenadante se trató con 5 volúmenes de acetona para solvatar las proteínas. El sobrenadante se enfrió a -10°C durante toda la noche. Pasado el tiempo se centrifugó a 4 500rpm durante 15min a 4°C para obtener el precipitado. El precipitado se suspendió en una solución amortiguadora de fosfatos 0.1M a pH 6.8.

#### Actividad de Glucanasa.

Esta actividad se determinó por un método colorimétrico, que mide la cantidad de azúcares reductores liberados del laminarin. El ensayo se realizó usando 200 microlitros de sobrenadante y 200 microlitros de una solución de 5 mg/ml de laminarin en 0.1 M de acetato de sodio como amortiguador a pH 5. Después de una incubación a 40°C en agitación por 30 minutos, la reacción se detuvo al calentar a ebullición por 5 minutos. Se añaden 200 microlitros al 1% de ácido dinitrosalicílico (DNS) y se calentó a ebullición durante 5 minutos. Una vez terminado, la mezcla de reacción se puso en hielo. La absorbancia se midió a 540 nm. La cantidad de azúcar reductor liberado se calculó a partir de una curva

estándar hecha con glucosa. La actividad se expresa en unidades (micromoles de glucosa/minuto). (Gonzalez-Teuber, M., et al. 2010).

#### Actividad de Lipasa.

Para la determinación de esta actividad, se corrió una cinética enzimática. Para la mezcla de reacción se colocó 1ml del sobrenadante obtenido y se le agregan 5ml de buffer de fosfatos pH 6.8, posteriormente se agregaron 50 microlitros de una solución de p-nitrofenol butirato 150mM, se agitó gentilmente con vortex y se colocó en las cubetas de reacción del espectrofotómetro UV-VIS durante 30 minutos a 40°C, leyendo cada minuto la actividad. La liberación de p-nitrofenol (p-NP) se midió de acuerdo al siguiente protocolo: Una unidad se define como la cantidad de enzima que libera 1 mmol de pNP o MUF por minuto en las condiciones de ensayo a partir de p-nitrofenol-butirato. La cantidad de p-nitrofenol liberado se midió a 405 nm. (Ruiz, et al.2003; Park, D.S. et al. 2007).

#### Actividad de proteasa

200 microlitros del sobrenadante se mezcla con 2.5 ml de caseína al 1% disuelta en una solución amortiguadora de fosfatos (pH 7) y se incubó a 37°C por 10 minutos. La reacción se detuvo por la adición de 5 ml de 0.19 M de ácido tricloroacético. La mezcla de reacción se centrifuga a 14 000 rpm por 10 minutos y los péptidos solubles en el sobrenadante fueron medidos usando tirosina como compuesto de referencia. Una unidad de proteasa se define como la cantidad de enzima requerida para producir 1 micromol de tirosina por minuto. (Park, I.J. et al. 2003).

#### Actividad de Quitinasa

Preparación de la Solución de quitina (sustrato): Se preparó una solución de quitina coloidal con una concentración de 10mg/mL en solución amortiguadora de fosfatos 0,1M con pH de 6,00.

Solución blanco: Se agregó 1ml de la solución de quitina coloidal e incubar a 37°C por 30 minutos. Pasado el tiempo se agregaron 100 microlitros de la solución amortiguadora de fosfatos, incubar a 37°C por 1 hora. Se detuvo la reacción en un baño maría a ebullición por 10 minutos. Pasados los 10 minutos se centrifugó a 14 000rpm por 5 minutos para eliminar cualquier remanente de quitina que pueda quedar.

Mezcla de Reacción: Se agregó 1ml de la solución de quitina coloidal y se incubó a 37°C por 30 minutos. Pasado el tiempo se agregó 400 microlitros de las proteínas, obtenidas mediante precipitación con acetona, y se incubó a 37°C por 1 hora. Se detiene la reacción en un baño maría a ebullición por 10 minutos. Pasados los 10 minutos se centrifugó a 14 000rpm por 5 minutos para eliminar cualquier remanente de quitina que pueda quedar. Posteriormente se tomaron 400 microlitros del sobrenadante y se le agregaron 500 microlitros de solución de DNS y se aforaron a 1ml con buffer de fosfatos pH 6 y se pusieron a ebullición durante 20 minutos. Una vez terminado, la mezcla de reacción se puso en hielo. La absorbancia se midió a 540 nm. (Gonzalez-Teuber, M., et al. 2010, Torres-Cruzaley, 2010).

#### *ANALISIS DE DAÑOS LITICOS A LA HIFAS DE M. fijiensis.*

##### Preparación del micelio

Cepas del hongo se inocularon en caldo papa dextrosa con 1% de tween 80, esto para evitar que las hifas se hagan conglomerados (pellets) de micelio, se incubaron durante 7-8 días en un agitador orbital a 150rpm.

Una vez separada las hifas, en una placa multipozos de 12 pozos se colocó caldo PDB y 200µl de hifas como blanco, las muestras se preparan añadiendo caldo PDB con sobrenadante bacteriano al 75% y se comparó con 1U de quitinasa comercial de *Streptomyces* y caldo con bacterias ajustadas a una absorbancia de 0.2 (600nm), esto por separado y triplicado cada prueba y se le agregaron 200 µl de hifas.

Se dejaron incubar a 150rpm, durante 24, 48 y hasta 72 horas.

Durante cada colecta se tomaron 100µl del blanco y de cada tratamiento y se colocaron en un porta objeto.

#### Análisis microscopico

Para poder visualizarlo en el microscopio se hicieron 3 tinciones para el tratamiento con bacteria y 2 para los tratamientos de sobrenadante y quitinasa.

La primera tinción es con azul de anilina, después de colocar los 100µl de tratamiento se agregó 1 gota de este colorante, se dejó reposar por 5 minutos y se colocó un cubre objetos y se visualizaron en el microscopio de contraste de fase al 100X.

Para la segunda tinción que es con azul de tripano, se sigue el mismo procedimiento que para el azul de anilina, estas tinciones se aplican en los tres tratamientos.

La última tinción fue con naranja de acridina, se tomaron 500µl del tratamiento y se colocaron en un tubo eppendorf esteril, se le añadieron 2 gotas del colorante y se deja reposar por 10 minutos, pasado el tiempo se tomaron 100µl y se colocaron en un porta objetos y se cubrió con un cubre objetos. La muestra se observó en un microscopio de fluorescencia al 100X. Esta tinción solo es para el tratamiento con bacterias.

#### *PRUEBA DEL EFECTO ANTIFÚNGICO EN CULTIVOS MIXTOS DE BACTERIA Y MICELIO DE *M. fijiensis**

Se probaron algunas bacterias seleccionadas en un cultivo mixto con micelio de cepas resistentes a los fungicidas de *M. fijiensis*. La prueba se realizó en placas multipozos siguiendo el mismo procedimiento usado para evaluar el efecto del sobrenadante (objetivo 3). La medición enzimática se realizó de la misma forma antes mencionada.

## 9.-RESULTADOS

En total se analizaron 3 cepas de *M. fijiensis*; una proveniente de la región productora de banano de Tabasco (Ch63d), una de Colima (85) y la cepa control del laboratorio Mf-1 proveniente de la región de Jalisco.

CEPA	CARACTERISTICAS	RESISTENCIA
Ch63d	Albina	Resistente a carbendazim y azoxiestrobina. Sensible a propiconazol.
85	Albina con pigmentos color rosado	Resistente a carbendazim y azoxiestrobina. Sensible a propiconazol.
Mf-1	Negra con gran cantidad de melanina	Sensible a carbendazim, azoxiestrobina y propiconazol.

**Tabla 1.** Características fenotípicas y fisiológicas de las cepas utilizadas en este trabajo.

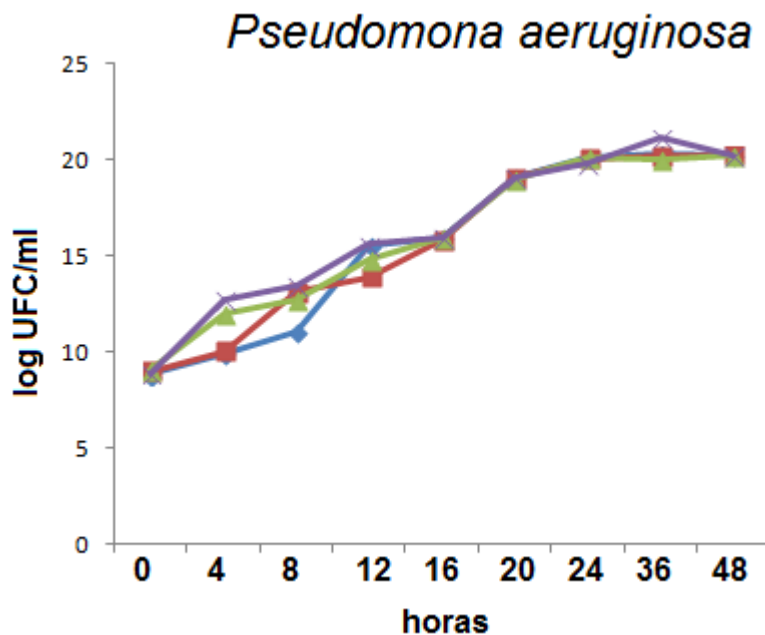
Y se utilizaron como agentes de biocontrol 4 cepas bacterianas endófitas de banano correspondientes a los géneros de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter cloacae* y *Enterococcus faecalis* provenientes del predio de la Uva ubicado en Cihuatlán, Jalisco.

### 9.1 Determinación de la cinética bacteriana (OBJETIVO 1)

Las 4 cepas bacterianas se inocularon en un medio de micelio inactivo de hongo a las siguientes concentraciones: 0.35%, 0.7% y 1%, usando como blanco un medio de caldo soya tripticaseína al 1% con el fin de determinar la concentración ideal para el crecimiento de las bacterias.

En la figura 7, se muestra la curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en los cuatro medios antes mencionadas. Se puede observar que al llevar la cinética hasta 48 horas de crecimiento esta apenas alcanza la fase estacionaria, sin llegar a la fase de muerte. A partir de las 4 horas se observa cómo es que la bacteria alcanza la fase log hasta que se llega a las 20 horas donde se comienza a verse la

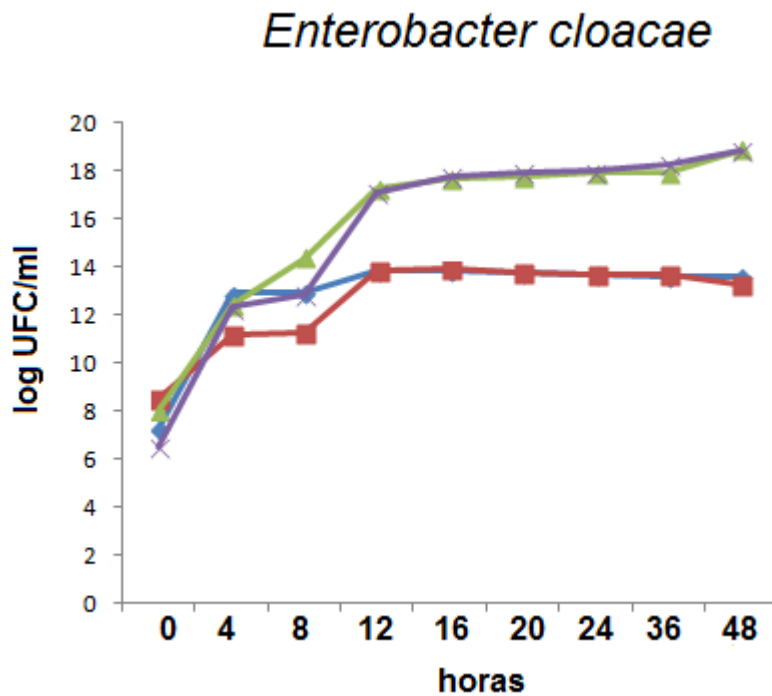
fase estacionaria en todos los medios. También, podemos observar, la cantidad de microorganismos presentes en el medio, en las primera 4 horas de incubación, el medio casoy y el medio de MH1% , son los que mayor cantidad de bacterias presentan, reportando 13 log UFC/ml y 12 log UFC/ml respectivamente, mientras que los medios de 0.35% y 0.7% de micelio de hongo apenas alcanzan los 10 log UFC/ml. Cumplidas las 16 horas, no hay una diferencia significativa para ningún medio en lo que respecta a la cantidad de microorganismos presentes. Analizando la gráfica, no se observan diferencias en el crecimiento al usar distintas concentraciones del medio diseñado y el medio comercial ajustado al 1%..



**Figura 7.** Curva de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* a diferentes concentraciones de micelio inactivo de hongo. Línea azul 0.35% de micelio de hongo, línea roja 0.7% de micelio de hongo, línea verde 1% de micelio de hongo y línea morada 1% de casoy.

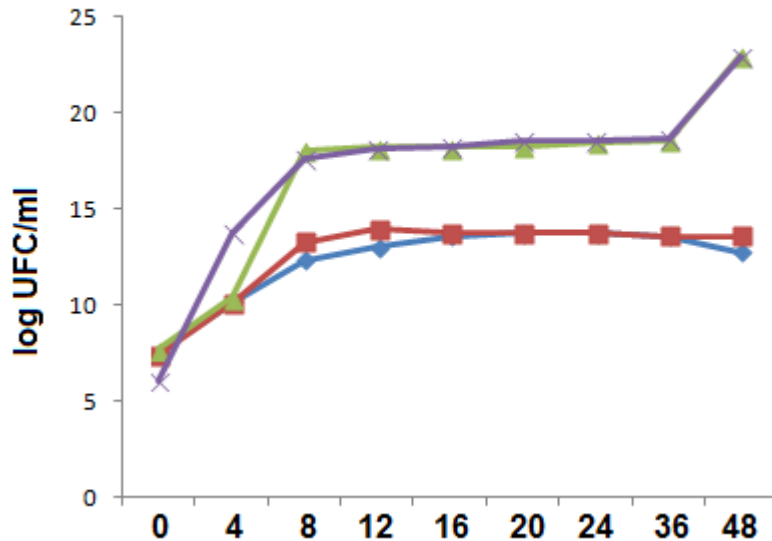
Mientras, en la figura 8 se observa la cinética correspondiente a *Enterobacter cloacae*, en comparación con la curva mostrada en la figura 6, podemos observar una diferencia marcada entre la concentraciones de 0.35% y 0.7% de micelio

inactivo de hongo y 1% tanto de micelio inactivo así como de caldo soya tripticaseína. Se puede observar que en las primeras 4 horas la bacteria entra en fase log hasta llegar a las 12 horas, a partir de las 12 horas se mantiene en fase estacionaria. También podemos observar que el medio de 0.35% y 0.7% de micelio de hongo mantienen la misma cantidad de microorganismo (13 log UFC/ml), mientras que en los medios de 1% de micelio de hongo y 1% de casoy mantienen 15 log UFC/ml. En esta gráfica se puede observar una diferencia entre los medios de 0.35% y 0.7% de micelio de hongo, y los de 1% tanto de micelio de hongo como de casoy, esta diferencia se observa a partir de las 12 horas de incubación.



**Figura 8.** Curva de crecimiento de *Enterobacter cloacae* en las diferentes concentraciones de micelio inactivo de hongo. Línea azul 0.35% de micelio de hongo, línea roja 0.7% de micelio de hongo, línea verde 1% de micelio de hongo y línea morada 1% de casoy.

## *Bacillus cereus*

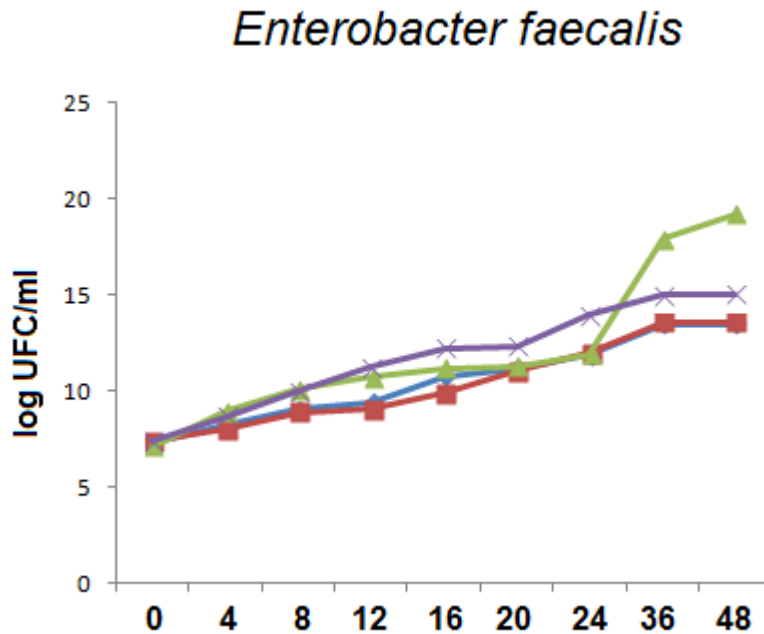


**Figura 9.** Curva de crecimiento de *Enterobacter faecalis* en las diferentes concentraciones de micelio inactivo de hongo. Línea azul 0.35% de micelio de hongo, línea roja 0.7% de micelio de hongo, línea verde 1% de micelio de hongo y línea morada 1% de casoy.

*Enterobacter cloacae* y *Bacillus cereus* (Figura 9) muestran mucha similitud en sus cinéticas de crecimiento. Además de mostrar la diferencia de crecimiento en los medios, reportando aproximadamente 17 log UFC/ml para los medios de 1% de casoy y micelio de hongo y aproximadamente 12 log UFC/ml para los medios de 0.35% y 0.7% de micelio de hongo. También, en ambas se puede ver claramente como entran en fase estacionaria, solo que a diferencia de *E. cloacae*, *B. cereus* entra en esta fase a las 8 horas. Además, para los medios de 0.35% y 0.7% de micelio de hongo, se ve como empiezan a entrar en su fase de muerte a las 48 horas de incubación.

Para el caso de *Enterococcus faecalis* (Figura 10) no se presenta una diferencia entre las 4 concentraciones, pero a diferencia de la *Pseudomonas aeruginosa* su crecimiento no es tan acelerado, podría considerarse que esta cepa bacteriana es de crecimiento lento, además si se observa la gráfica en la concentración de 1%

de micelio inactivo, las últimas 24 horas presenta un aumento de su población, llegando hasta 20 log UFC/ml.



**Figura 10.** Curva de crecimiento de *Enterobacter faecalis* en las diferentes concentraciones de micelio inactivo de hongo. Línea azul 0.35% de micelio de hongo, línea roja 0.7% de micelio de hongo, línea verde 1% de micelio de hongo y línea morada 1% de casoy.

## 9.2 Prueba del efecto antifúngico en sobrenadantes bacterianos.

La actividad antifúngica mostrada en los sobrenadantes bacterianos probados en contra del fitopatógeno fue diferente, en su mayoría se debe al tipo de cepa de *M. fijiensis* ya que de las 3 cepas analizadas, 2 (85 y Ch63D) son altamente resistentes a los fungicidas carbendazim y azoxiestrobina, que son de los fungicidas más ampliamente utilizados para el control de la enfermedad.

La concentración utilizada de micelio inactivo de hongo fue de 0.7%, tomando en cuenta las curvas de crecimiento.

Se utilizo, aparte del sobrenadante obtenido, un concentrado de proteína obtenido a partir del sobrenadante, disuelto en buffer de fosfatos.

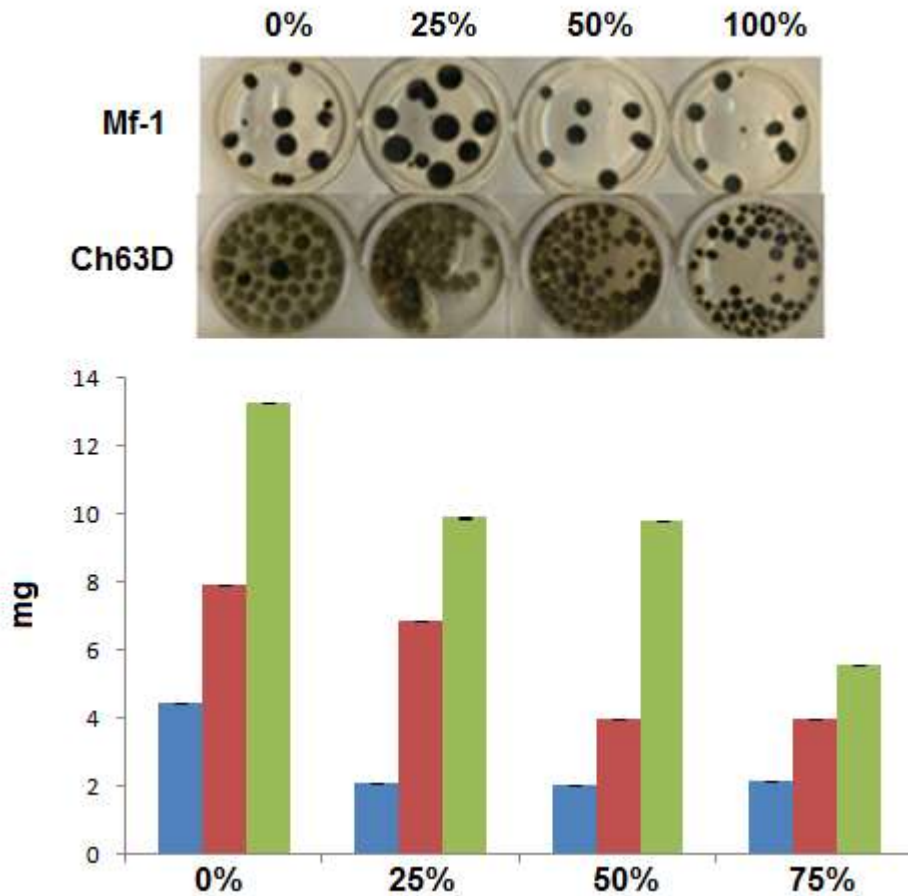
## ***Bacillus cereus***

Con el sobrenadante de esta cepa se puede observar que de las tres cepas de *M. fijiensis* las que más se inhibieron fueron la cepa MF-1 y Ch63d, provenientes del estado de Jalisco y Tabasco respectivamente, mientras que la cepa 85 fue la que menos se inhibe.

El sobrenadante de *Bacillus cereus* logra inhibir cerca del 50% a la cepa Ch63d utilizando la concentración de 25%, con la concentración de 50% y 75% la inhibición, comparada con el control, sigue siendo cerca del 50%. Observando la tabla 1 notamos que la cepa Ch63D es resistente a carbendazim y propiconazol. Mientras que con la cepa Mf-1, que es la cepa control ya que es sensible a todos los fungicidas, la inhibición que se logra con este sobrenadante es del 25.5% con la concentración más baja (25%), con 50% se observa el mismo porcentaje de inhibición aproximadamente, mientras que con 75% la inhibición es de 57.8%, siendo esta última la concentración más efectiva.

Para la cepa 85, la inhibición lograda con el sobrenadante de *Bacillus subtilis* es muy baja comparada con las dos cepas anteriores, ya que con la concentración de 25%, solo se logra inhibir el 13.49% de la biomasa del patógeno, y con las concentraciones restantes (50% y 75%), se logra inhibir un 49.55%. Analizando la tabla 1, observamos que al igual que la cepa Ch63d, 85 es una cepa resistente a carbendazim y axosiestrobina.

## SOBRENADANTE *Bacillus cereus*



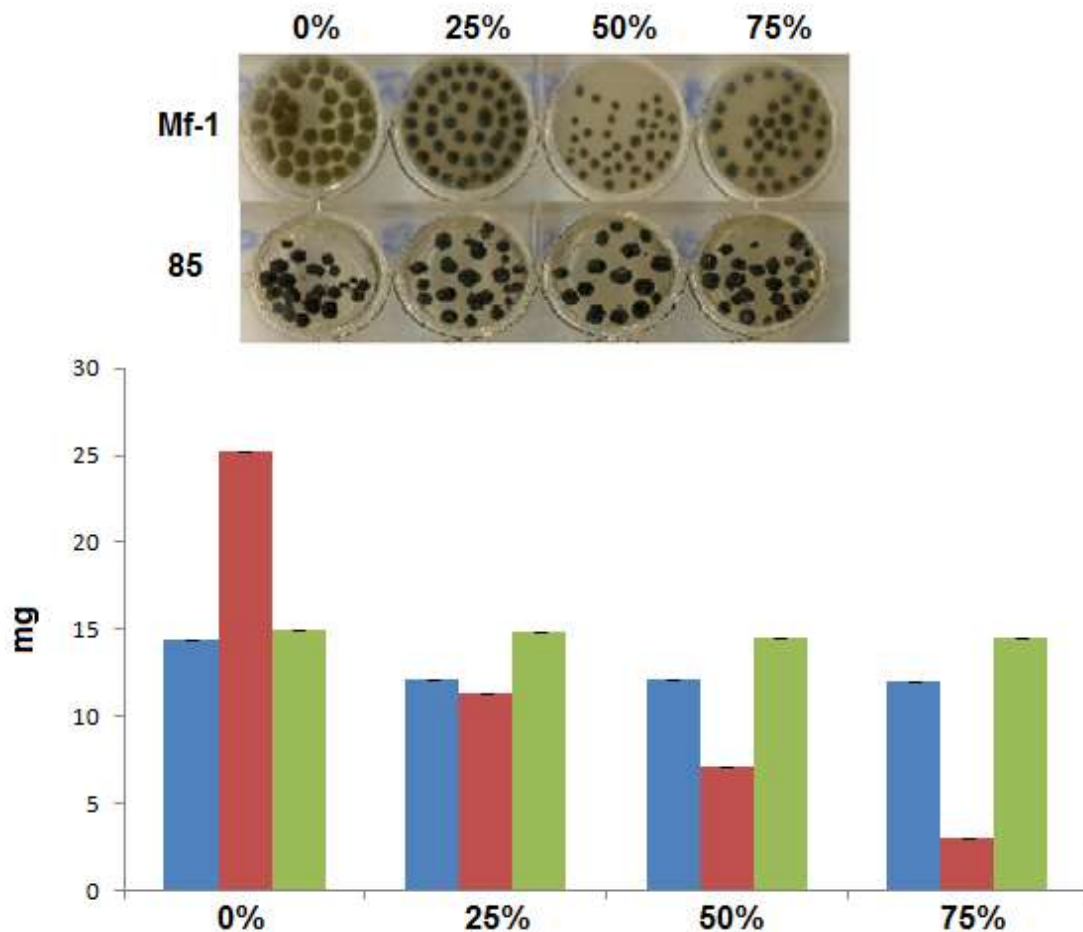
**Figura 11.** Gráfica de comparación de las tres cepas contra el sobrenadante de *Bacillus cereus*. Barras azules corresponden a la cepa Ch63D, barras rojas corresponden a la cepa 85 y barras verdes a la cepa Mf-1.

Con el concentrado de proteína obtenido a partir del sobrenadante de esta bacteria, se observa que la cepa que fue mayormente inhibida es la Mf-1 (Figura 12), presentando una inhibición del 55.16% con la concentración de 25%, mientras que las concentraciones de 50% y 75% la lograron inhibir un 71.43% y 88.10% respectivamente.

Para Ch63d, 25% y 50% de concentración de concentrado de proteína fue de un 16.15%, y a 75% de concentración fue de 16.42%. Mientras que para 85, la mayor

inhibición que logro darse fue del 3.07% utilizando la mayor concentración, 75% de concentrado de proteína.

## CONCENTRADO PROTEICO *Bacillus subtilis*



**Figura 12.** Gráfica de comparación de las tres cepas contra el concentrado protéico de *Bacillus cereus*. Barras azules corresponden a la cepa Ch63D, barras rojas corresponden a la cepa Mf-1 y barras verdes a la cepa 85.

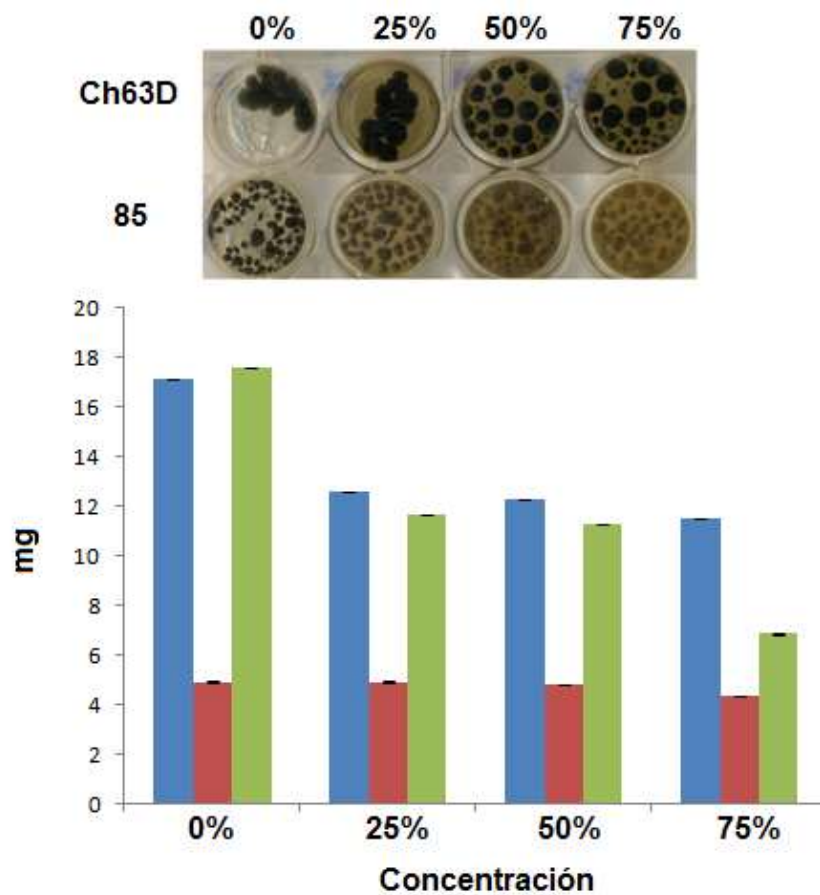
### ***Enterococcus faecalis***

Con esta bacteria gram negativa, el uso de concentrado de proteínas se observa muy poca inhibición de micelio del hongo, siendo siempre, al igual que con *Bacillus subtilis*, 75% la concentración más efectiva.

Para la cepa MF-1, a concentración de 25% se logra una inhibición de 33.75%, mientras que con las concentraciones de 50% y 75% se logra una inhibición del

35.80% y 61.02% respectivamente. Esta fue la cepa que mayor inhibición presento, ya que la cepa Ch63d presento una inhibición del 32.75% con la concentración de 75% y 85 presento una inhibición del 11.56% con esta misma concentración

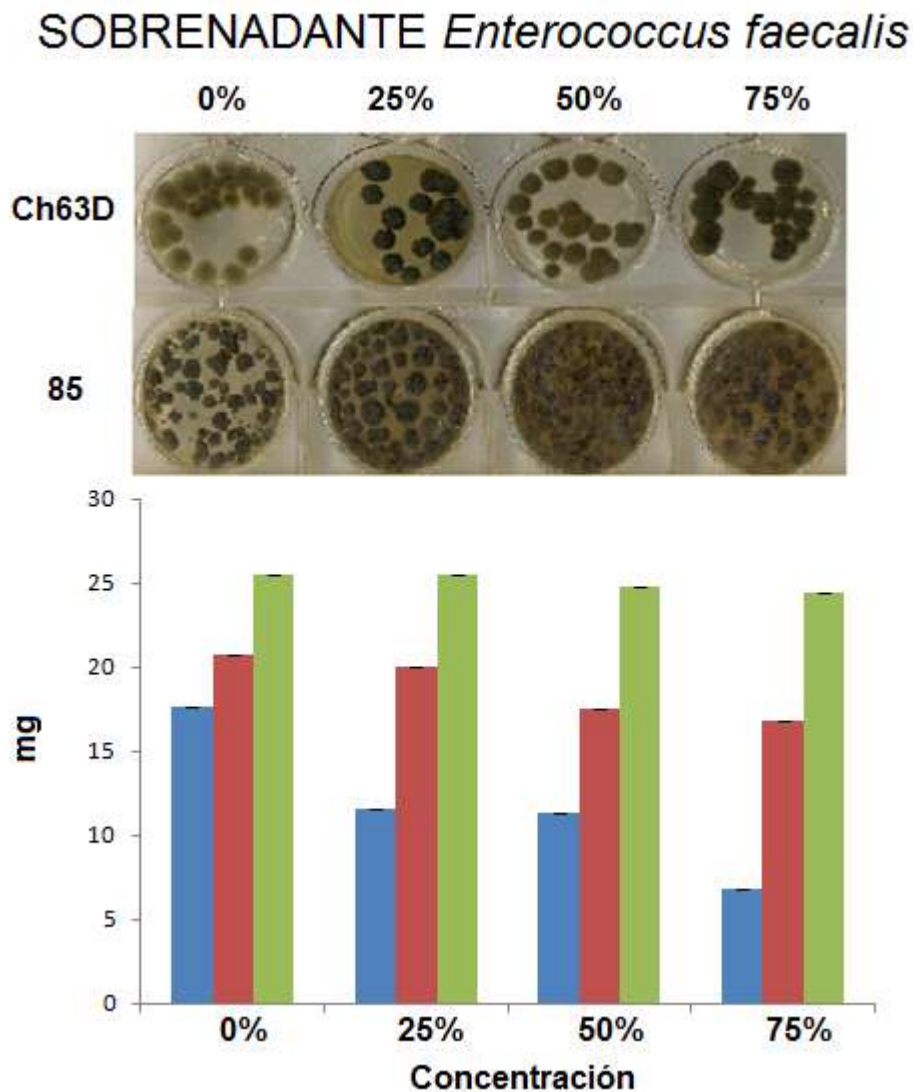
### CONCENTRADO PROTEICO *Enterococcus faecalis*



**Figura 13.** Gráfica de comparación de inhibición de las tres cepas fúngicas en contra del concentrado proteico obtenido del sobrenadante de *Enterococcus faecalis*. Barras azules corresponden a la cepa Ch63D, barras rojas corresponden a la cepa 85 y barras verdes a la cepa Mf-1.

Mientras que con el sobrenadante puro de esta bacteria, la cepa que mayor inhibición presento es la Mf-1 nuevamente, logrado reducir la biomasa hasta un 20%% con la concentración más alta (75%).

Ch63D, se logró inhibir un 18.81% con una concentración de 75% y 85 fue en la que se redujo menos la cantidad de biomasa, logrando solamente un 4.31% de inhibición con una concentración de 75% (Figura 14).



**Figura 14.** Gráfica de comparación de inhibición de las tres cepas fúngicas en contra del sobrenadante de *Enterococcus faecalis*. Barras azules corresponden a la cepa Mf-1, barras rojas corresponden a la cepa Ch63D y barras verdes a la cepa 85.

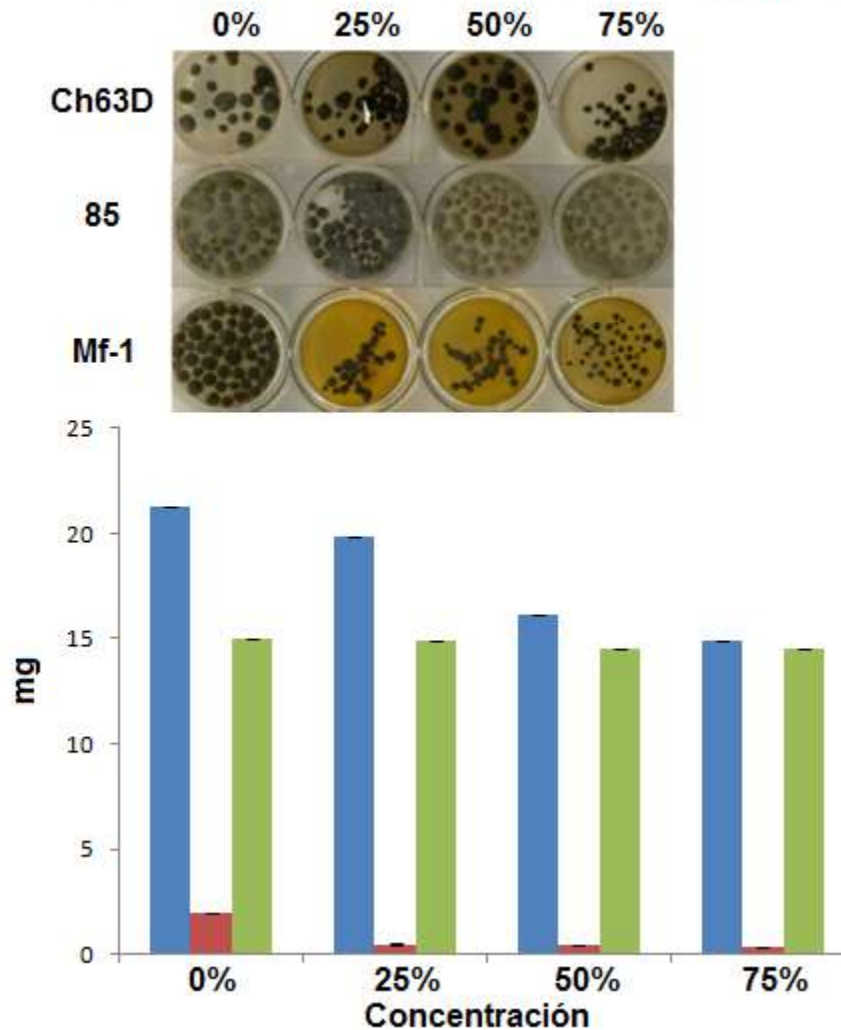
### ***Pseudomonas aeruginosa***

En la Figura 15 se puede observar que el uso de sobrenadante de esta bacteria logra inhibir en un 77% la cepa Mf-1 utilizando la concentración de 25%, mientras que con 50% se inhibe un 78.5% y con 75% de concentración, se logra inhibir un 82% la biomasa de esta cepa, siendo la cepa que presenta mayor reducción de biomasa.

Para Ch63D, este sobrenadante logra inhibir un 6.58% con la concentración de 25%, y un 29.77% con la concentración máxima utilizada (75%).

Y con la cepa 85, se logro inhibir un 2.87% con la concentración de 50% y en un 3.07% con la concentración de 75%, siendo la cepa que menor porcentaje de inhibición presento.

## SOBRENADANTE *Pseudomonas aeruginosa*



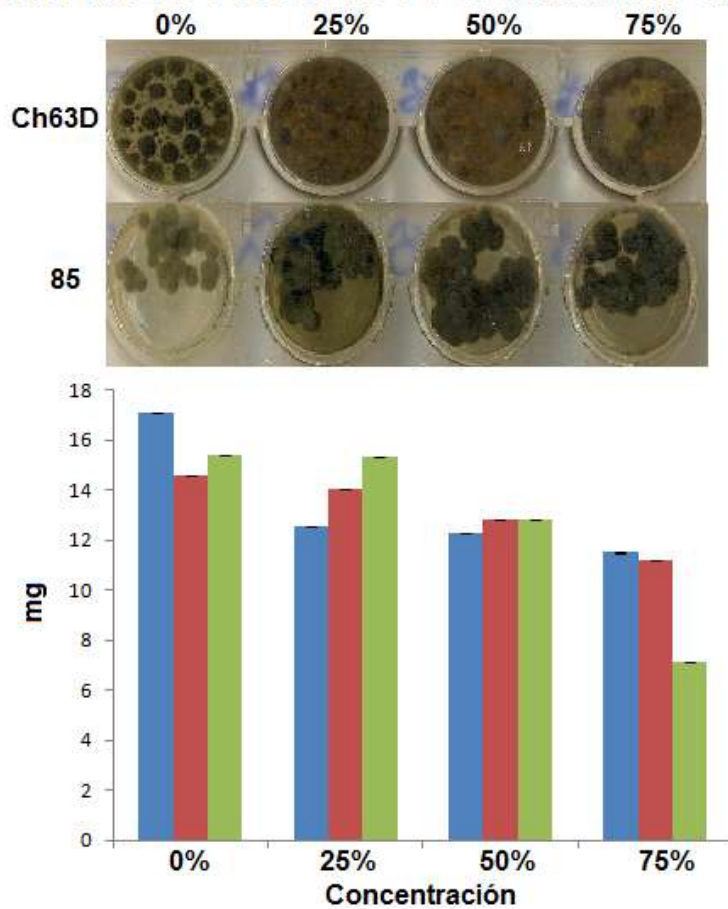
**Figura 15.** Gráfico de comparación de inhibición de las tres cepas de *M. fijiensis* en contra del sobrenadante de *Pseudomonas aeruginosa*. Barras azules corresponde a la cepa Ch63D, barras rojas a la cepa Mf-1 y barras verdes a la cepa 85.

Mientras que con el concentrado de proteínas de esta sobrenadante para la cepa Mf-1 es la que presenta mayor inhibición a la concentración de 75% de concentrado, ya que logra inhibir un 53.5% de biomasa del hongo, mientras que con 25% y 50% de concentrado solo logra inhibirla un 0.64% y 16.88% respectivamente (Figura 15).

Para la cepa Ch63D, con 25% de concentrado se logra inhibir un 26.54% y con 75% un 32.74%, logrando inhibirla en un porcentaje cercano al que se presento con el sobrenadante directo.

Y, al igual que con el sobrenadante, la cepa que menor inhibición presento es la 85, logrando inhibirse un 3.43%, 12.08% y 23.35% con las concentraciones de 25%, 50% y 75% respectivamente.

### CONCENTRADO PROTEICO *Pseudomonas aeruginosa*



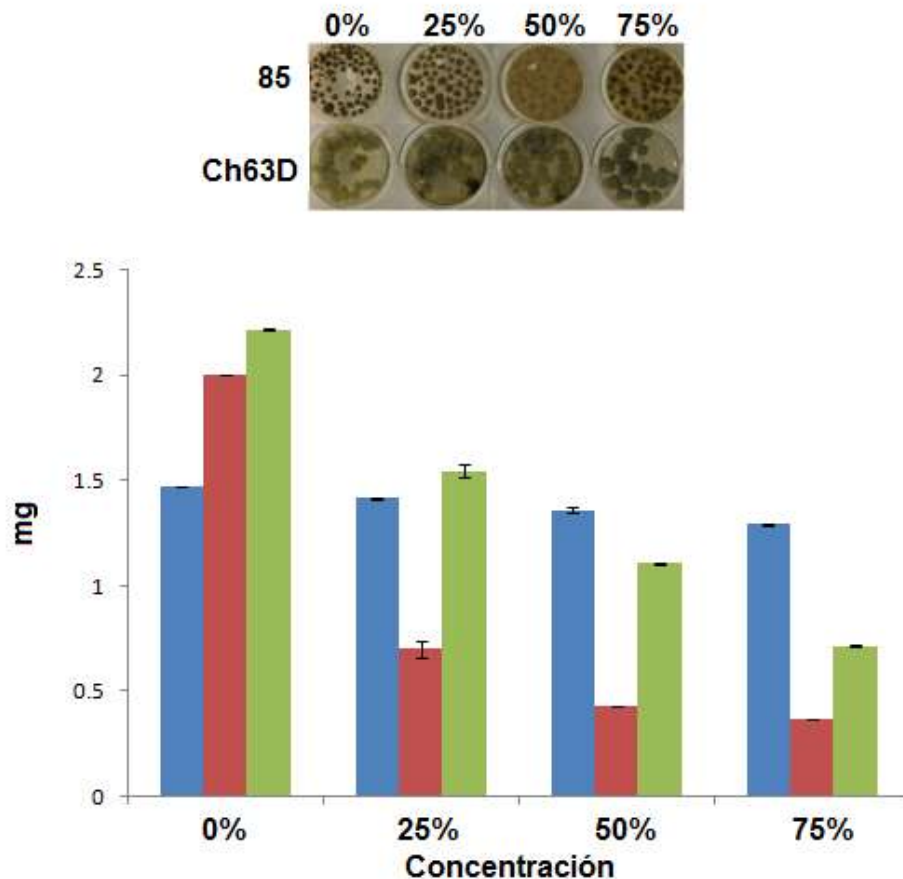
**Figura 16.** Gráfico de comparación de inhibición de las tres cepas de *M. fijiensis* en contra del concentrado proteico de *Pseudomonas aeruginosa*. Barras azules corresponde a la cepa Ch63D, barras rojas a la cepa 85 y barras verdes a la cepa Mf-1.

### ***Enterobacter cloacae***

En la figura 17, observamos el concentrado proteico obtenido a partir del sobrenadante de *Enterobacter cloacae*. Este concentrado presenta mayor inhibición con la cepa 85, logrando inhibirlo hasta en un 82% con la concentración de 75%. Mientras que para Mf-1, este concentrado logra inhibir un 23% utilizando la concentración más baja de 25%, y logra inhibir en un 44.7% y 67.6% con las respectivas concentraciones de 50% y 75%.

Para Ch63D, el concentrado no logra una inhibición muy marcada, ya que logra inhibirlo en un 3.67% con 25% de concentración y en un 7.48% para las concentraciones de 50% y 75%.

### CONCENTRADO PROTEICO *Enterobacter cloacae*



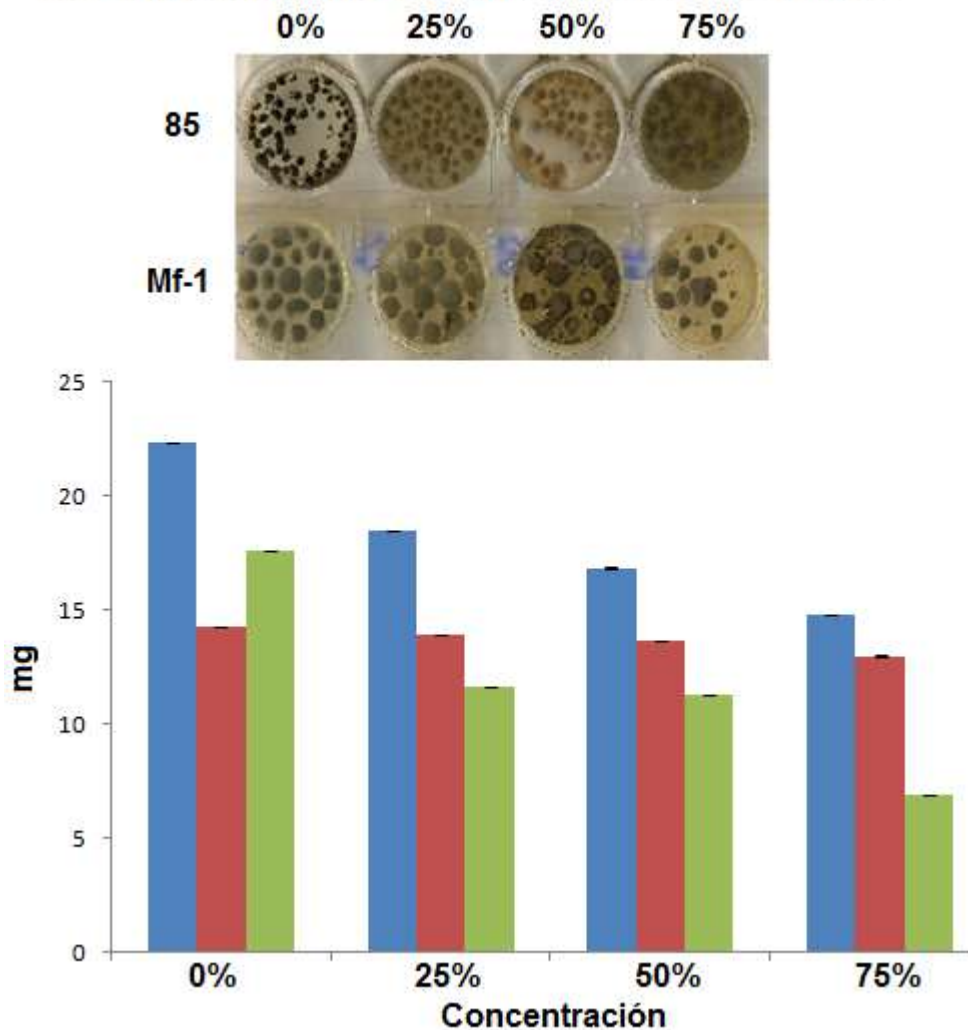
**Figura 17.** Gráfica de comparación de inhibición de las tres cepas fúngicas en contra del concentrado proteico obtenido del sobrenadante de *Enterobacter*

*cloacae*. Barras azules corresponden a Ch63D, barras rojas corresponden a 85 y barras verdes a Mf-1.

Para el sobrenadante puro de esta bacteria, se observa que la cepa que sufrió de la mayor reducción de biomasa es Mf-1, logrando inhibirse un 61.02% a una concentración de 75%.

Mientras que Ch63D, logro inhibirse un 17.15% con 25% de concentración y un 33.45% de inhibición con un 75% de concentración. La cepa que vuelve a ser la menos inhibida es la 85 ya que solo logra inhibirse un 6.64% y un 9.09% con concentraciones de 50% y 75% respectivamente (Figura 18).

### SOBRENADANTE *Enterobacter cloacae*



**Figura 1.** Gráfica de comparación de inhibición de las tres cepas fúngicas en contra del sobrenadante de *Enterobacter cloacae*. Barras azules corresponden a Ch63D, barras rojas corresponden a 85 y barras verdes a Mf-1.

### **9.3 Determinación de actividad enzimática presente en los sobrenadantes con potencial antifúngico.**

Las actividades enzimáticas se determinaron a partir de sobrenadante y del concentrado proteico, además se determinaron las actividades en tres diferentes tiempos a las 16, 48 y 120 horas a partir de inoculado el medio de micelio inactivo de hongo.

#### ***Bacillus cereus***

En la tabla 2 se muestran las diferentes actividades enzimáticas de lipasa, quitinasas, glucanasas y proteasas, las cuales se consideran que son las causantes del efecto inhibitorio de las bacterias. *B. cereus* no presenta actividad de proteasas en el sobrenadante durante el transcurso de la cinética de crecimiento y la actividad de glucanasas es cero a las 120 horas. La mayor actividad de las enzimas ocurre a las 16 horas para las lipasas con 119.7 U/ml y 48 horas para las quitinasas con 3.175 U/ml. Un mayor tiempo de incubación afecta la actividad con una tendencia a disminuir.

HORA	LIPASA	GLUCANASA	QUITINASA	PROTEASA
16 Hrs.	6.04 U/mL	119.7U/mL S.D. 5.89	1.597 U/mL S.D 0.1665	-----
48 Hrs.	5.58 U/mL	96.15 U/mL S.D 2.05	3.175 U/mL S.D 0.0035	-----
120 Hrs.	3.09 U/mL	-----	2.189 U/mL S.D 0.0652	-----

**Tabla 2.** Actividades de enzimas hidrolíticas secretadas en el sobrenadante de un cultivo de *Bacillus cereus* en medio de fragmentos de micelio.

El concentrado de proteínas, no tiene actividad de glucanasas después de 120 horas, también observamos la disminución de lipasas y glucanasas de acuerdo al tiempo de incubación. Sin embargo la actividad de proteasas a las 16 y 48 horas es de 63.65 U/ml y 28.26 U/ml respectivamente, con respecto a este ensayo esta enzima aumenta conforme pasa el tiempo, sin embargo no se observo actividad directa del sobrenadante, lo que sugiere que se debe concentrar 5 veces para poder determinar su actividad. Las quitinasas tienen mayor actividad enzimática cuando se encuentran en el sobrenadante, que en el concentrado, siendo las 48 horas, donde hay mayor actividad.

HORA	LIPASA	GLUCANASA	QUITINASA	PROTEASA
<b>16 Hrs.</b>	11.92 U/mL	63.65 U/mL S.D 1.34	1.509 U/mL S.D. 0.1447	5.095 U/mL S.D. 0.8469
<b>48 Hrs.</b>	8.10 U/mL	28.25 U/mL S.D 3.25	2.8 U/mL S.D. 0.2059	6.315 U/mL S.D. 0.4096
<b>120 Hrs.</b>	7.6379 U/mL	0	1.379 U/mL S.D 0.0541	0

**Tabla 3.** Actividades de enzimas hidrolíticas presentes en el concentrado proteico de *Bacillus cereus*.

### ***Enterococcus faecalis***

En el sobrenadante se encontró una mayor actividad de lipasa en comparación con *B. subtilis*. Las 16 horas se consideran el tiempo donde se observa la mayor actividad para todas las enzimas presentando actividades de lipasa a 7.75 U/ml, glucanasa 31.35 U/ml, quitinasa U/ml y Proteasa 15.815 U/ml- (Tabla 3). A simple vista, las actividades enzimáticas de este sobrenadante las actividades de lipasas y quitinasas disminuyen a las 48 y 120 horas presentando 7.53 U/ml y 6.49 U/ml de lipasa respectivamente y 2.051 U/ml de quitinasa en ambas horas. Las glucanasas y proteasas tienen un ligero aumento de actividad a las 120 horas, 27.4 U/ml y 15.655 U/ml respectivamente.

HORA	LIPASA	GLUCANASA	QUITINASA	PROTEASA
<b>16 Hrs.</b>	7.75 U/ml	31.35 U/mL S.D 4.98	3.125 U/mL S.D. 0.029	15.815 U/mL S.D. 0.768
<b>48 Hrs.</b>	7.53 U/ml	21.9 U/mL S.D 0.8411	2.051 U/mL S.D. 0.0511	11.99 U/mL S.D. 1.99
<b>120 Hrs.</b>	6.49 U/ml	27.4 U/mL S.D 3.56	2.051 U/mL S.D. 0.0186	15.655 U/mL S.D. 0.4055

**Tabla 4.** Actividades de enzimas hidrolíticas secretadas en el sobrenadante de un cultivo de *Enterococcus faecalis* en medio de fragmentos de micelio.

En la tabla 5, se observan la actividad de estas hidrolasas en el concentrado de proteínas del sobrenadante. En este se observa que todas las actividades aumentan y varían con respecto al tiempo de incubación. Las glucanasas presentan mayor actividad a las 48 horas obteniendo un valor de 45.55 U/ml, mientras que las glucanasas y proteasas se mantuvieron al presentar mayor actividad a las 16 horas al igual que con el sobrenadante sin concentrar, 69.3 U/ml y 37.875 U/ml respectivamente. Por otro lado, las quitinasas presentan una mayor actividad a las 120 horas, alcanzando las 8.7 U/ml, lo que sugiere que para ese momento la bacteria pudo haber accedido a la quitina de la pared celular fúngica y se vea en la necesidad de producir estas enzimas para poder degradar la quitina para transformarla en fuente de carbono.

<b>HORA</b>	<b>LIPASA</b>	<b>GLUCANASA</b>	<b>QUITINASA</b>	<b>PROTEASA</b>
<b>16 Hrs.</b>	10.99 U/ml	69.3 U/mL S.D 4.77	5.95 U/mL S.D 0.0528	37.875 U/mL S.D. 1.01
<b>48 Hrs.</b>	16.08 U/ml	45.55 U/mL S.D 1.95	6.475 U/mL S.D. 0.0226	27.825 U/mL S.D. 0.8347

<b>120 Hrs.</b>	4.92 U/ml	55.3 U/mL S.D 4.57	8.7 U/mL S.D. 0.2951	28.39 U/mL S.D 0.4349
-----------------	-----------	-----------------------	-------------------------	--------------------------

**Tabla 5.** Actividades de enzimas hidrolíticas presentes en el concentrado proteico de *Enterococcus faecalis*.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* presento mayor actividad antifúngica contra cepas de *M. fijiensis* (Ortiz-Mendoza 2010). La tabla 5 muestra las actividades de enzimas hidrolíticas secretadas por esta bacteria. Primero muestra los datos de la tabla 6 y después haces la comparación de todas las actividades en la discusión. La comparación de lipasa esta bacteria con las antes reportadas, esta presenta una mayor cantidad de lipasa y glucanasas, siendo las 16 horas de recolección de sobrenadante donde se presenta mayor actividad.

Incluso si se observa la cantidad de proteasas liberadas en el medio, podemos ver que después de las 48 horas, esta actividad enzimática disminuye en un 98%, pasando de 17.8U hasta 0.14U de enzima, lo cual puede significar que la bacteria, con el paso del tiempo de incubación, degrada todas las proteínas presentes en la pared celular del micelio de hongo inactivo.

<b>HORA</b>	<b>LIPASA</b>	<b>GLUCANASA</b>	<b>QUITINASA</b>	<b>PROTEASA</b>
<b>16 Hrs.</b>	14.638 U/mL	62.55 U/mL S.D 0.3256	0.095 U/mL S.D. 0.0590	17.8 U/mL S.D. 0.1455
<b>48 Hrs.</b>	10.89 U/mL	47.65 U/mL S.D. 0.3098	0.125 U/mL S.D. 0.0641	0.42U/mL S.D. 0.3864
<b>120 Hrs.</b>	9.51 U/mL	51.9 U/mL S.D. 0.2751	0.115 U/mL S.D. 0.0207	0.14U/mL S.D. 0.3841

**Tabla 6.** Actividades de enzimas hidrolíticas secretadas en el sobrenadante de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en medio de fragmentos de micelio.

Por otro lado, la actividad enzimática reportada en el concentrado de proteínas muestra una gran cantidad de lipasas y glucanasas nuevamente, quedándose al margen las quitinasas y proteasas determinadas, inclusive a las 16 horas la cantidad de proteasas es de 2.79U/ml en comparación de las 17.8U/ml determinadas en el sobrenadante.

HORA	LIPASA	GLUCANASA	QUITINASA	PROTEASA
16 Hrs.	61.85 U/mL	71 U/mL S.D. 0.4570	1.8 U/mL S.D. 0.0302	2.79U/mL S.D 0.8759
48 Hrs.	50.46 U/mL	59.4 U/mL S.D. 0.2571	2.6 U/mL S.D. 0.0280	1.42 U/mL S.D. 0.3367
120 Hrs.	44.97 U/mL	65.5 U/mL S.D. 3864	1.7 U/mL S.D. 0.039	1.14 U/mL S.D. 0.5603

**Tabla 7.** Actividades de enzimas hidrolíticas presentes en el concentrado proteico de *Pseudomonas aeruginosa*.

### ***Enterobacter cloacae***

La tabla 8 muestra las actividades determinadas en el sobrenadante sin concentrar de esta bacteria. En la tabla se observa que las glucanasas son las enzimas que mayormente produce esta bacteria llegando hasta 85.35U/ml a las 120 horas. Mientras que lipasas y quitinasas presentan su mayor producción a las 16 horas y proteasas a las 48 horas de recolectado el sobrenadante, presentando actividades de 15.30U/ml y 12.89 U/ml de lipasas respectivamente y 8.305 U/ml y 9.54 U/ml para proteasas respectivamente.

HORA	LIPASA	GLUCANASA	QUITINASA	PROTEASA
<b>16 Hrs.</b>	15.30 U/mL	81.75 U/mL S.D 1.5570	2.415 U/mL S.D. 0.0034	8.305 U/mL S.D. 0.7593
<b>48 Hrs.</b>	12.89 U/mL	78.7 U/mL S.D 2.7938	2.103 U/mL S.D. 0.0176	9.54 U/mL S.D. 0.8661
<b>120 Hrs.</b>	13.91 U/mL	85.35 U/mL S.D 0.2882	2.038 U/mL S.D. 0.0097	7.61 U/mL S.D. 0.3393

**Tabla 8.** Actividades de enzimas hidrolíticas secretadas en el sobrenadante de un cultivo de *Enterobacter cloacae* en medio de fragmentos de micelio.

Sin embargo, al observar la tabla 9, se nota que no hay una diferencia significativa entre las actividades enzimáticas determinadas en el sobrenadante y concentrado, para las glucanasas, quitinasas y proteasas, presentando actividades de 82.75 U/ml, 3.15 U/ml y 8.075 U/ml a las 16 horas respectivamente.

Las lipasas que aumentan casi el doble a las 16 horas, presentando una actividad de 30.12 U/ml.

Todas estas hidrolasas, con excepción de glucanasas, disminuyen al llegar a las 120 horas de incubación, las glucanasas aumentan un 15% al llegar a 93.1 U/ml.

HORA	LIPASA	GLUCANASA	QUITINASA	PROTEASA
<b>16 Hrs.</b>	30.12 U/mL	82.75 U/mL S.D: 8.19	3.15 U/mL S.D: 0.67	8.075 U/mL S.D.: 2.35
<b>48 Hrs.</b>	20.65 U/mL	73.5 U/mL S.D: 4.97	2.2 U/mL S.D.: 1.93	6.31 U/mL S.D. 0.52
<b>120 Hrs.</b>	15.29 U/mL	93.1 U/mL S.D. 7.30	2.21 U/mL S.D: 1.54	7.65 U/mL S.D.: 0.10

**Tabla 9.** Actividades de enzimas hidrolíticas presentes en el concentrado proteico de *Enterobacter cloacae*.

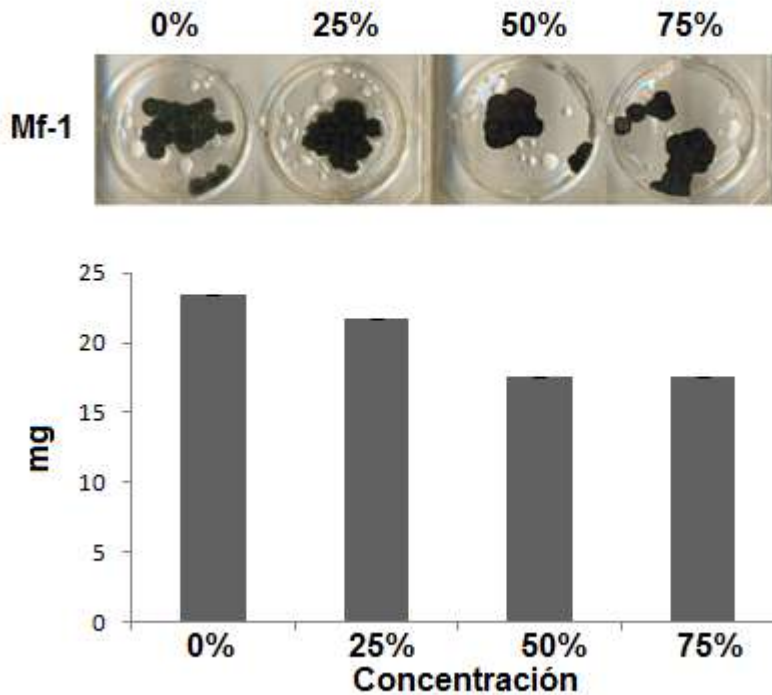
#### **9.4 Efecto antifúngico del sobrenadante obtenido a partir de bacteria contra micelio de hongo activo**

La concentración utilizada de micelio activo fue de 0.7%, la misma concentración utilizada para la obtención de los sobrenadantes con micelio inactivo. Se utilizaron las cuatro bacterias antes mencionadas y como cepa de estudio se utilizó MF-1 originaria de Colima.

##### ***Bacillus cereus***

En comparación con el sobrenadante obtenido con micelio inactivo podemos observar que esta cepa al entrar en contacto con el fitopatógeno en su forma activa, no produce la actividad antifúngica suficiente para inhibir, utilizando 75% de sobrenadante, al menos el 50% del crecimiento del hongo. En los datos mostrados en la figura 11, la inhibición de *M. fijiensis* se reduce un poco más del 50%, mostrando ser más efectivo el sobrenadante obtenido a partir de micelio inactivo.

## SOBRENADANTE *Bacillus cereus* vs *M. fijiensis*

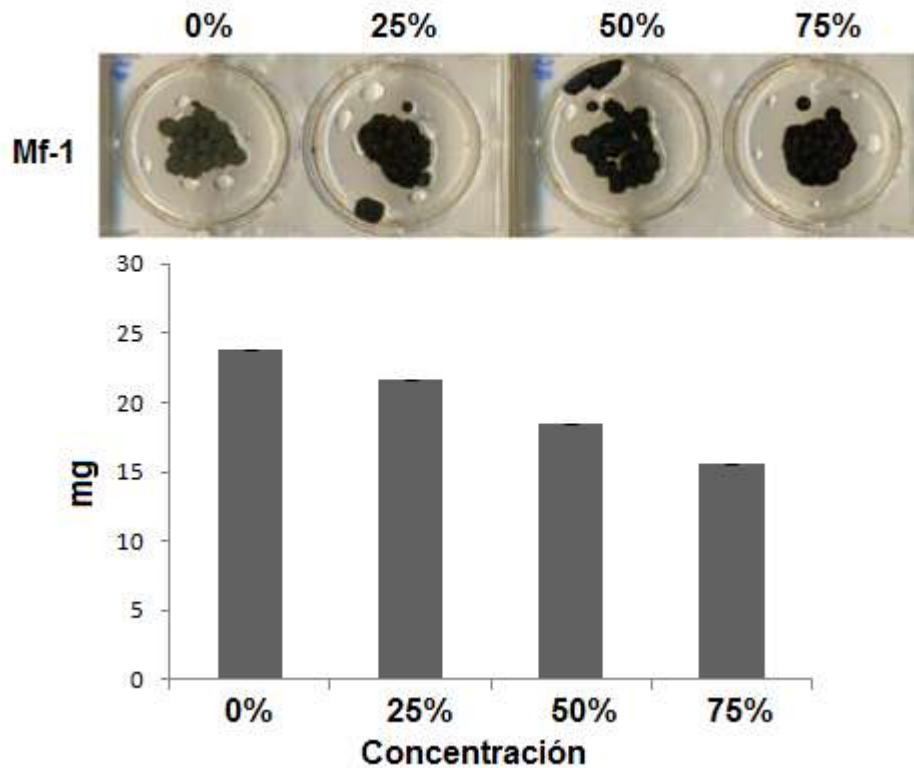


**Figura 19.** Gráfico de inhibición de Mf-1 en contra del sobrenadante obtenido de *B. cereus* en un cultivo de bacteria contra micelio activo.

### ***Enterococcus faecalis***

Al igual que con *B. cereus*, el sobrenadante de esta bacteria con micelio activo de hongo no es tan efectivo como el sobrenadante obtenido del cultivo con micelio inactivo, ya que en la figura 14 observamos que con la cepa Mf-1 la inhibición fue más del 50% con la concentración más alta (75%), mientras que en la figura 20 observamos cómo al 75% de concentración, la inhibición es de cerca del 34% con respecto a su control.

## SOBRENADANTE *Enterococcus faecalis*

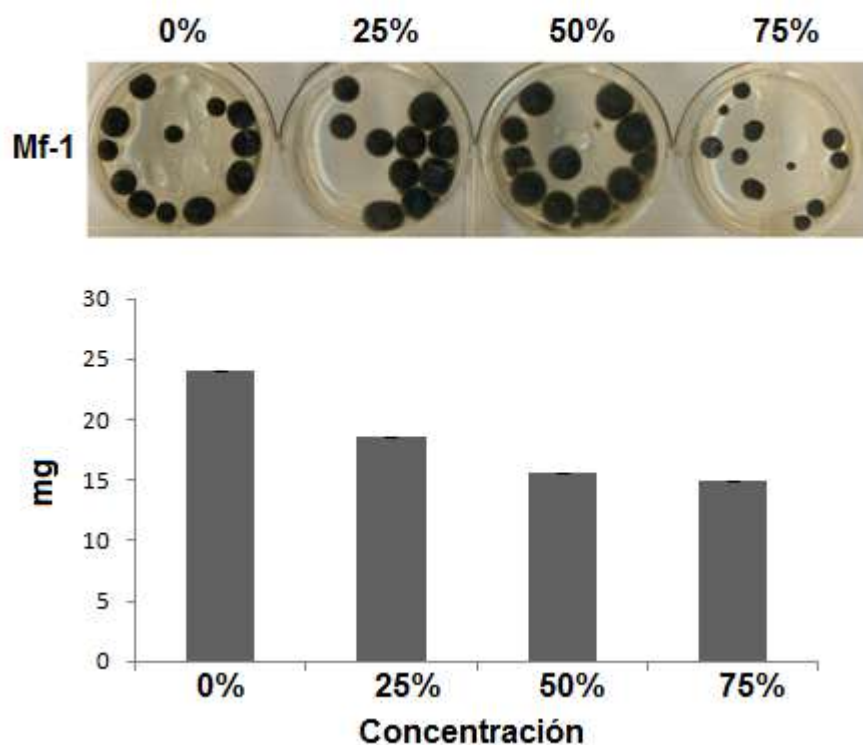


**Figura 20.** Gráfico de la cepa Mf-1 en contra del sobrenadante de *E. faecalis* obtenido de un medio de bacteria contra micelio activo de hongo.

### ***Pseudomonas aeruginosa***

Al igual que con el sobrenadante obtenido de micelio inactivo de hongo, *P. aeruginosa* es la bacteria que presenta mayor actividad antifúngica. Aunque, como se observa en la figura 15, no es igual de efectivo como el sobrenadante obtenido del cultivo de bacteria con micelio inactivo de hongo. En la figura 21, observamos que tanto la concentración de 50% y la de 75% inhiben casi al 50% el crecimiento del fitopatógeno.

## SOBRENADANTE *Pseudomonas aeruginosa*

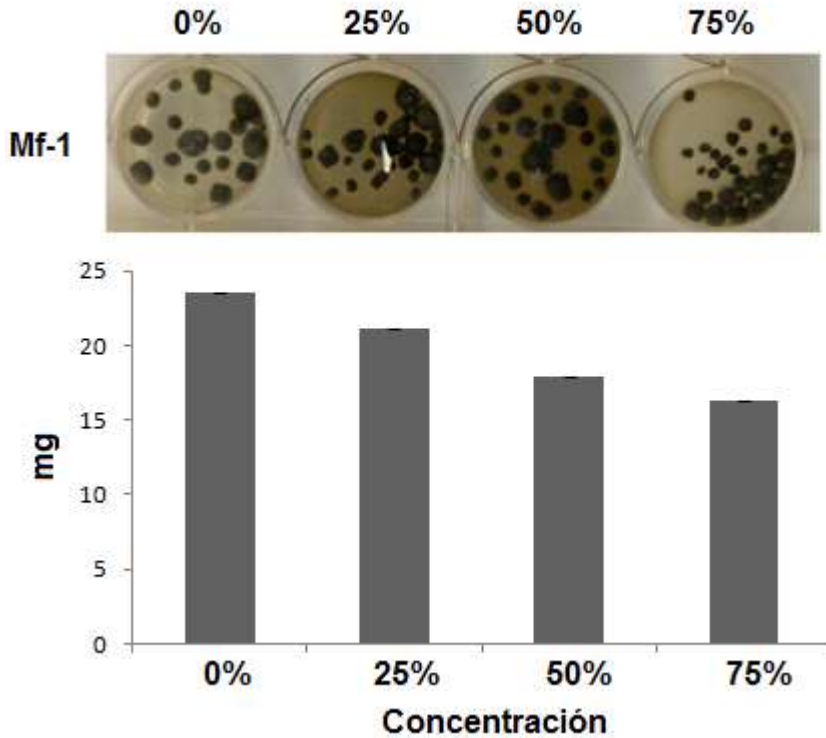


**Figura 21.** Gráfico del comportamiento de la cepa MF-1 en contra del sobrenadante de *P. aeruginosa* obtenido del cultivo de la bacteria contra el micelio activo del hongo.

### ***Enterobacter cloacae***

Al igual que las cuatro bacterias anteriores, el sobrenadante obtenido al inocular la bacteria con micelio activo de hongo, presenta una actividad antifúngica menor a la presentada en la figura 22, donde la inhibición fue de un poco más del 50%. Esto nos muestra que es más efectivo el sobrenadante obtenido con micelio inactivo de hongo.

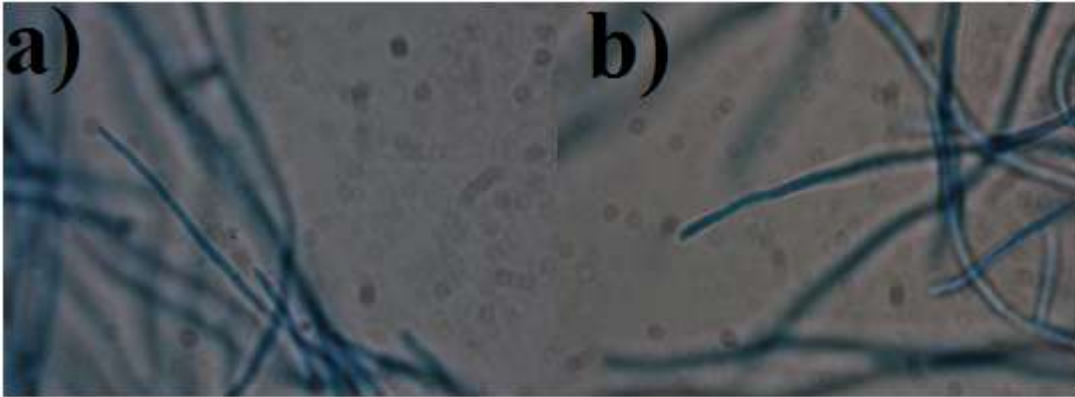
## SOBRENADANTE *Enterobacter cloacae*



**Figura 22.** Gráfico del comportamiento de la cepa MF-1 en contra del sobrenadante de *E. cloacae* obtenido de un cultivo de la bacteria con micelio activo del hongo.

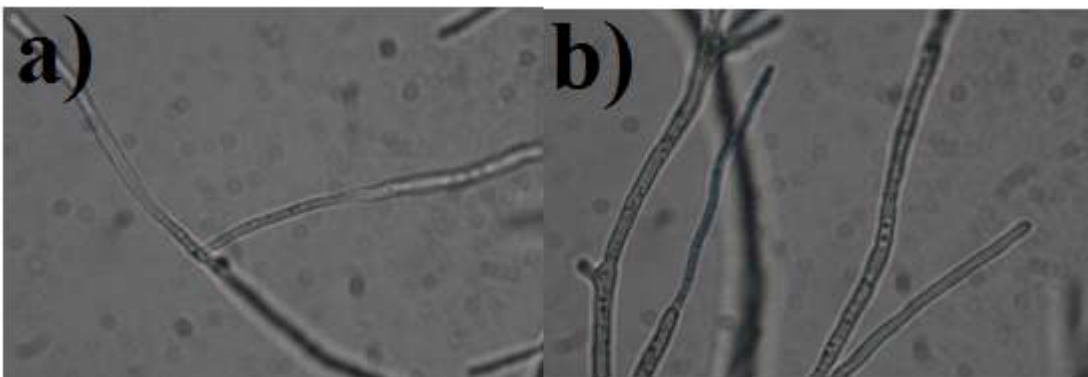
### 9.5 Daño mecánico de la hifa

En él a) de la figura 23 se puede observar una hifa teñida con azul de anilina en el control, mientras que en el b), observamos una hifa con sobrenadante de *P. aeruginosa*, también con tinción de azul de anilina. No se puede observar si hay algún daño mecánico o no, pero se observa un adelgazamiento de la punta de la hifa



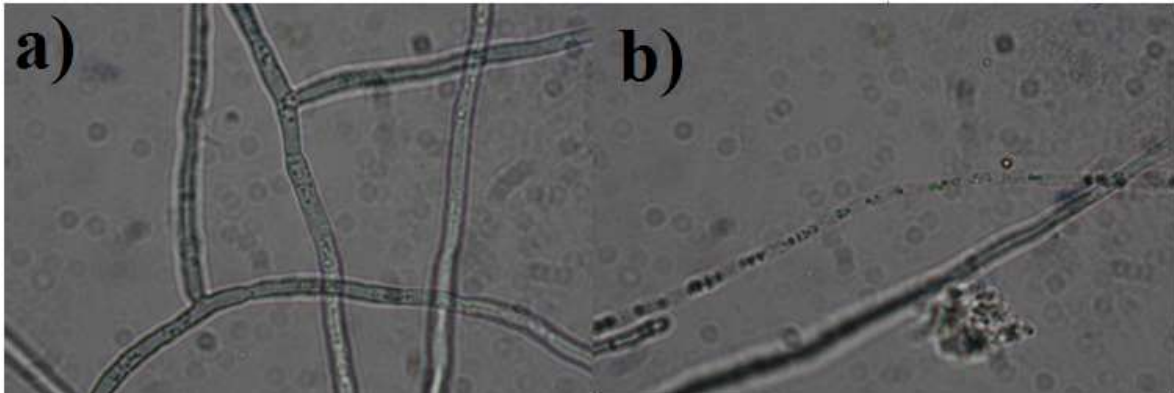
**Figura 23.** a) Hifas de *M. fijiensis* con medio PDB como control. b) Hifas de *M.fijiensis* con tratamiento de 75% de sobrenadante de *P. aeruginosa*.

La figura 24 muestra el mismo tratamiento de hongo contra sobrenadante de *P. aeruginosa*, esta vez teñidos con azul tripan, la característica de la coloración con azul tripan es que este colorante solo tiñe células muertas, las células vivas no se tiñen. En el b) se aprecia como la punta de la hifa sufrió un adelgazamiento, lo cual se puede considerar como un daño mecánico a la hifa, además de encontrarse teñida de azul, lo cual nos indica que las células que componen esa hifa se encuentran muertas.



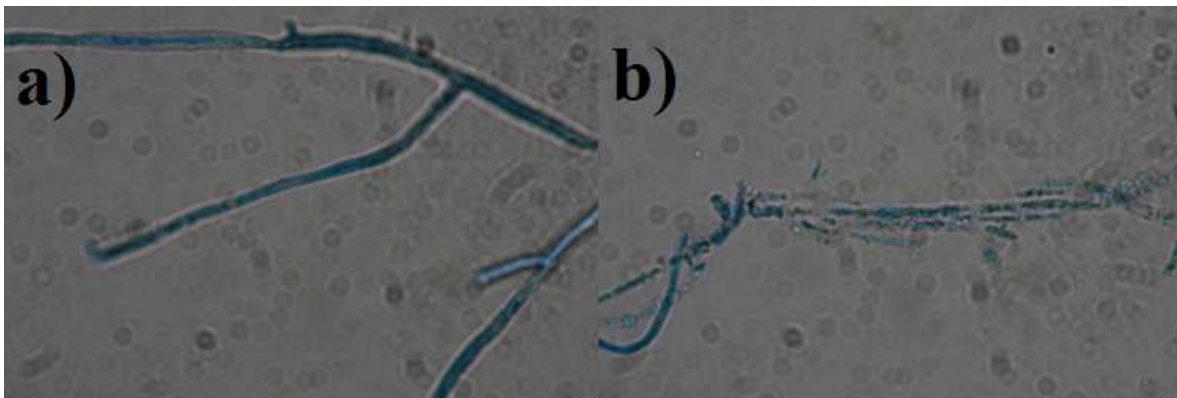
**Figura 24.** a) Hifa de *M. fijiensis* con PDB como control, teñida con azul tripan. b) hifa de hongo con sobrenadante al 75% de *P. aeruginosa* teñido con azul tripan.

En la figura 25 en el b) se observa la hifa con tratamiento de 1U de quitinasa comercial de *Streptomyces*, se observa claramente como hay una desintegración completa de la pared celular fúngica, dejándola completamente expuesta, a comparación con las hifas en a).



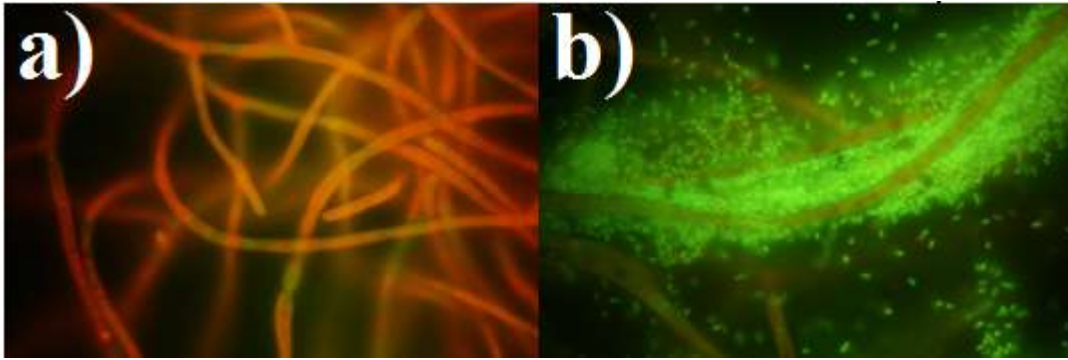
**Figura 25.** a) Hifas con PDB como testigo. b) Hifas con 1U de quitinasa comercial, ambas teñidas con azul tripan.

Al igual que en la figura 25, la figura 26 muestra en su b) como la pared celular de la hifa desaparece completamente, dejando solamente restos celulares atados a las hifas que no fueron degradadas por la quitinasa.



**Figura 26.** a) Hifa control. b) Hifas con 1U de quitinasa comercial, ambas teñidas con azul de anilina

La figura 27 muestra el tratamiento que tuvo la hifa con *P. aeruginosa* directamente, se ve como hay una formación de biofilm entre las bacterias alrededor de la hifa (b), esto después de 24 horas de incubación, lo que nos sugiere que estén usando al hongo como fuente de carbono.



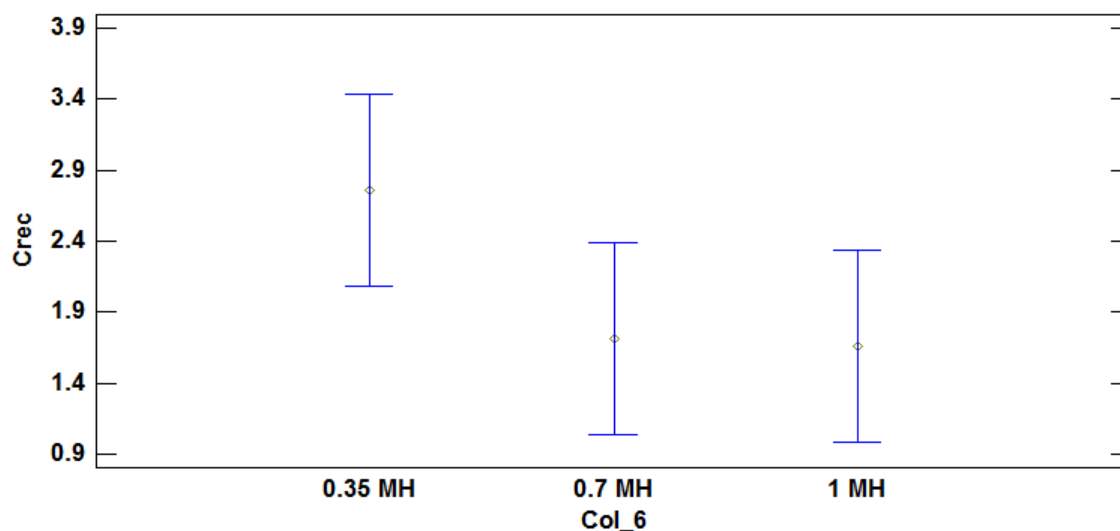
**Figura 27.** a) Hifas de *M. fijiensis* teñidas con naranja de acridina. b) Hifa de hongo en tratamiento con *P. aeruginosa* de manera directa.

## 10.- DISCUSION

Como ya se había mencionado antes, la razón por la cual se probaron tres concentraciones diferentes de micelio inactivo de hongo era para determinar la concentración ideal para el crecimiento de las bacterias endófitas de banano.

Los datos arrojados por las cinéticas de crecimiento bacteriano, se analizaron en statgraphics para hacer un análisis estadístico y determinar cuál de las concentraciones era la mejor opción para manejar.

En la figura 17 se muestra la representación gráfica de medias, donde se observa que no hay una diferencia significativa entre usar una concentración de 0.35%, 0.7% y 1% de micelio inactivo de hongo, es por eso y basado en la producción enzimática, que se decidió utilizar la concentración de 0.7% de micelio de hongo y recolectar el sobrenadante a las 16 horas de haber sido inoculado.



**Figura 28.** Gráfica estadística de medias y Fisher LSD, para la comparación de los diferentes medios utilizados en las cinéticas bacterianas.

La capacidad antifúngica de las bacterias endófitas puede ser debido a tres factores importantes, 1) la producción de antibióticos, 2) la secreción de iturinas y otros metabolitos de desecho y 3) la producción de enzimas hidrolíticas.

De las cuatro cepas bacterianas analizadas la que presenta mayor porcentaje de inhibición es la *P. aeruginosa*, pero si observamos las tablas 5 y 6 que son los reportes de su actividad enzimática, nos arrojan datos de una buena producción de lipasas y glucanasas, tanto en sobrenadante sin concentrar, como el concentrado de proteína, mientras que las quitinasas y proteasas presentan poca actividad, por lo cual es fácil suponer que la actividad antifúngica de *P. aeruginosa* no se deba exclusivamente a la producción de hidrolasas, sino que esto se puede deber a la producción de antibióticos o de otros metabolitos de desecho como lo son las iturinas y péptidos presentes cuando la bacteria se encuentra en su fase estacionaria.

Estudios realizados con esta bacteria (Ortiz-Mendoza 2010) han demostrado su gran actividad antifúngica, no solo en contra de *M. fijiensis*, sino también en contra de *Fusarium oxysporum*, otro hongo fitopatógeno de banano.

Un dato interesante de este resultado, es la actividad de quitinasas, esto debido a que la producción de quitinasas por parte de *P. aeruginosa* no es muy alta,

mientras que para *B. subtilis* y *E. faecalis* reportan hasta 2.8 y 3.21U respectivamente. Este dato sugiere que esta bacteria no haga uso de estas enzimas y el factor de inhibición se deba a otras moléculas.

*Bacillus cereus* demostró tener la capacidad de crecer en el medio inactivo de hongo sin importar su concentración, presentando un crecimiento moderado, logrando ver en la gráfica Figura 9, su fase estacionaria y como entra en la fase de muerte. Al probar el sobrenadante de esta bacteria como agente de biocontrol, se observo que era más eficaz el sobrenadante sin concentrar que el concentrado, si observamos las tablas 1 y 2 notamos que la mayor actividad de glucanasas está en el sobrenadante no concentrado, mientras que la actividad de lipasas y proteasas aumenta al momento de concentrar el sobrenadante, simplemente no hay actividad de proteasas en el sobrenadante no concentrado y las quitinasas mantienen su actividad tanto en el sobrenadante sin concentrar como en el concentrado proteico. Esto sugiere que quizás la actividad de proteasas en el sobrenadante sin concentrar sea muy poca o está debajo del límite de detección de la técnica utilizada para su determinación, lo que es seguro es que a las 120 horas de recolectado el sobrenadante *B. cereus* no hay presencia de proteasas, esto puede ser debido a que a esa hora se degrado completamente las proteínas constituyentes de la pared celular del hongo, provocando que la bacteria deje de producir estas enzimas.

Peblan *et al* (1997), midieron la actividad antifúngica de una cepa de *Bacillus cereus* aislada de mostaza en contra de *Fusarium oxysporum* f. sp. *meloni* hongo fitopatígeno del melón y *Rhizoctonia solani* hongo patógeno del algodón. *B. cereus* endófito de mostaza mostró gran actividad antifúngica al inhibir la germinación de *F. oxysporum meloni* en presencia de un extracto proteico producido por esta bacteria, mientras que al aplicarse directamente en suelo demostró una disminución en la aparición de síntomas en raíz de algodón ocasionado por *R. solani*, además de presentar actividad quitinolítica que se mantiene estable hasta por 96 horas, esto confirma la capacidad de *B. cereus* de mantener la producción de quitinasas constantemente, además del gran poder antifúngico de esta bacteria.

En el caso de *Enterobacter cloacae* Martínez-Molina (2010), analizó esta cepa haciendo análisis de inhibición directa e indirecta en contra de *M. fijiensis*, estos experimentos arrojaron que al poner en contacto directo esta bacteria con una cepa del fitopatógeno lo inhibía en un 18.33%, mientras que al realizar una prueba indirecta, donde solo los metabolitos entraban en contacto con el hongo, esta cepa mostró la mayor actividad antifúngica. Estos datos demuestran la capacidad de *E. cloacae* para secretar metabolitos con gran actividad antifúngica, quizás seas por esto que la actividad de las enzimas determinadas en el sobrenadante de esta bacteria son altas además de inhibir hasta en un 50% las cepas 85 y MF-1 con referencia al control.

Por último *Enterococcus faecalis* fue probada en 2010 por Ortíz-Mendoza, en contra de *M. fijiensis* y *F. oxysporum*, los datos arrojados de este análisis muestran que esta cepa inhibe un 49.3% a *F. oxysporum* y un 100% a *M. fijiensis* en prueba indirecta. Esto parece respaldar las unidades enzimáticas determinadas en este trabajo, además de ser capaz de inhibir en un 50% aproximadamente. No hay duda de que esta bacteria tiene gran capacidad antifúngica, no solo en contra de *M. fijiensis* sino también en contra de *F. oxysporum*.

Aktuganov et al en 2007 analizaron una cepa de *Bacillus* sp con un método muy similar al utilizado en este trabajo, en donde se inoculo la bacteria en medio de almidón, quitina y micelio inactivo de hongo, pero usaron como fuente de sustrato *F. culmorum*. En la tabla 9 se muestran los resultados de actividades enzimáticas obtenidas en 2009.

Enzymatic activity, U ml <sup>-1</sup> CL	Substrate, 0.5% (wt/vol)		
	Starch	Colloidal chitin	<i>Fusarium culmorum</i> mycelium
Chitinase	0.02±0.005	0.21±0.03	0.16±0.02
Chitosanase	0.01±0.005	0.11±0.02	0.14±0.02

N-acetyl- $\beta$ -glucosamidase	ND	1.50 $\pm$ 0.11	1.67 $\pm$ 0.12
Endo- $\beta$ -1,3-glucanase	3.47 $\pm$ 0.25	4.70 $\pm$ 0.32	5.95 $\pm$ 0.35
Endo- $\beta$ -1,4-glucanase	-	-	-
Endo- $\beta$ -1,3-xylanase	0	0	0
Protease	0.70 $\pm$ 0.10	0.75 $\pm$ 0.10	1.6 $\pm$ 0.15
Dextranase	0	0	0
Pullulanase	0	0	0
Lipase	1.45 $\pm$ 0.15	1.70 $\pm$ 0.15	4.55 $\pm$ 0.30

**Tabla 10.** Datos obtenidos por Aktuganov *et al* en 2007 al realizar el análisis de hidrolasas con *Bacillus* sp.

En estos datos podemos observar que se determinaron actividades de quitinasas, glucanasas, proteasas y lipasas, las mismas que se analizaron en este proyecto. Al comparar con detalle los datos obtenidos con el medio hecho a base de micelio de hongo en el trabajo hecho en 2007 como en el que se reportan en las tablas 2 a 9, notamos que la cantidad de enzima secretada por las diferentes cepas bacterianas utilizadas en este proyecto son mayores, con excepción de las quitinasas reportadas para *P. aeruginosa* en el sobrenadante sin concentrar (Tabla 6).

Esto puede ser debido a varios factores, el primero la concentración de micelio utilizado que, aunque la diferencia no es muy grande entre el utilizado por Aktuganov *et al* en 2007 y el utilizado en este trabajo. El segundo factor es el hongo que se utilizó como fuente de carbono para la bacteria, ya que como se describió previamente, la pared fúngica, a pesar de tener los mismos componentes, sus concentraciones pueden variar entre un género y otro. Otro factor es la cepa bacteriana utilizada, quizás y aunque en la literatura este citado que los *Bacillus* son un género bacteriano que es conocido por secretar

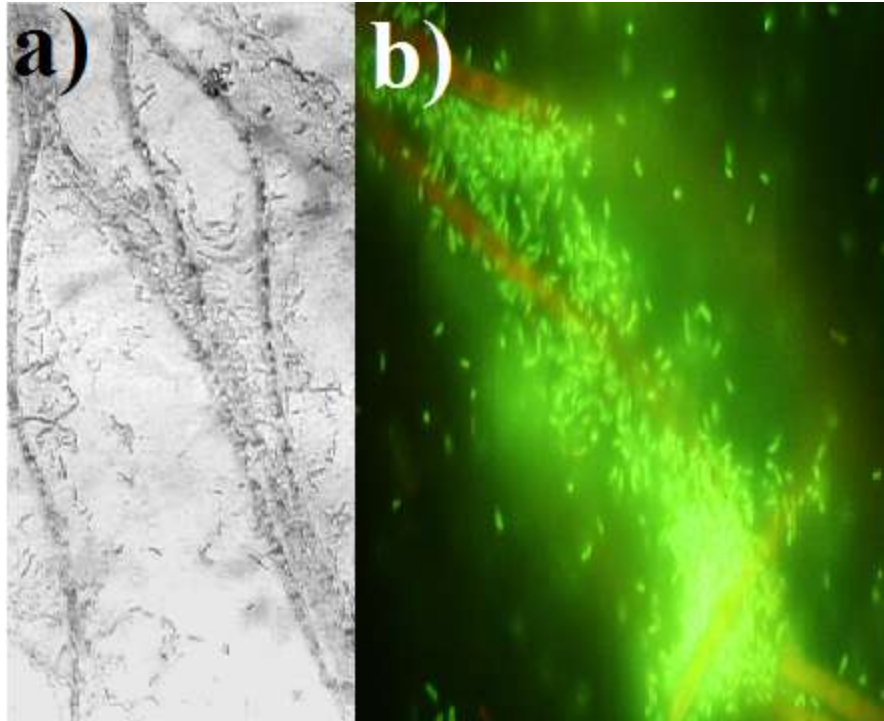
hidrolasas, esa cepa en específico tenga un mecanismo totalmente diferente al *Bacillus cereus* utilizados en este trabajo.

Por último y el más importante, son las condiciones de cultivo, en 2007 se midió la actividad enzimática entre las 6 y 8 horas con mediciones cada 2 horas, mientras que en este proyecto las determinaciones fueron a las 16, 48 y 120 horas de inoculado el microorganismo, esto le da tiempo suficiente a la bacteria para adaptarse a las nuevas condiciones y poder secretar tanto enzimas hidrolíticas como antibióticos y otros metabolitos con actividad antifúngica.

En la misma investigación en 2007 analizaron el mismo *Bacillus sp.* para observar los efectos antifúngicos en contra de *Bipolaris sorokiniana* agente patógeno del cereal, este estudio arrojó que al estar en un medio de cultivo juntos, la actividad lítica de la bacteria aumentaba incluso después de 2 días de incubación, ocasionando lisis en las hifas del patógeno. Esto es debido al mecanismo de acción de las hidrolasas producidas por esta bacteria, aunque se reporta que no hubo actividad quitinolítica durante el periodo de incubación de estos microorganismos.

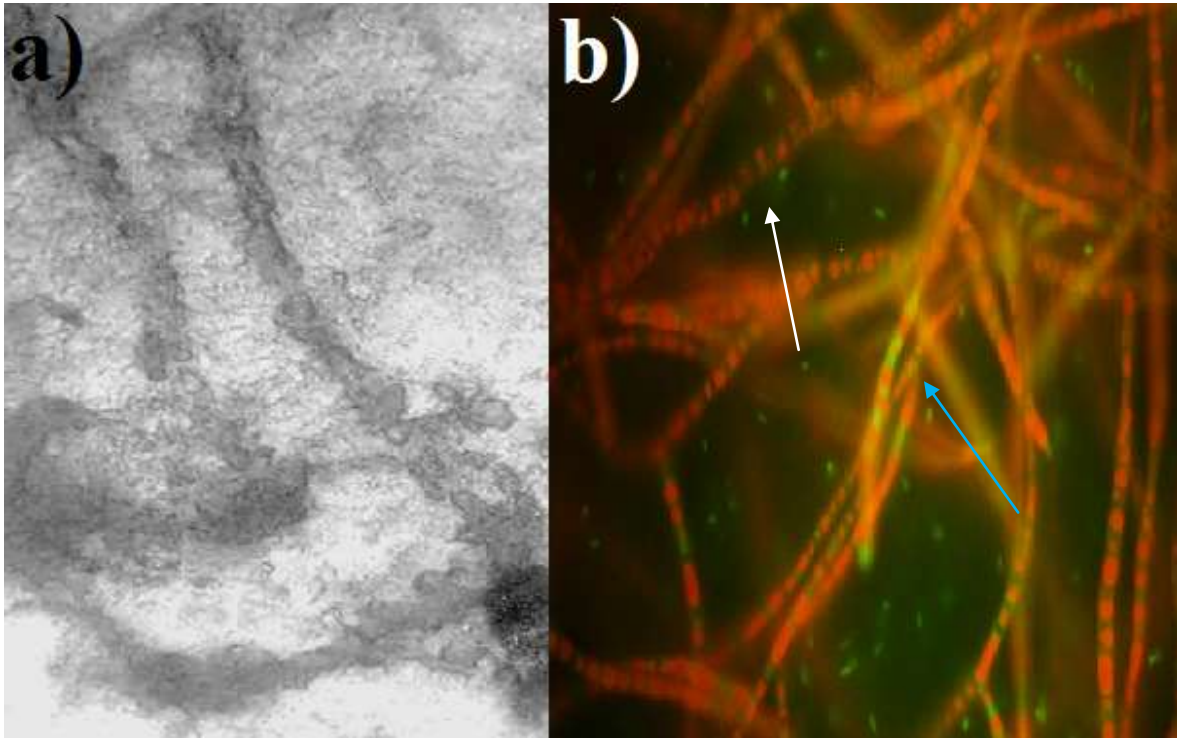
Al comparar los resultados obtenidos del efecto antifúngico del sobrenadante obtenido por micelio inactivo de hongo contra el del obtenido con micelio activo de hongo, existe una diferencia clara de que el que presenta mayor actividad antifúngica es el del micelio inactivo. Esto puede ser ocasionado a que el micelio al estar activo, puede estar secretando metabolitos para poder contrarrestar el efecto que ocasiona la bacteria en su estructura, es por eso que no se observa un control en el crecimiento del hongo tan marcado como en el estudio realizado con sobrenadante de micelio inactivo.

En la figura 29 a) se observa como la bacteria tiende a adherirse a las hifas de *B. sorokinian* al igual que *P. aeruginosa* con las hifas de *M. fijiensis*. En esto se observa claramente como, tanto *Bacillus* como *Pseudomonas* tienden a formar un biofilm alrededor de la hifa como si estas buscaran su fuente de carbono. También se puede deber a una quimiotaxis de ambas partes, pero para saberlo con certeza serían necesarios otros análisis donde se determine los productos de excreción (moléculas señalizadoras) tanto de la bacteria como del hongo.



**Figura 29.** a) Hifas *B. sorokiniana* con *Bacillus* sp. a las 96 horas de inoculado obtenidas por Aktuganov *et al* en 2007. b) Hifas de *M. fijjensis* con *P. aeruginosa* después de 24 horas de inoculación.

En la figura 30 a), se observa como después de 144 horas de incubación, *Bacillus* sp. ocasiona una lisis total de la hifa de *B. sorokiniana*, convirtiendo la hifa en nada más que restos celulares y perdiendo la integridad física de la estructura del hongo. Mientras que en el inciso b), se aprecia un cultivo con *M. fijjensis* y *P. aeruginosa*, aunque el grado de daño mecánico no es tan apreciable como en el inciso a), podemos observar como hay una desintegración de la pared celular de la hifa. En la hifa señalada con la flecha azul se puede ver como su pared celular esta íntegra, mientras que la hifa señalada con la flecha blanca carece por completo de pared celular, lo cual sugiere el daño mecánico ocasionado por la bacteria.



**Figura 30.** a) Hifas de *B. sorokiniana* con *Bacillus* sp después de 144 horas de incubación obtenidos por Aktuganov *et al* en 2007. b) Hifas de *M. fijiensis* con *P. aeruginosa* después de 72 horas de incubación.

Aunque las dos son técnicas completamente diferentes de microscopía y con dos fitopatógenos y agentes de biocontrol distintos, podemos decir que ambas bacterias tienen un potencial antifúngico muy grande, independientemente de la cantidad de hidrolasas secretadas u otros metabolitos cuando se encuentran en presencia de agentes dañinos para las plantas.

## 11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La producción de enzimas hidrolíticas capaces de degradar la pared celular fúngica como única fuente de sustrato puede ser de los mecanismos más probables para actuar como potentes agentes de biocontrol.

Quizás la gran actividad antifúngica no solo se deba a la producción enzimática, si no a una combinación de estas con la producción de factores biológicos como sideróforos, lipopéptidos, antibióticos entre otros.

Se necesita profundizar más en el análisis de las moléculas secretadas por las bacterias para poder determinar la razón por la cual estas actúan como excelentes antifúngicos, además de otorgarle a la planta otros beneficios como lo son el factor de crecimiento, la fijación de nitrógeno, producción de sideróforos, etc.

El desarrollo de un biofungicida no es una idea nueva, ya que en el mercado actual existen varios productos con microorganismos benéficos para las plantas, lo que sería interesante es poder producir un biofungicida con los metabolitos responsables de la inhibición de los fitopatógenos.

## 12.- BIBLIOGRAFIA

- Adams, D.J.; Fungal **cell wall chitinases and glucanases**; 2004.
- Aktuganov, N. F. Galimzyanova, A. I. Melent'ev, and L. Yu. Kuz'mina; **Extracellular Hydrolases of Strain *Bacillus* sp. 739 and Their Involvement in the Lysis of Micromycete Cell Walls**; *Institute of Biology, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences* , 2006.
- Arlorio M. t, A. Ludwig 2, T. Boiler , and P. Bonfante ; **Inhibition of fungal growth by plant chitinases and IM,3-glucanases A morphological study**; Centro di Studio sulla Micologia del Terreno del CNR, Dipartimento di Biologia Vegetale dell'Universitfi degli Studi di Torino,1992.
- Beltrán-García, *et al.*; **Oxidative stress response of *Mycosphaerella fijiensis*, the causal agent of black leaf streak disease in banana plants, to hydrogen peroxide and paraquat**, *Can. J. Microbiol.* Vol. 55, 2009.
- Bowman, S. M. y Free, S. J.; **The structure and synthesis of the fungal cell wall**; Wiley periodicals, 2006.
- Castillo-Quiroz D.; **Análisis de mutaciones de los genes CYP51 y  $\beta$ -tubulina para determinar la resistencia a los azoles y bencimidazoles en el hongo *Mycosphaerella fijiensis***; Tesis de licenciatura Universidad Autónoma de Guadalajara, 2011.
- Chang, W., Chen, M., Wang, S.; **An antifungal chitinase produced by *Bacillus subtilis* using chitin waste as a carbon source**; 2009.
- Cheng, Y. M., Hong, T. Y., Liu, C. C. y Meng, M.; **Cloning and functional characterization of a complex endo- $\beta$ -1,3-glucanase from *Paenibacillus* sp.**; 2008.
- Cisneros-Reyes, C.I., **Factores bioquímicos de promoción de crecimiento en plantas de análisis de 23 bacterias endófitas aisladas de banano**; Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Guadalajara, 2012.

- Compant S, Clément C and Sessitsch A. 2009. **Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization.** Soil Biology & Biochemistry, pp. 1-10.
- Cruz Gonzalez B.Y. 2010. **Efecto antifúngico de los sobrenadantes de cultivos en un medio de quitina de camarón de bacterias endófitas de la planta de banano en cepas resistentes a los fungicidas de *Mycosphaerella fijiensis*.** Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Dal Bello, G.M., C.I. Mónaco and M.R. Simónn; **Biological control of seedling blight of wheat caused by *Fusarium graminearum* with beneficial rhizosphere microorganisms;** Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI), 2002
- Gomaa, E. Z; **Chitinase Production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their Potential in Antifungal Biocontrol;** Department of Biological and Geological Sciences, Faculty of Education, 2011.
- González-Esquer, C.R. 2006. **Caracterización de actividades de catalas, peroxidasa de ascorbato y peroxidasa de Guaiacol en hojas de eplátano en condiciones de estrés por daño mecánico.** Tesis de Licenciatura. Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Guo, Y., Zheng, H., Yang, Y. y Wang, H.; **Characterization of *Pseudomonas corrugata* strain P94 isolate from soil in Beijing as a potencial biocontrol agent;** 2007.
- Gupta, R., Gupta N . and. Rathi, P.; **Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties;** springerlink; 2004
- Hartl, L., Zach, S. & Seidl-Seiboth, V.; **Fungal chitinases: diversity, mechanistic properties and biotechnological potential;** 2011

- Kim, J.S & Je, Y.H. 2010. **A novel biopesticide production:attagel-mediated precipitation of chitinase from Beauveria bassiana SFB-205 supernatant for thermotolerance.** Applied Microbiology and Biotechnology. Published on line Mayo, 2010.
- Macedo-Raygoza, G.M.; **Análisis fisiológico y molecular de la sensibilidad a fungicidas en cepas del hongo Mycosphaerella fijiensis obtenidas de las regiones productoras de plátano de Jalisco, Tabasco y Colima: Desarrollo de un mapa geográfico de resistencia;** Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Guadalajara, 2010.
- Mercado-Blanco, J y Bakker, P.; **Interactions between plants and beneficial *Pseudomonas* spp.: exploiting bacterial traits for crop protection;** Antonie Van Leeuwenhoek, 2007.
- Neilands, J. B.; **Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds;** THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY: 1995
- Orozco-Romero, J., Ramírez-Sandoval, G., y Vazquez-Valdivia, V.; **Comportamiento del banano FHIA-01 y plátano FHIA-21 en México.;** Memorias del Simposium Internacional sobre sigatoka negra. SAGAR, INIFAP, INIBAP. Manzanillo, Colima, México; 1998.
- Ortiz Mendoza D. 2010. **Bacterias nativas obtenidas de la planta de banano subgrupo Cavendish “enano gigante” (Musa acuminata AAA) con potencial antifúngico para el control de la sigatoka negra: aislamiento, selección y caracterización.** Tesis de Maestría. Maestría en Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California.
- Pleban, S., Chernin, L. y Chet, I.; **Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*;** Letters un applied microbiology, 1997.

- Rangarajan, S., Saleena L., Vasudevan, P.& Nair, S.; **Biological suppression of rice diseases by Pseudomonas spp. under saline soil conditions**; Swaminathan Research Foundation, 2002.
- Sarethy, I., Saxena, Y., Kapoor, A., Sharma, M., Sharma, S., Gupta, V., Gupta, S.; **Alkaliphilic bacteria: applications in industrial biotechnology**; Society for Industrial Microbiology; 2011.
- Shimahara, K. & Takiguchi, Y. 1988. **Preparation of crustacean chitin In:** Wood, WA, Kellog ST. eds. Methods in Enzimology NY. Academic Press. Vol. 11, pp. 417-435.
- Torres Cruzaley M.I. 2010. **Actividad antifungica de bacterias quitinolíticas:efecto del quitosano sobre el desarrollo de cepas aisladas en Jalisco del hongo *Mycosphaerella fijiensis* agente causal de la Sigatoka negra.** Tesis de Licenciatura. Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad Autónoma de Guadalajara.
- Tortora, M., Díaz-Ricci, J., Pedraza, R.; **Azospirillum brasilense siderophores with antifungal activity against Colletotrichum acutatum**; 2011.
- Trejo-Estrada, S.R., Paszczynski, A. y Crawford, D.L.; **Antibiotics and enzymes produced by biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9**; Journal of industrial microbiology and biotechnology; 1998.
- Velho, R., Medina, L., Segalin, J. & Brandelli, A.; **Production of lipopeptides among Bacillus strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi**; Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, 2011.
- Whipps, J.; **Microbial interactions and biocontrol in the rizosphere**; Journal of experimental botany; Vol. 52:487-511, 2000.
- Yáñez-Mendizábal, V., Zerouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., De Vicente, A., Pérez-García, A., & Teixidó, N.; **Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is**