

Bacillus subtilis: PRODUCCION DE FRACCIONES PÉPTIDICAS
ANTIMICROBIANAS Y PROMOCION DE CRECIMIENTO VEGETAL DE
TOMATE

MARÍA MAGDALENA RAMOS HERNÁNDEZ

T E S I S

Presentada como Requisito Parcial para
Obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA



UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Junio del 2011

UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO

Bacillus subtilis: PRODUCCION DE FRACCIONES PÉPTIDICAS
ANTIMICROBIANAS Y PROMOCION DE CRECIMIENTO VEGETAL DE
TOMATE

T E S I S

POR:
MARÍA MAGDALENA RAMOS HERNÁNDEZ

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y aprobada como
requisito parcial, para obtener el grado de

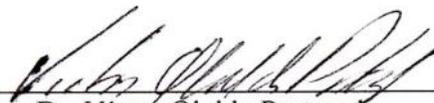
MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA

Asesor Principal



Dr. Alberto Flores Olivas

Asesor



Dr. Víctor Ólalde Portugal

Asesor



Dr. Ernesto Cerna Chávez

Asesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales

Asesor



M.C. Susana González Morales



Dr. Fernando Ruiz Zarate
Subdirector de Postgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México
Junio del 2011

AGRADECIMIENTOS

Agradezco muy profundamente a todos los organismos y personas que hicieron posible la realización del mismo, entre los que se debo mencionar:

A mi casa de estudios la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología proyecto 106401, así como el apoyo de una beca que me permitió desarrollar este trabajo de tesis y adquirir experiencia profesional.

Al Doctor Alberto Flores Olivas por el apoyo en espacios y equipo para el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Víctor Olalde Portugal por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo agradecer también su amabilidad y disponibilidad durante mi estancia en el Centro de investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, durante las cuales tuve todo el soporte profesional para alcanzar los objetivos perseguidos. Muchas gracias por permitirme vivir una experiencia tan importante para mi formación profesional. A la técnico Rosy su colaboración, fue de gran ayuda durante mis estancias en el laboratorio de Bioquímica Ecológica.

Al Dr. Ernesto Cerna Chávez, Dr. Gabriel Gallegos Morales y M.C. Susana González Morales por brindarme su apoyo incondicional en todo momento.

A mi esposo por su cariño y comprensión, a mis padres, hermanas y sobrinos por brindarme un hogar cálido y enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas quienes de una u otra forma han colocado un granito de arena para el logro de este Trabajo de Grado, agradezco de forma sincera su valiosa colaboración y que no necesito nombrar porque tanto ellas como yo sabemos que desde los más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

A todos

GRACIAS

Dedicatoria

A mí

“Alma Terra Mater”

Universidad Autónoma Agraria
Antonio Narro

COMPENDIO

***Bacillus subtilis*: PRODUCCION DE FRACCIONES PÉPTIDICAS ANTIMICROBIANAS Y PROMOCION DE CRECIMIENTO VEGETAL DE TOMATE**

POR:

MARÍA MAGDALENA RAMOS HERNÁNDEZ

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN PARASITOLOGIA AGRICOLA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. JUNIO DEL 2011**

Dr. Alberto Flores Olivas --Asesor--

Palabras clave: Fracciones peptídicas, *Bacillus subtilis*, tomate, *Fusarium oxysporum* f. *sp. lycopersici*.

El tomate es uno de los cultivos más importantes desde el punto de vista económico y productivo y se ha destacado en los últimos años por la incorporación constante de tecnologías para su producción donde se requieren el uso de fertilizantes químicos en grandes cantidades. Una de las enfermedades de mayor importancia en este cultivo es el

marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, debido a las pérdidas en la producción de este cultivo. *Bacillus subtilis* presenta un potencial benéfico como inoculante microbiano a través de la producción de diferentes sustancias por lo anterior se planteó como objetivos determinar la capacidad promotora de crecimiento vegetal de *B. subtilis* cepas Mza01 y cepas Lvpa en el cultivo de tomate variedad Floradade, separar y evaluar fracciones peptídicas de extractos libres de células (ELC) de *B. subtilis* cepa Mza01 sobre la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Se evaluó el efecto promotor de crecimiento de *B. subtilis* sobre el rendimiento en plantas de tomate en camas de invernadero, se inocularon las semillas de tomate variedad Floradade a una dosis de 10^6 UFC/ml de *B. subtilis* cepa PLV01 y cepa Mza01 que posteriormente fueron sembradas en cajas de poliestireno de 200 cavidades usando sustrato estéril (turba), transcurridos 28 días fueron trasplantadas a camas en un invernadero, se realizaron dos muestreos, sacando las plantas de la tierra sin dañar la raíz, se tomaron mediciones de peso seco de raíz, tallo, hoja, área foliar específica en cm^2 y fruto.

Para la separación de las fracciones peptídicas, la bacteria cepa Mza01 fue cultivada en medio líquido infusión papa, mantenido en condiciones de agitación y sin agitación. Para la obtención de un extracto libre de células; los cultivos fueron centrifugados, filtrados y esterilizados. Posteriormente fueron separados por cromatografía de intercambio iónico, las fracciones obtenidas catiónicas, aniónica y sin carga fueron inyectadas en columnas preparativas C18. Después las fracciones fueron concentradas al vacío, filtradas y separadas por medio de cromatografía de alta eficiencia fase reversa. Se obtuvieron 32 fracciones que fueron evaluadas sobre la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en discos de Extracto de Malta Agar por el método de microscopía óptica.

De acuerdo con los resultados obtenidos se concluye que cepa de *B. subtilis* pueden ser utilizadas como biofertilizantes en el cultivo de tomate ya que promueven el

crecimiento de raíz y el área foliar de plantas y ejerce un efecto positivo al incrementar el rendimiento de fruto en el cultivo. El ELC de *B. subtilis* contiene fracciones peptídicas con capacidad de inhibir la germinación de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

ABSTRACT

***Bacillus subtilis*: PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE FRACTIONS AND PROMOTION OF VEGETAL GROWTH OF TOMATO**

BY:

MARÍA MAGDALENA RAMOS HERNÁNDEZ

**MASTERY IN SCIENCES IN
AGRICULTURAL PARASITOLOGY**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA AGRARIA ANTONIO NARRO
BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA, MÉXICO. JUNE OF 2011**

Dr. Alberto Flores Olivás --Advisor--

Key words: peptide fractions, *Bacillus subtilis*, tomato, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

The tomato is one of the most important cultures from the economic and productive point of view and has been outlined in the last years for the constant incorporation of technologies for his production where there is needed the use of chemical fertilizers in big quantities. One of the diseases of major importance in this culture is the vascular fading caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, due to the losses in the production of this culture. *Bacillus subtilis* presents a charitable potential since inoculate microbial across the production of different substances for the previous thing there considered as aims to determine the capacity promoter of vegetable growth of *B. subtilis*

vine-stocks Mza01 and vine-stocks Lvpa in the culture of tomato variety Floradade, to separate and to evaluate Fractions peptídicas of free extracts of cells (ELC) of *B. subtilis* vine-stock Mza01 on the germination of spores of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Promoter of growth evaluated the effect of *B. subtilis* on the performance in plants of tomato in beds of greenhouse, the seeds of tomato inoculated variety Floradade to a dose of 106 UFC/ml of *B. subtilis* vine-stock PLV01 and vine-stock Mza01 that later were sowed in boxes of polystyrene of 200 cavities using sterile substratum (it disturbs), passed 28 days were transplanted to beds in a greenhouse, two samplings were realized, extracting the plants of the land without damaging the root, there took measurements of dry weight of root, stem, leaf, area to foliate specific in cm² and fruit.

For the separation of them divide peptídicas, the bacterium vine-stock Mza01 was cultivated in liquid way infusion it eats, supported in conditions of agitation and without agitation. For the obtaining of a free extract of cells; the cultures were centrifuged, leaked and sterilized. Later they were separated by chromatography of ionic exchange, the obtained cationic, anionic fractions and without load they were injected into columns preparativas C18. Later the fractions were concentrated to the emptiness, leaked and separated by means of chromatography of high efficiency phase reverse. There were obtained 32 fractions that were evaluated on the germination of spores of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* on discs of Extract of Malta Agar by the method of optical microscopy.

In agreement with the obtained results one concludes that vine-stock of *B. subtilis* can be used like biofertilizantes in the culture of tomato since they promote the growth of root and the area to foliate of plants and exercises a positive effect on having increased the performance of fruit in the culture. The ELC of *B. subtilis* contains fractions peptídicas with aptitude to disable the germination of spores of *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

INDICE DE CONTENIDO

	Página
INDICE DE CUADROS.....	xiii
INDICE DE FIGURAS.....	xiv
1. INTRODUCCIÓN	1
Objetivo General	3
Objetivos Específicos.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
La rizósfera.....	4
Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR).....	4
Características de las PGPR.....	5
Mecanismos de acción de las PGPR.....	6
Mecanismos de acción directa	6
Mecanismos indirectos.....	6
Promoción del crecimiento de plantas por PGPR.....	8
Las rizobacterias como control natural de agentes patógenos	9
El género <i>Bacillus</i> como rizobacteria promotora del crecimiento de plantas.....	10

Características del género <i>Bacillus</i> spp.	10
Características generales de <i>Bacillus subtilis</i>	10
Ciclo de vida	11
Mecanismos de acción de <i>Bacillus subtilis</i>	11
Metabolitos producidos por <i>Bacillus subtilis</i>	12
Péptidos antimicrobianos	13
Síntesis de antibióticos producidos por <i>Bacillus subtilis</i>	14
Lantibióticos.....	14
Lipopéptidos cíclicos: Iturinas y Surfactinas	16
Iturinas.....	16
Surfactinas.....	16
 3. ARTICULO. <i>Bacillus subtilis</i> : Producción de fracciones pépticas antimicrobianas y promoción de crecimiento vegetal de tomate.....	 18
 4. CONCLUSIONES GENERALES	 31
 5. RESUMEN.....	 32
 6. LITERATURA CITADA.....	 32
 7. ANEXO.....	 44

INDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Tratamientos evaluados sobre la germinación de esporas.....	24
Cuadro 2. Influencia de la aplicación de <i>B. subtilis</i> en la acumulación de materia seca en tallo, raíz y hoja en plantas de tomate a los 35 días después del trasplante.....	29
Cuadro 3. Influencia de la aplicación de <i>B. subtilis</i> en la acumulación de materia seca en tallo, raíz y hoja en plantas de tomate a los 65 días después del trasplante.....	30
Cuadro 4. Propiedades de las resinas de intercambio iónico.....	45
Cuadro 5. Agar Extracto de Malta.....	45

INDICE DE FIGURAS

Página

- Figura 1.** Perfil cromatográfico (RP HPLC) de la Fracción no retenidas en columnas C₁₈ medio de cultivo mantenido en agitación (NRQS/A) del ELC de *Bacillus subtilis* cepa Mza01 con un volumen de inyección de 100 µl y detección a 220 y 280 nm. (Las Fracciones colectadas se indican con círculos).....25
- Figura 2.** Perfil cromatográfico (RP HPLC) de la Fracción no retenidas en columnas C₁₈ medio de cultivo mantenido en agitación (NRQS/SA) del ELC de *Bacillus subtilis* cepa Mza01 con un volumen de inyección de 100 µl y detección a 220 y 280 nm. (Las Fracciones colectadas se indican con círculos).....25
- Figura 3.** Perfil cromatográfico (RP HPLC) de la Fracción aniónica de la columnas C₁₈ medio de cultivo mantenido en agitación (FQ/A) del ELC de *Bacillus subtilis* cepa Mza01 con un volumen de inyección de 100 µl y detección a 220 y 280 nm. (Las Fracciones colectadas se indican con círculos).....26
- Figura 4.** Perfil cromatográfico (RP HPLC) de la Fracción aniónica de la columnas C₁₈ medio de cultivo mantenido sin agitación (FQ/SA) del ELC de *Bacillus subtilis* cepa Mza01 con un volumen de inyección de 100 µl y detección a 220 y 280 nm. (Las Fracciones colectadas se indican con círculos).....26
- Figura 5.** Perfil cromatográfico (RP HPLC) de la Fracción catiónica de la columnas C₁₈ medio de cultivo mantenido en agitación (FS/A) del ELC de *Bacillus subtilis* cepa Mza01 con un volumen de inyección de 100 µl y detección a 220 y 280 nm. (Las Fracciones colectadas se indican con círculos).....27
- Figura 6.** Perfil cromatográfico (RP HPLC) de la Fracción catiónica de la columnas C₁₈ medio de cultivo mantenido sin agitación (FS/SA) del ELC de *Bacillus subtilis* cepa Mza01 con un volumen de inyección de 100 µl y detección a 220 y 280 nm. (Las Fracciones colectadas se indican con círculos).....27
- Figura 7.** Efecto inhibitorio de metabolitos extracelulares sobre la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, a las 10 horas de incubación. Índices obtenidos por microscopía óptica.....28

Figura 8. Lantibióticos producidos por <i>Bacillus subtilis</i> . Estructura esquemática de los péptidos maduros A) subtilina B) Mersacidina. A-S-A, mesolantionina; Abu-S- A, 3-metillantionina; ΔA, 2,3-didehidroalanina; ΔB, 2,3- didehidrobutirina. (Stein <i>et al.</i> , 2005).....	15
Figura 9. Fraccionamiento del extracto libre de células (ELC). (a) Separación del ELC ajustado a un pH 8, utilizando columnas empaquetadas con resinas de intercambio aniónico (Q) y catiónico (S) con flujo de elusión de 4ml/min. (b) Separación de las moléculas retenidas en cada una de las resinas de intercambio iónico, eluidas cada una de ellas con 50ml de KCl 1 M.....	44
Figura 10. Efecto de <i>Bacillus subtilis</i> sobre acumulación de materia seca en tallo en plantas de tomate de acuerdo con los grupos de medias (Tukey $\alpha=0.05$).....	45
Figura 11. Efecto de <i>Bacillus subtilis</i> sobre la acumulación de materia seca en hoja de plantas de tomate de acuerdo con los grupos de medias (Tukey $\alpha=0.05$).....	45
Figura 12. Efecto de <i>Bacillus subtilis</i> sobre hoja en plantas de tomate de acuerdo con los grupos de medias (Tukey $\alpha=0.05$).....	46
Figura 13. Efecto de <i>Bacillus subtilis</i> sobre acumulación de materia seca en raíz en plantas de tomate (Agrupamiento Tukey $\alpha=0.05$).....	46
Figura 14. Efecto de <i>Bacillus subtilis</i> sobre rendimiento de fruto en plantas de tomate (Agrupamiento Tukey $\alpha=0.05$).....	47

1. INTRODUCCIÓN

La utilización de microorganismos en el control biológico de enfermedades de las plantas, constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye el uso de productos químicos. Entre los agentes de control biológico más estudiados se encuentran los microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* y *Bacillus* (Whipps, 2001).

El control biológico por medio de metabolitos inhibidores de hongos fitopatógenos; es un mecanismo de acción conocido como antibiosis, tiene su base en la producción metabólica de moléculas tóxicas volátiles y enzimas hidrolíticas, como son quitinasas, glucanasas, lipasas y proteasas (Baker y Griffin, 1995). Las enzimas disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y glucanos de la pared celular de los hongos produciendo un efecto adverso sobre su desarrollo (Roberts y Lumsden, 1990; Carsolio *et al.*, 1999).

Las especies del género *Bacillus* poseen características especiales que los hacen buenos candidatos como agentes de control biológico. Su utilización para el biocontrol de las enfermedades de las plantas es de gran interés, debido a la capacidad que presentan estas bacterias para producir sustancias con capacidad antibacteriana y antifúngica, impidiendo el establecimiento de patógenos vegetales. Entre las especies más utilizadas con este propósito se encuentran *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. pumillas* y *B. polymyxa*.

El rápido crecimiento que muestra *B. subtilis* en cultivo líquido, la formación de endosporas resistentes al calor y la desecación, así como la producción de metabolitos secundarios son características que permiten considerar a estos microorganismos como potenciales agentes de control biológico (Shoda, 2000).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Separar y evaluar las fracciones peptídicas producidas por extractos libres de células de *B. subtilis* cepa Mza01, evaluar la respuesta de la aplicación de esta bacteria en el cultivo de tomate.

Objetivos Específicos.

- Separar las fracciones peptídicas producidas por extractos libres de células de *B. subtilis* cepa Mza01.
- Evaluar las fracciones peptídicas producidas por extractos libres de células de *B. subtilis* cepa Mza01 sobre la germinación de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
- Evaluar la respuesta de la inoculación de *B. subtilis* sobre las variables de crecimiento y rendimiento en el cultivo de tomate en invernadero.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

La rizósfera

Se entiende por rizósfera el volumen de suelo influenciado por la presencia de raíces de una planta viva, cuya extensión puede variar de acuerdo al tipo de suelo, la especie de planta, su edad y otros factores (Hiltner, 1904). Lynch (1990) la define como toda aquella porción de suelo que está fuertemente influenciada por las raíces de las plantas, la cual a su vez se divide en tres partes: rizoplano (microorganismos pegados a la raíz), endorrizosfera (microorganismos dentro de la raíz) y ectorrizosfera (microorganismos que actúan de manera circundante a la raíz). Dicha asociación se inicia como respuesta al llamado efecto rizosférico, el cual sucede a través de un intercambio de señales que se disparan a partir de la interacción microbio-planta, con resultados claramente benéficos para los dos (Kluepfel, 1993; Jiménez, 2009).

Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR)

Se denominan rizobacterias a aquellas cepas bacterianas del suelo capaces de colonizar las raíces y entorno rizosférico y constituyen por ello, uno de los grupos microbianos más importantes de los suelos.

Kloepper definió en 1978 a un tipo de bacteria como PGPR, aquellas bacterias que se encuentran libres en el suelo, capaces de adaptarse, colonizar y permanecer en la rizósfera de la planta favoreciendo el crecimiento o desarrollo de ésta con sus actividades, como: incrementar la solubilidad de elementos minerales P, K y Ca, fijar nitrógeno atmosférico, reducir patógenos de las raíces por antagonismo o competencia, y producir sustancias reguladoras del crecimiento de las plantas como auxinas, citoquininas y giberelinas que contribuyen a incrementar el crecimiento de la raíz (Glick, 1995).

Características de las PGPR

El concepto de Bacterias Rizosféricas Promotoras del Crecimiento se define en base a tres características:

- Su capacidad para la colonización radical.
- Sobrevivir y multiplicarse en microhábitats asociados a la superficie radical en competencia con la microbiota nativa, al menos con tiempo para expresar su actividad promotora del crecimiento.
- Capacidad para promover dicho desarrollo (Kloepper, 1994).

Se atribuye a estas rizobacterias muchos procesos importantes de los ecosistemas, como control biológico de patógenos de plantas, ciclos de nutrientes y establecimiento de semillas (Kloepper *et al.*, 1991; Lemanceau, 1993).

Estos microorganismos capaces de producir efectos beneficiosos en el desarrollo de las plantas, han demostrado su eficacia sobre muchos cultivos agrícolas, tales como papa, judías, algodón, cacahuete, lenteja, arroz, soja y especies leñosas como manzano y cítricos (Rodríguez, 2003).

Mecanismos de acción de las PGPR

Se pueden definir dos posibles mecanismos de estimulación del crecimiento de las PGPRs, directos e indirectos.

Mecanismos de acción directa

A este grupo pertenecen aquellos metabolitos producidos por la bacteria capaces de estimular el crecimiento vegetal (Kloepper, 1993). Totalmente independientes de la población microbiana edáfica y del soporte edáfico. Tal es que caso de:

- Fijación de nitrógeno de forma asociativa (Dobereiner y De-Poli, 1980),
- Producción de reguladores de crecimiento vegetal como auxinas, giberelinas y citoquininas (Holl *et al.*, 1988; Gutierrez *et al.*, 1996).
- Inhibición de síntesis de etileno (Glick *et al.*, 1995).
- Aumento en la permeabilidad de la raíz (Sumner *et al.*, 1990).

Mecanismos indirectos

Cuando la estimulación del crecimiento es indirecta, la bacteria libera algún metabolito, que a su vez, afecta a otros factores rizosféricos que revierten en una mejora o estimulación del crecimiento de la planta (Kloepper, 1993). Se pueden resumir en los grupos que se describen a continuación.

- Producción de sustancias capaces de movilizar nutrientes de tipo aminoácido, sideróforos o ácidos orgánicos que liberaran fósforo, hierro y/o aluminio (Cattelan *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 1994).

- Influyen en la producción de fitoalexinas, compuestos utilizados para la defensa de la planta, respuesta inducida por lipopolisacáridos producidos por bacterias en el rizoplano (Agrios, 2005; Cattelan *et al.*, 1999, Loon, 2007).
- Algunas bacterias pueden hidrolizar moléculas producidas por patógenos como *Pseudomonas cepacia* y *P. solanacearum*, son capaces de hidrolizar el ácido fusárico, liberar β 1,3–glucanasa inhibiendo el desarrollo de la pared fúngica de hongos fitopatógenos como *Phyium ultimum* y *Rhizoctonia solani* (Cattelan *et al.*, 1999; Loon, 2007; Schnider *et al.*, 1994; Solano, 2000).
- Producción de sideróforos. Los sideróforos secretados por las PGPRs quelan la mayor parte del Fe^{3+} presente en el suelo, disminuyendo su disponibilidad para otros microorganismos, entre los que se encuentran los patógenos, y evitando así que proliferen debido a la carencia de este nutriente (Sullivan y Gara, 1992). Las plantas no se ven afectadas por el secuestro de hierro por parte de las bacterias, ya que la mayoría de las plantas son capaces de crecer en medios con concentraciones de Fe^{3+} mucho más bajas que los microorganismos, algunas son capaces de capturar el complejo sideróforo-hierro mejorando así su nutrición. (Crowley *et al.*, 1988; Bar- Ness *et al.*, 1991, Sullivan *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993).
- Control de patógenos mediante antagonismos o competencia. Existen cepas bacterianas capaces de sintetizar sustancias contra otras bacterias: los antibióticos (Schnider *et al.*, 1994).
- Resistencia Sistémica Adquirida e Inducida. Las rizobacterias no patógenas pueden inducir una resistencia sistémica en las plantas similar a la resistencia sistémica adquirida cuando son atacadas por patógenos. La mediación de diferentes cepas bacterianas en la Resistencia Sistémica Inducida ha sido demostrada contra hongos, bacterias y virus en diversos cultivos como cucurbitáceas, frijoles, tabaco, tomate, etc. Determinadas bacterias inducen la resistencia sistémica, produciendo diferentes compuestos tales como

lipopolisacáridos, sideróforos y ácido salicílico; sin embargo, esta inducción depende de que las bacterias colonicen el sistema radical en número suficiente (Van Loon *et al.*, 1998).

- Hidrólisis de moléculas producidas por patógenos. Toyoda y Utsumi (1991) describen cepas de *Pseudomonas cepacia* y *Pseudomonas solanacearum* capaces de hidrolizar el ácido fusárico, agente causante del marchitamiento por infección de *Fusarium*.
- Síntesis de enzimas hidrolíticas de pared fúngica. Lim *et al.*, (1991) describen como *Pseudomonas cepacia* libera β 1,3-glucanasa, inhibiendo el desarrollo de *Phyitium ultimum* y *Rhizoctonia solani*.
- Competencia por nutrientes y nichos ecológicos (Kloepper *et al.*, 1988; Devliegher *et al.*, 1995).
- Síntesis de ácido cianhídrico. Las bacterias del género *Pseudomonas* lo producen habitualmente, lo que apunta hacia un posible efecto antipatogénico (Voisard *et al.*, 1989).
- Control de insectos plaga. Zehnder *et al.*, (1997), trabajando con plantas de pepino, demuestran que algunas de las PGPRs ensayadas, alteran el comportamiento de los escarabajos, *Acalymma vittatum* y *Diabrotica undecimpunctata howardi* que provocan importantes pérdidas en las cosechas. Uno de estos mecanismos ha sido demostrado en pepino, donde se ha visto que las plantas tratadas con PGPRs muestran una reducción significativa en los niveles de cucurbitacina, sustancia que sirve de señal alimenticia para las larvas de estos escarabajos, que la ingieren, reduciéndose así drásticamente las poblaciones del insecto en las plantas tratadas con PGPRs.

Promoción del crecimiento de plantas por PGPR

La promoción del crecimiento en las plantas inoculadas con rizobacterias ocurre por varios factores:

- La síntesis de ciertas sustancias reguladoras de crecimiento, como giberelinas, citocininas y auxinas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, aumentando así la cantidad de raíces en las plantas, lo que incrementa a su vez la capacidad de absorción de agua y nutrimentos y permite que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas, como las heladas o las sequías (Aerts, 2007).

- Ayudan a las plantas a nutrirse mejor; por ejemplo, las *Pseudomonas* sp., las cuales, al solubilizar algunos nutrimentos poco móviles del suelo, como el fósforo, mejoran el ingreso de este macronutriente hacia la planta, lo que se traduce en una mayor cantidad de biomasa. Otras especies, como *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., aumentan el aporte de nitrógeno, influyendo directamente en el crecimiento, desarrollo y rendimiento.

Las rizobacterias como control natural de agentes patógenos

Rizobacterias como las del género *Pseudomonas* sp., suprimen numerosos fitopatógenos del suelo, tales como bacterias, hongos, nematodos y virus, mismos que pueden llegar a reducir las cosechas de forma espectacular en los cultivos establecidos tanto en invernadero como en campo.

Las vías de control que estos organismos ejercen se da a través de diversos mecanismos de defensa que involucran la producción de compuestos bacterianos, como sideróforos, ácido cianhídrico (HCN) y antibióticos. Se ha comprobado que las rizobacterias inducen en algunos casos un sistema de resistencia en las plantas que hace que puedan tolerar el ataque de diversos patógenos del suelo al mismo tiempo. Algunos de las principales géneros bacterianos que se han citado para el control biológico de hongos fitopatógenos

son: *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* y *Xanthomonas*, siendo los géneros más estudiados por su producción de antibióticos *Bacillus* y *Pseudomonas* (Weller, 1988).

El género *Bacillus* como rizobacteria promotora del crecimiento de plantas

El género *Bacillus* ha sido objeto de estudio en la promoción del crecimiento de plantas por varios años, debido a las ventajas que este ofrece sobre otros géneros bacterianos (Tuner *et al.*, 1991; Harwood, 1999; Probanza *et al.*, 2001).

Características del género *Bacillus* spp.

El género *Bacillus* spp. son bacterias móviles por flagelos peritricos y aeróbios estrictos en su mayoría. Consiste en un gran número de diversas formas de bastón, Gram positivo, oxidasa y catalasa positiva. En los medios de cultivo líquidos crecen formando un biofilm (velo) en la superficie, capaces de producir endosporas, las que resisten altas temperaturas y factores físicos perjudiciales como la desecación, la radiación, los ácidos y los desinfectantes químicos (Sneath, 1989; Wilson, 2000).

Características generales de *Bacillus subtilis*

B. subtilis es un microorganismo autóctono del suelo, prospera en la naturaleza donde se encuentra ampliamente distribuido en muy diversos hábitats, se caracteriza por ser una bacteria Gram positiva, catalasa positiva, con forma bacilar, aerobia estricto o anaerobia facultativa que en condiciones estresantes forman una endoespora central, que deforma la estructura de la célula. Produce una gran variedad de proteasas y otras

enzimas que le permiten degradar una variedad de sustratos naturales (Slepecky, 1992; USA, 1997).

Esta bacteria es capaz de generar un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos, en donde se encuentran la producción de sustancias antibióticas, producción de lipopéptidos que actúan como biosurfactantes, solubilización de fosfatos y reducción de enfermedades en las plantas (Kokalis *et al.*, 2006).

Ciclo de vida

Las especies de *Bacillus* son células potencialmente resistentes en la parte final de la fase exponencial de crecimiento. Las células resistentes formadas intracelularmente son llamadas endosporas. Ellas difieren de las células vegetativas en refracción óptica, ultraestructura, composición química, resistencia a estrés químico y físico en donde las células vegetativas mueren rápidamente (León, 2001).

Kearns y Losick (2005) explican que bajo condiciones limitantes de nutrientes *Bacillus subtilis* genera una población mezclada de células, donde la mitad de estas activan el regulador principal para la esporulación Spo0A y la otra mitad no lo hacen. Por tanto la significación biológica de este ejemplo es que las células que se han activado para llevar a cabo la formación de esporas buscan sobrevivir por un proceso de canibalismo que implica la matanza de las células hermanas que no han activado el regulador principal.

Mecanismos de acción de *Bacillus subtilis*

B. subtilis es conocido por ser antagonista de muchos hongos patógenos vegetales. Este antagonismo es logrado a través de diversos mecanismos que incluyen la competencia por nutrientes; exclusión de sitio; colonización de la bacteria en el

patógeno y/o la liberación de componentes celulares durante el crecimiento (Butt *et al.*, 1999).

El proceso de liberación del contenido celular ha evolucionado para proteger su nicho, inhibiendo el crecimiento de los competidores y utilizando la misma fuente nutricional, e incluso consumiendo a los competidores. También ha demostrado inducir la resistencia sistémica natural de la planta contra patógenos bacterianos y fungos propiedad llamada Resistencia Sistémica Adquirida (Butt *et al.*, 1999).

Se ha comprobado que *B. subtilis* tiene un amplio espectro de actividad antifúngica debido a que produce más de dos docenas de antibióticos, donde la clase predominante son los de naturaleza peptídica, un ejemplo de ellos es un metabolito termoestable extracelular que tiene una estructura típica de péptido cíclico, dentro de la familia de las iturinas (Katz, 1977; Gueldner *et al.*, 1988 Rodgers, 1989; Stein, 2005)

Metabolitos producidos por *Bacillus subtilis*

La producción de metabolitos de esta bacteria presenta propiedades antifúngicas y antibacterianas. La actividad antifúngica se debe a polipéptidos como la iturina, subtilina, bacitracina mycobacillin, mycosubtillin, fengimincina y bacillomycin estudiados frente a hongos como *Rhizoctonia*, *Sclerotinia*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Phytophthora* y *Gaeumannomyces* (Salle, 1968; Sinclair, 1992).

Algunos antibióticos polipeptídicos parecen destruir las bacterias, dañando principalmente la pared celular como la bacitracina.

Las iturinas y surfactinas interfieren con la función de la membrana celular, destruyendo así la barrera de permeabilidad de la célula (Carrillo, 2003). Ejemplos de la actividad antibacteriana producida por *B. subtilis* existen informes de control frente a *Xanthomonas campestris* y a *Erwinia carotovora*, donde el principal antibiótico

producido es la surfactina, que posee un poder bactericida, modificando la superficie hidrófoba bacteriana.

Los investigadores de la Universidad de Wisconsin y Cornell han identificado un nuevo compuesto fungicida, la zwittermicina A, producido por *Bacillus sp.* (Korzybski *et al.*, 1978; He *et al.*, 1994). Se identificó recientemente un segundo metabolito fungicida producido por *Bacillus sp.* el aminoácido kanosamina (Milner *et al.*, 1996).

Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos son moléculas versátiles sintetizadas por microorganismos siguiendo rutas enzimáticas, y con interesantes propiedades alimentarias y farmacéuticas, entre ellas la capacidad antibiótica sobre patógenos. Desde la pasada década se han descubierto cientos de péptidos antimicrobianos (PAM) naturales, generados por microorganismos, y con un amplio rango de acción contra otros microorganismos. Su función es permitirle al organismo productor defenderse activamente del ataque de patógenos, haciendo parte así de su inmunidad innata (Lehmann, 2002; Lehrer, 2002).

Pueden ser clasificados según su composición de aminoácidos y estructura en 5 clases:

- 1) péptidos aniónicos,
- 2) péptidos catiónicos lineales de α -hélice,
- 3) péptidos catiónicos enriquecidos con aminoácidos específicos,
- 4) péptidos aniónicos y catiónicos que contienen cisteína y forman enlaces disulfuro
- 5) péptidos aniónicos y catiónicos como fragmentos de grandes proteínas (Park, 2005).

La forma de síntesis de estos péptidos antimicrobianos es siguiendo rutas enzimáticas biosintéticas, como es el caso de algunos péptidos antimicrobianos de origen bacteriano, por ejemplo, la e-poli-L-lisina. A éstos péptidos también se les conoce como poliamidas

o poliaminoácidos. Se conocen poliaminoácidos producidos específicamente por microorganismos aislados de diferentes ambientes: ϵ -poli-Lglutamato producido por: *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. megaterium*, *B. subtilis* (Sinclair, 1992; Zuber *et al.*, 1993; Moyne *et al.*, 2001).

Síntesis de antibióticos producidos por *Bacillus subtilis*

Respecto a la biosíntesis de antibióticos, *B. subtilis* tiene genes especializados en esta función que corresponden al 4 -5 % del genoma de este.

Se distinguen dos vías de biosíntesis:

- a) Síntesis ribosomal de péptidos, precursores lineales que están sujetos a la modificación post-traducciona l y procesamiento proteolítico.
- b) Síntesis no ribosomal de péptidos, que está a cargo de un gran complejo multienzimático no ribosomal péptido sintetasa (NRPSs) (Stein, 2005).

Lantibióticos

Los lantibióticos son péptidos, que contienen el aminoácido de tioéter lantionina así como varios otros aminoácidos modificados y otros residuos poco usuales, entre los cuales podemos mencionar a la lantionina, cuya formación implica modificaciones post-traduccionales que incluyen la deshidratación de serina y treonina y la posterior adición de grupos tioles (Sahl, 1998; Guder *et al.*, 2000). Son producidos por biosíntesis ribosomal como precursores peptídicos, los cuales son modificados posteriormente hasta obtener un compuesto biológicamente activo. (Schnell *et al.*, 1998).

Los antibióticos antibacterianos pueden dividirse ampliamente en dos grupos basándose en sus estructuras:

- Los antibióticos tipo A son normalmente péptidos alargados contienen entre 21-38 residuos aminoácidos, anfífilos.
- Los antibióticos tipo B son compactos y globulares Actúan inhibiendo la biosíntesis de la pared celular (Mcauliffe, *et al*, 2001).

Entre los antibióticos producidos por cepas de *B. subtilis*, podemos mencionar la subtilina (Figura 1. A) y la nisina representantes típicos de los antibióticos tipo A, mientras que la actagardina (gardimicina) y la mersacidina (Figura 1. B) pertenecen a la subclase de antibióticos tipo B. Tanto los antibióticos de tipo nisina como de tipo mersacidina interaccionan con el lípido II precursores de peptidoglucano unidos a membrana, aunque las dos clases se diferencian en los efectos que producen sobre el proceso de proliferación bacteriana. Los antibióticos de tipo nisina destruyen principalmente las bacterias mediante permeabilización de la membrana citoplasmática, mientras que los antibióticos de tipo mersacidina destruyen principalmente las células bacterianas inhibiendo la biosíntesis de la pared celular (Brotz, *et al*, 1998; Symmank *et al*, 2002).

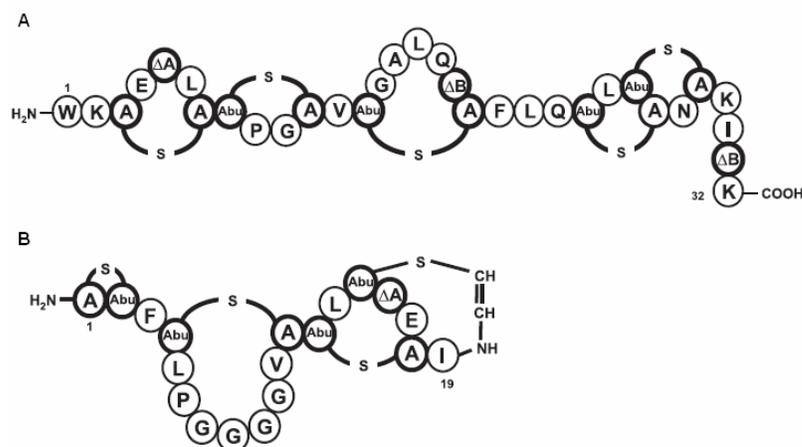


Figura 8. Antibióticos producidos por *Bacillus subtilis*. Estructura esquemática de los péptidos maduros A) subtilina B) Mersacidina. A-S-A, mesolantionina; Abu-S- A, 3-metilantionina; ΔA , 2,3-didehidroalanina; ΔB , 2,3-didehidrobutirina. (Stein *et al.*, 2005).

Lipopéptidos cíclicos: Iturinas y Surfactinas

Bacillus subtilis produce una variedad de lipopéptidos antibióticos los cuales se han clasificado en base a sus propiedades biológicas y fisicoquímicas en tres grupos: surfactinas, liquenisinas e Iturinas relacionados químicamente, sobre todo surfactinas y liquenisinas son prácticamente indistinguibles, la similitud es su estructura cíclica que consiste en un heptapéptido cerrado por un β - aminoácido para el caso de iturinas y un β - hidroxiácido graso para surfactinas y liquenisinas. Todos estos poseen una cola hidrófoba con una configuración R absoluta en C β , formando un anillo de lactam en iturinas y un anillo de lactona en surfactinas y liquenisinas. (Kakinuma *et al.*, 1969; Peypoux *et al.*, 1978; Bomantin *et al.*, 2003).

En la actualidad, los lipopéptidos son utilizados como bioplaguicidas para la protección de plantas, minimizando el uso de los fungicidas (Fujikawa, 1989; Wakita *et al.*, 2001; Shimada *et al.*, 2004; Vlamakis *et al.*, 2008).

Iturinas

Los metabolitos lipopéptidos cíclicos de la clase iturina, destacan por la eficacia contra una amplia variedad de patógenos importantes, como levaduras y algunos son potentes agentes fungicidas. Actúan sobre la pared celular de los hongos. Se caracterizan por ser amfifílicos y poseer un heptapéptido cíclico de siete o diez aminoácidos (Friddaman, 1993; Kleijn *et al.*, 2010).

Surfactinas

Las Surfactinas son reconocidas por ser un poderoso biosurfactante, y como tal disminuye la tensión superficial, actúa como un excelente detergente, emulsionante y forma *biofilms* (Ron *et al.*, 2001). En general, los biosurfactantes son capaces de reforzar

o disminuir la hidrofobicidad de la superficie bacteriana y por consiguiente, la adherencia microbiana a las superficies sólidas. Ejerce otras actividades biológicas como, inhibir la formación de coágulos de fibrina, actividades antitumorales, inhibición de la cAMP fosfodiesterasa y propiedades anti-VIH (Arima *et al.*, 1968; Kameda *et al.*, 1974; Hosono, 1983 Itokawa *et al.*, 1994).

3. ARTICULO

***Bacillus subtilis*: PRODUCCION DE FRACCIONES PÉPTIDICAS ANTIMICROBIANAS Y PROMOCION DE CRECIMIENTO VEGETAL DE TOMATE**

Bacillus subtilis: PRODUCTION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE FRACTIONS
AND PROMOTION OF VEGETAL GROWTH OF TOMATO

María Magdalena Ramos Hernández ¹, Alberto Flores Olivas^{1*}, Víctor Olalde Portugal ², Gabriel Gallegos Morales¹, Ernesto Cerna Chávez¹ y Susana González Morales¹.

1. Dpto. de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Calzada Antonio Narro No. 1923. Colonia, Buenavista, Saltillo, Coahuila. México. C.P. 25315. Tel. (844)11-02-26. 2. Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Campus, Irapuato, Gto., Km 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato - León. Irapuato, Guanajuato, México. C. P. 36500. *Autor para correspondencia (aflooli@uaaan.mx; aflooli50@gmail.com).

RESUMEN

Se caracterizó y evaluó las fracciones peptídicas producidas por extractos libres de células (ELC) de *B. subtilis*; así como la respuesta de la aplicación de esta bacteria en el cultivo de tomate. Los componentes del ELC fueron separados por cromatografía de

intercambio iónico, y se fraccionaron por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia de fase reversa. Las fracciones colectadas fueron evaluadas sobre la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* mediante observación de microscopía óptica en discos con medio de cultivo Extracto de Malta Agar. Se estableció un experimento en cultivo de tomate bajo invernadero; donde se inoculó con dos cepas de *B. subtilis*. Se determinó la acumulación de materia seca en tallos, hojas y raíces; también se midió el área foliar y la producción total de fruto por planta. El porcentaje de inhibición de la germinación de las esporas osciló de 0 a 13.5% con el ELC ($P \leq 0.05$). Los tratamientos inoculados con las cepas de *B. subtilis* tuvieron significativamente mayor acumulación de materia seca en raíz y hojas, comparados con el tratamiento testigo ($P \leq 0.05$) y un mayor rendimiento por planta ($P \leq 0.05$).

Palabras clave: rizosfera, inoculante, rendimiento, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

ABSTRACT

One characterized and it evaluated the peptide fractions produced by free extracts of cells (ELC) of *B. subtilis*; also the answer of the application of this bacterium in the tomato culture. The components of the ELC were separated by ion-exchange chromatography, and they were divided by Liquid Chromatography of High Efficiency of reverse phase. The collected fractions were evaluated on the germination of spores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by observation of optical disc microscopy with culture means Extract of Malta Agar. An experiment in culture of tomato under greenhouse settled down; where I inoculate with two stocks of *B. subtilis* it determined the accumulation of dry matter in stems, leaves and roots; also one was moderate the foliar area and the total production of fruit by plant. The percentage of inhibition of the germination of spores I oscillate from 0 to 13.5% with ELC ($P \leq 0.05$). The treatment inoculated with the stocks of *B. subtilis* had significantly greater accumulation of dry

matter in root and leaves, compared with the treatment witness ($P \leq 0.05$) and a greater yield by plant ($P \leq 0.05$).

Keywords: rhizosphere, inoculant, performance, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

INTRODUCCION

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) ocupa el primer lugar en exportaciones en México con 1,072,646 millones de toneladas y el décimo lugar en producción mundial con 2,936,770 millones de toneladas (FAOSTAT, FAO, 2008). El costo de la fertilización mineral y el control químico de enfermedades en este cultivo, han permitido el uso de biopreparados a partir de microorganismos con propiedades biofertilizantes, fungicidas e insecticidas (Hernández, 1998; Klibansky, 1996); Se ha estudiado el uso de *Bacillus subtilis* para la formulación de estos biopreparados gracias a los efectos benéfico que manifiesta a través de diferentes mecanismos de acción, entre los que se destacan, aumento en la toma de agua y nutrientes por la planta, producción de fitohormonas y el control biológico de patógenos, producción de sideróforos, antibiosis e inducción de resistencia en los cultivos contra un amplio espectro de plagas y enfermedades (Butt *et al.*, 1999); Existen reportes de péptidos antimicrobianos producidos por esta bacteria, entre los que se encuentran la iturina, subtilina, bacitracina, micobacilina, micosubtilina, fengimincina, bacilomicina, rhizotocina, bacilopeptina, bacilisina, botricidina, fengicina entre otros, (Sinclair, 1992; Zuber *et al.*, 1993; Moyne *et al.*, 2001), estudiados contra hongos como *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* agente causal de la marchitez vascular, principal enfermedad del cultivo de tomate, que afecta la calidad del producto y disminuye hasta en un 60% el rendimiento (Jones *et al.*, 1991; Cai *et al.*, 2003).

La posibilidad de desarrollar biopreparados fertilizantes y fungicidas a base de fracciones peptídicas producidas por extractos libres de células de *B. subtilis*; como una alternativa potencial en el control de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*; así como determinar la capacidad promotora del crecimiento vegetal debida a la aplicación de

Bacillus subtilis en el cultivo de tomate, se plantearon como objetivos del presente trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayo 1. Separación y evaluación de las fracciones peptídicas de *B. subtilis* sobre el efecto en la germinación de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*.

Obtención del extracto bacteriano (ELC). Para la obtención del ELC, la cepa Mza01 de *B. subtilis*, fue sembrada en medio de cultivo de infusión papa líquido donde se mantuvo en dos sistemas de crecimiento, en agitación constante a 200 rpm a 28°C por 20 horas y sin agitación a 28°C por 20 horas. Posteriormente cada extracto se centrifugó a 15000 rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes de los cultivos se esterilizaron a 115°C por 15 minutos en autoclave, para eliminar las células.

Separación de los componentes del ELC. Se realizó por cromatografía de intercambio iónico, se prepararon columnas con resinas de intercambio aniónico (Macro-Prep High Q, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) e intercambio catiónico (Macro-Prep High S, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). El volumen de empaquetamiento (v) de las columnas (2.5 cm I.D. x 8 cm) fue de $70 \text{ ml} \leq v \leq 75 \text{ ml}$ y fueron equilibradas con amortiguador Tris 0.01 M pH 8.0. Posteriormente, el ELC se ajustó a pH 8 y se eluyó por ambas columnas, conectadas entre sí, con un flujo de elusión de 4 ml/min. La porción del ELC no retenido en las columnas se recolectó denominando a esta, fracción no retenida (NRQS). Se eluyeron 100 ml de TRIS 0.01 M para el lavado de las columnas. Finalmente, la separación de las moléculas retenidas en las fracciones aniónicas (RQ) y fracciones catiónicas (RS) en cada uno de las resinas se realizó eluyendo cada columna con 100 ml de Cloruro de potasio 1M.

Separación de las fracciones peptídicas. Esta se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia fase reversa (RPHPLC), para ello las fracciones obtenidas de la elución con KCL 1M, de la columna MacroPrepS, MacroPrepQ y la NRQS fueron acidificadas con TFA al 0.1%v/v, la concentración de cada fracción se llevó a cabo a través de columnas preparativas C18 (125A° 1.5cm I.D. x6cm; Waters Corporation, Mifod, MA, USA), las cuales fueron activadas con metanol y equilibradas con 10 volúmenes de 0.1% de TFA. Los componentes se eluyeron con 2 volúmenes de CH₃CN al 95% en TFA 0.1%. El eluyente fue concentrado al vacío de 50 a 200 µl, filtrado (0.22 µl) e inyectado en una columna C18 de 4.5 x 250mm (The Separations Group, Hesperia, CA, USA) equilibrada con 0.1% de TFA (0% A 60% CH₃CN en 80 minutos). Posteriormente, se inyectaron de 50 a 100µl de muestra a la columna. La detección se realizó por absorbancia a una longitud de onda de 220nm. Las fracciones eluidas se colectaron manualmente y fueron concentradas al vacío para eliminar el CH₃CN y TFA residual.

Inhibición de la germinación de esporas. En discos de 2 cm de diámetro de extracto de malta agar, se inocularon con 100µl de una suspensión de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* a una concentración de 1×10^6 esporas/ml y 10µl de cada una de las fracciones colectadas resuspendidas en 40 µl de agua destilada estéril, cada una en su respectivo tratamiento (Cuadro 1), se contó con un testigo, inoculado con 10µl de agua destilada estéril. Se incubaron a 28°C por 10 horas y posteriormente se realizó un conteo de 100 esporas al microscopio, con el fin de determinar el porcentaje de inhibición (Wilson *et al.* 1997; Cowan 1999),

Ensayo 2. Evaluación de la capacidad promotora del crecimiento vegetal por *B. subtilis* en el cultivo de tomate en invernadero.

Preparación del inóculo. Se utilizaron dos cepas bacterianas, *B. subtilis* Mza01 aislada de raíces de árboles de manzano (*Malus domestica*) y *B. subtilis* Lvpa aislada del cultivo de vainilla (*Vanilla planifolia*). Para activarlas, se sembraron en agar-papa-dextrosa, se incubaron a 28°C durante cuatro días. Posteriormente, se multiplicaron en

caldo nutritivo, donde se mantuvo en un sistema de crecimiento, en agitación constante a 250 rpm a 28°C durante cuatro días.

Inoculación y trasplante. Semillas de tomate variedad Floradade se desinfectaron superficialmente, con una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante 15 minutos, seguidos de tres lavados con agua estéril y posteriormente se colocaron en matraces Erlenmeyer donde fueron inoculadas con cada una de las cepas de *B. subtilis*, se dejaron en agitación durante una hora. Se sembraron en charolas de poliestireno de 200 cavidades, con sustrato estéril (turba). Transcurridos 28 días, se realizó una segunda inoculación colocando 10 ml de solución de cada tratamiento al suelo en camas de invernadero donde posteriormente las plántulas se trasplantaron. Los tratamientos evaluados fueron: a) *B. subtilis* cepa Mvza01 a una concentración de 1×10^6 UFC/ml; b) *B. subtilis* cepa Lvpa a una concentración de 1×10^6 UFC/ml y c) Testigo sin inocular.

Variables agronómicas en estudio. Se determinó la acumulación de materia seca del tallo, raíz y hoja de las plantas de cada tratamiento, a los 35 y 65 días después del trasplante, la recopilación de datos consistió en sacar dos plantas por repetición de cada tratamiento sin dañar la raíz, se separaron las hojas de cada una de las plantas y se midió el área foliar específica en cm^2 , con un integrador LiCor modelo LI 3100. La raíz tallo y hojas se lavaron y secaron a 70 °C y posteriormente se pesaron.

Rendimiento. Se determinó la cantidad de fruto (kg/planta) producida por planta. Los frutos se cosecharon al llegar al punto de rayado y se pesaron en una balanza analítica.

Diseño experimental y análisis de los datos. En el caso del ensayo 1 se evaluaron 39 tratamientos (Cuadro 1) con cuatro repeticiones en un diseño experimental completamente al azar, mientras que para el ensayo 2 se usó un diseño de bloques al azar con tres tratamientos y tres repeticiones por tratamiento, distribuidas en tres hileras separadas 70 cm; cada repetición estuvo constituida por doce plantas colocadas a una distancia de 25 cm entre plantas. Para analizar la heterogeneidad y diferenciación de datos estos se sometieron al análisis de varianza (ANOVA) y se estratificaron por

comparación de medias según (Tukey, $p = 0.05$) El análisis estadístico se llevó a cabo con el software SAS 9.0 (SAS Institute, Cary, USA).

Cuadro 1. Tratamientos evaluados sobre la germinación de esporas.

Tratamiento	Fracciones peptídicas	Tiempo colecta (min)	Tratamiento	Fracciones peptídicas	Tiempo colecta (min)	Tratamiento	Fracciones peptídicas	Tiempo colecta (min)
1	RQ/SA ^A	15.62	14	NRQS	48.58	27	RSS/A ^J	-----
2	RQ/SA	17.06	15	NRQS	49.58	28	RSA ^K	-----
3	RQ/SA	19.16	16	NRQSS/A ^C	18.64	29	RQA ^L	15.26
4	RQ/SA	20.64	17	NRQSS/A	24.79	30	RQA	16.57
5	RQ/SA	21.94	18	NRQS/SA	47.90	31	RQA	17.61
6	RQ/SA	24.73	19	RSS/A ^D	47.37	32	RQA	19.62
7	RQ/SA	26.26	20	RSS/A	48.94	33	RQA	25.95
8	RQ/SA	30.63	21	RSA ^E	47.34	34	RQA	46.48
9	RQ/SA	47.39	22	RSA	48.51	35	RQA	47.73
10	RQ/SA	49.98	23	NRQSS/A ^F	-----	36	RQA	48.75
11	NRQS ^B	45.67	24	NRQS ^G	-----	37	NRQS ^M	33.29
12	NRQS	46.67	25	RQS/A ^H	-----	38	NRQS	44.64
13	NRQS	47.55	26	RQA ^I	-----	39	Testigo	Agua

(A). Fracción Aniónica medio sin agitación separada por HPLC, (B). Fracción no retenida medio en agitación separada por HPLC, (C). Fracción no retenida medio sin agitación separada por HPLC, (D). Fracción Catiónica medio sin agitación separada por HPLC, (E). Fracción Catiónica medio en agitación separada por HPLC, (F). Fracción completa no retenida separada solo en columna C18 medio sin agitación, (G). Fracción no retenida separada solo en columna C18 medio en agitación, (H). Fracción Aniónica separada solo en columna C18 medio sin agitación, (I). Fracción Aniónica separada solo en columna C18 medio en agitación, (J). Fracción catiónica separada solo en columna C18 medio sin agitación, (K). Fracción Catiónica separada solo en columna C18 medio en agitación, (L). Fracción Aniónica en agitación separada por HPLC, (M). Fracción no retenida medio en agitación separada por HPLC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fraciones peptídicas separadas por HPLC. Las fracciones peptídicas de extractos libres de células de *B. subtilis* cepa Mza01 se obtuvieron a diferentes tiempos de retención (Cuadro 1). Se purificaron por HPLC fase reversa (columna VYDAC C18) 32 fracciones peptídicas en total, 8 fracciones de la fracción RQ aniónica del medio mantenido en agitación (Figura 3) y 10 del medio sin agitación (Figura 4); 7 fracciones peptídicas de la fracción NRQS/S del medio en agitación (Figura 1) y 3 del medio sin agitación (Figura 2); 2 fracciones peptídicas de la fracción RS catiónica del medio en agitación (Figura 5) y 2 del medio sin agitación (Figura 6), en comparación con 4 fracciones peptídicas encontradas por Jiménez (2004) en estudios realizados a la fracción catiónica RS.

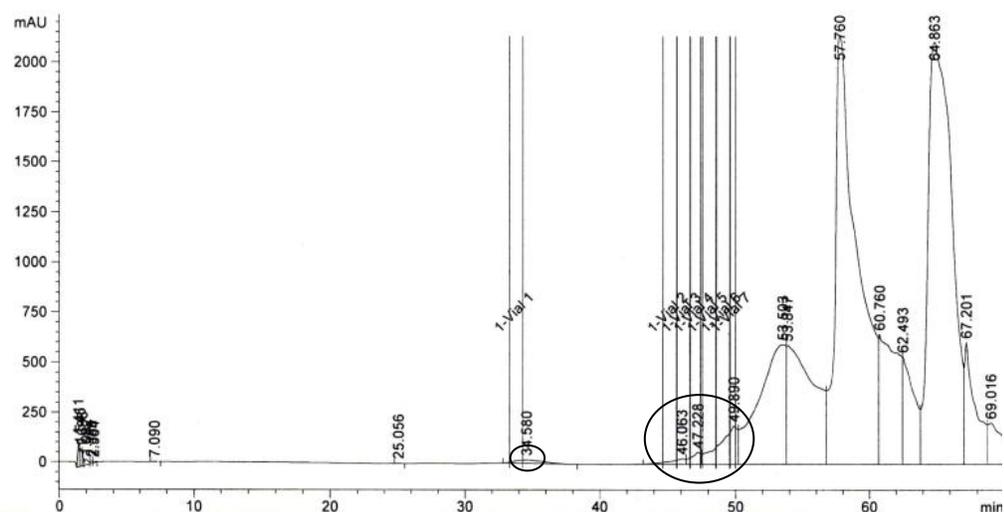


Figura 1. Perfil cromatográfico (RP HPLC) de la Fracción no retenidas en columnas C_{18} medio de cultivo mantenido en agitación (NRQS/A) del ELC de *Bacillus subtilis* cepa Mza01 con un volumen de inyección de 100 μ l y detección a 220 y 280 nm. (Las Fracciones colectadas se indican con círculos).

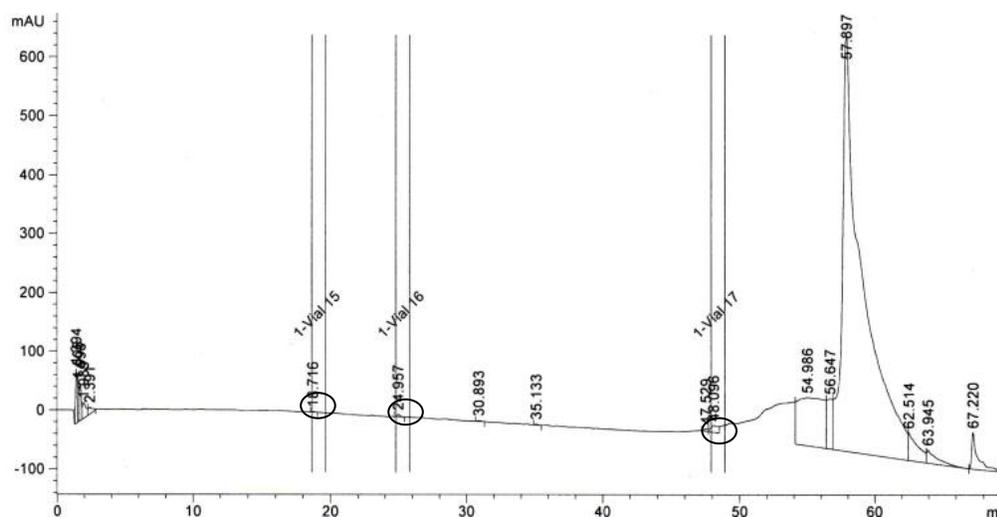
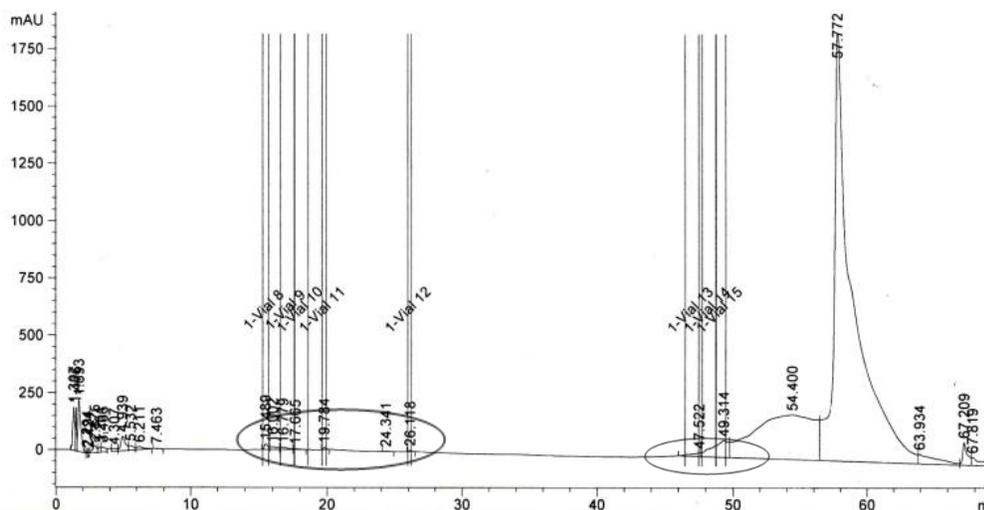


Figura 2. Perfil cromatográfico (RP HPLC) de la Fracción no retenidas en columnas C_{18} medio de cultivo mantenido en agitación (NRQS/SA) del ELC de *Bacillus subtilis* cepa Mza01 con un volumen de inyección de 100 μ l y detección a 220 y 280 nm. (Las Fracciones colectadas se indican con círculos).



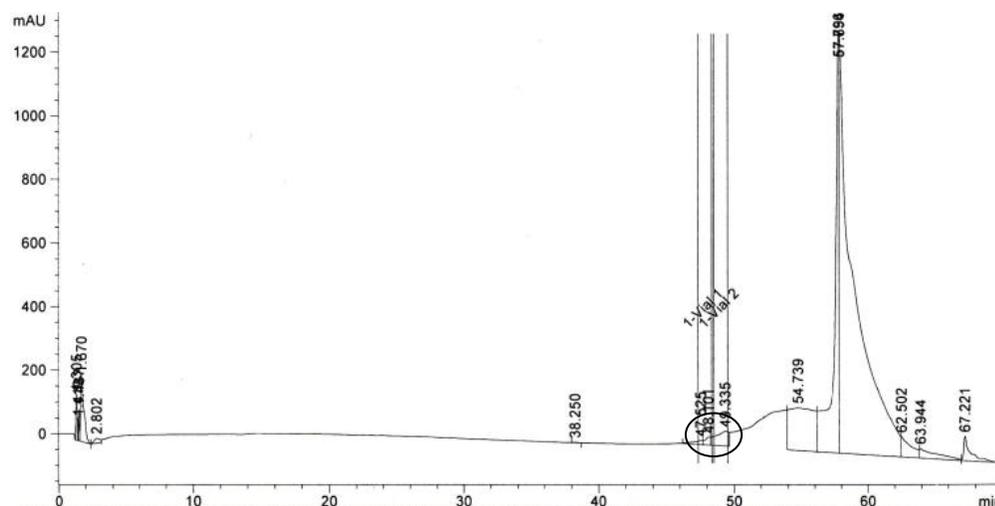


Figura 5. Perfil cromatográfico (RP HPLC) de la Fracción catiónica de la columnas C₁₈ medio de cultivo mantenido en agitación (FS/A) del ELC de *Bacillus subtilis* cepa Mza01 con un volumen de inyección de 100 μ l y detección a 220 y 280 nm. (Las Fracciones colectadas se indican con círculos).

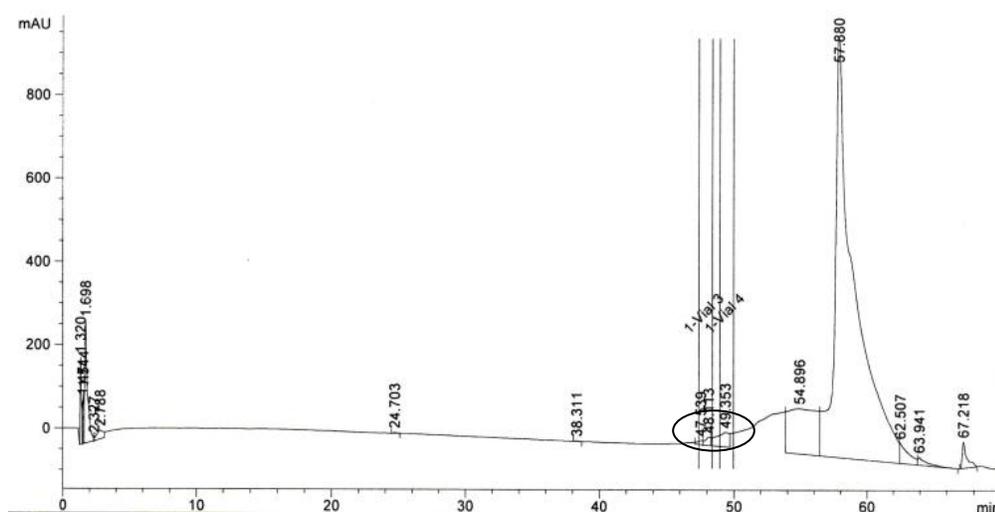


Figura 6. Perfil cromatográfico (RP HPLC) de la Fracción catiónica de la columnas C₁₈ medio de cultivo mantenido sin agitación (FS/SA) del ELC de *Bacillus subtilis* cepa Mza01 con un volumen de inyección de 100 μ l y detección a 220 y 280 nm. (Las Fracciones colectadas se indican con círculos).

Inhibición de la germinación de esporas. Las fracciones fueron evaluadas sobre la germinación de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, obteniéndose un porcentaje de inhibición de 0% a 13.5%, el tratamiento que ejerció un mayor efecto fue el 32 con la fracción aniónica del medio de cultivo en agitación, retenida a 19.62 minutos. Sin embargo en experimentos similares realizados por Jiménez (2004), al evaluar el efecto antagónico de las fracciones NRQS, RQ y RS de ELC de *B. subtilis* separadas por cromatografía de intercambio iónico, sobre *Rhizoctonia solani* AG3, las cuales no mostraron diferencia significativa con respecto al testigo, a diferencia de las evaluadas en este ensayo tratamientos 23, 24, 25, 26, 27 y 28 con lo que se deduce que las fracciones actúan de manera específica frente a distintos grupos de hongos fitopatógenos. Los tratamientos 2, 4, 6, 12, 33,36 y 39 (Figura 2) no tuvieron un efecto significativo de inhibición en la germinación de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, debido posiblemente a que las fracciones acumuladas durante el crecimiento de *B. subtilis* no alcanzaron niveles apropiados para inhibir la germinación de esporas del patógeno o que la actividad antagónica está asociada a la fracción celular del antagonista, es decir, se necesitan las células activas para que haya una supresión del patógeno tal como lo menciona Smith *et al.*, (1993). Otra posible explicación, es que la mayoría de los antibióticos y algunas toxinas no son termoestables; de modo que al esterilizar el filtrado con calor, se pudieron haber inactivado los metabolitos producidos durante el crecimiento de la bacteria tal y como menciona Dhingra, (1987).

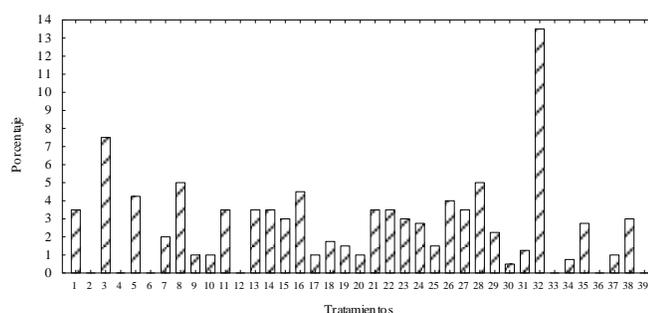


Figura 7. Efecto inhibitorio de metabolitos extracelulares sobre la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, a las 10 horas de incubación. Índices obtenidos por microscopía óptica.

Acumulación de materia seca en tallo, hoja y raíz; área foliar. Los resultados del análisis de la varianza del peso de materia seca de tallo, raíz y hoja (Cuadro 2) mostraron

diferencias significativas entre las plantas tratadas y el testigo en el primer muestreo ($P \leq 0.05$); El tratamiento inoculado con *B. subtilis* cepa Mza01 supero en un 21.8% al testigo en acumulación de materia seca en tallo, 35.0% en raíz, 44.5% en hoja y 107% en área foliar. Para el caso de la inoculación de *B. subtilis* cepa Lvpa donde solo supero en un 17.8% la acumulación de materia seca en hoja y en un 40.7% de área foliar. Algunos de los aspectos antes señalados coinciden con lo reportado por Bashan *et al.* (1996), quienes mencionan que la incorporación de bacterias benéficas al sistema de raíces de las plantas puede modificar diversas variables del follaje y raíz, mediante el incremento en la absorción de minerales por parte de la planta, dentro de los cuales se ha propuesto la absorción de NO_3^- , NH_4^+ , PO_4^{2-} , K^+ , Rb^+ y Fe_2^+ , mismos que son responsables de incrementar la materia seca total.

Cuadro 2. Influencia de la aplicación de *B. subtilis* en la acumulación de materia seca en tallo, raíz y hoja en plantas de tomate a los 35 días después del trasplante.

Tratamiento	MST	MSR	MSH	AF
Mza01	2.96a	2.43a	23.49a	5682.14a
Lvpa	2.28b	1.71a	19.15ab	3862.79b
Test.	2.43ab	1.80a	16.25ab	2743.77c

MST= materia seca en tallo, MSR= materia seca en raíz, MSH= materia seca en hoja, AF= área foliar cm^2 , Mza01= *B. subtilis* cepa Mvza01, Lvpa= *B. subtilis* cepa Lvpa, Test= testigo. Valores con la misma letra dentro de la misma columna son iguales estadísticamente (Tukey, $p < 0.05$).

En el segundo muestreo se observó que las plantas tratadas con *B. subtilis* cepa Lvpa acumularon un 6.2% de materia seca en raíz, 25.4% de materia seca en hoja, 11.0% de área foliar (Cuadro 3); los incrementos observados se atribuyen a que existe una absorción mayor de nutrientes minerales por parte de la planta, a través de un crecimiento mayor de las raíces inducido por los microorganismos benéficos introducidos, un ejemplo de ellos son las especies del genero *Bacillus* mediante la producción de algunas fitohormonas, como el ácido indolacético (Van Veen *et al.*, 1997). El tratamiento de inoculación con *B. subtilis* cepa Mza01 en plantas de tomate incremento de manera significativa la materia seca en raíz 62.8% que se manifestó directamente en mayor crecimiento de la parte aérea del cultivo; 51.4% en materia seca en hoja y 165.1% de área foliar. Este tipo de resultados han sido previamente consignados para varias especies de *Bacillus* (Raupach y Kloepper, 1998). Así,

Penterman *et al.* (2000) mencionan que *Bacillus firmus*, *B. globisporus* y *B. circulans* presentan niveles altos de actividad de la 1-amonociclopropano-1 ácido carboxílico desaminasa que estimula el crecimiento de la raíz en semillas de canola (*Brassica campestris* L.) y que posiblemente pudieron haber ejercido con la aplicación de *B. subtilis*.

Cuadro 3. Influencia de la aplicación de *B. subtilis* en la acumulación de materia seca en tallo, raíz, hoja y rendimiento en plantas de tomate.

Tratamiento	MST	MSR	MSH	AF	Rendimiento
Mza01	4.51a	15.16a	44.13a	12649.25a	1047.9a
Lvpa	3.37b	9.89b	36.54b	5299.84b	828.6b
Test.	4.34a	9.31b	29.13c	4770.71c	710.0b

MST= materia seca en tallo, MSR=materia seca en raíz, MSH=materia seca en hoja, AF área foliar cm², Mza01= *B. subtilis* cepa Mvza01, Lvpa= *B. subtilis* cepa Lvpa, Test = testigo. Valores con la misma letra dentro de la misma columna son iguales estadísticamente (Tukey, p < 0.05).

Rendimiento. El mayor rendimiento se obtuvo con la inoculación de la cepa Mvza01 de *B. subtilis* (Cuadro 3), superando con 47.5% al testigo, a diferencia del tratamiento con la cepa Lvpa, con 16.7% con respecto al testigo, estos resultados concuerdan con los reportados por Pereira *et al.* (1988) y Kloepper *et al.* (1991), quienes mencionaron que las bacterias promotoras de crecimiento, se caracterizan por incrementar el desarrollo radical, lo que repercute directamente en el rendimiento del cultivo, observación que se aprecia en el cultivo de tomate bajo estudio.

CONCLUSIONES

El extracto libre de células de *B. subtilis* Mza01 contiene fracciones peptídicas con capacidad de inhibir la germinación de esporas de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

B. subtilis pueden ser utilizada como biofertilizante ya que promueve el crecimiento de raíz y el área foliar de plantas inoculadas y ejerce un efecto positivo al incrementar el rendimiento de fruto en el cultivo de tomate.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) proyecto 106401, a la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN) y al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) por el apoyo técnico y económico para la realización de la presente investigación.

LITERATURA CITADA

- Bashan, Y., Holguin, G., Ferrera, C. 1996. Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos. *Azospirillum*. Terra 14:159-194.
- Butt, T. M., Harris, J. G. and Powell. K. A. 1999. Microbial biopesticides, the European scene. In Biopesticides. Use and delivery. Eds. F.R. Hill & J. J. Menn. Humana Press, NJ. 23-44p.
- Cai, G., Gale, I., Scheider, R., Kistler, H., Davis, R., Elias, K., and Miyao, E. 2003. Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. Phytopathology 93:1014-1022.
- Cowan, M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews. 12: 564 – 582.
- Dhingra, O. and Sinclair, J. 1987. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida, USA. 355p.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2011. Bases de datos de producción mundial y comercio internacional de Tomate.
- Hernández, A. 1998. Estudios fisiológicos con cepas de rizobacterias promisorias para la biofertilización del maíz. Cultivos Tropicales, 19:10-12.
- Jiménez D. 2004. Péptidos secretados por *Bacillus subtilis* que modifican la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Tesis. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politecnico Nacional. Guanajuato, México 84p.
- Jones, J., Jones, J., Stall, R., and Zitter, T. 1991. Compendium of Tomato Diseases, American Phytopathological Society, St. Paul, USA. 46 p.
- Klibansky M. y González L. 1996. Algunas experiencias en la aplicación de la Biotecnología en la producción de biofertilizantes en Cuba. Fronteras en

Biotecnología y Bioingeniería. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. Cuba. 143 - 150.

- Kloepper, J., Zablutowicz, R., Tipping, B. y Lifshitz, R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In *The Rhizosphere and Plant Growth*. D.L. Keister and P.B. Cregan ed. Kluwer academic Publ. Dordrecht 315-326 p.
- Moyne, A., Shelby R., Cleveland, T., Tuzun, S. 2001. Bacillomycin D: and inturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *J Appl Microbiol* 90:622-629.
- Penterman, J., Ghosh, S. and Tyler, J. 2000. Promotion of root elongation in Canola *Brassica campestris* seedlings by plant growth promoting soil bacteria. American Society of Plant Physiologists. *Plant Biology* (Abstract 254).
- Pereira, J., Cavalcante, V., Baldani J., Dobereiner J. 1988. Sorghum and rice inoculation with *Azospirillum* sp. y *Herbaspirillum seropedicae* in field. *Plant Soil* 110: 269-274.
- Raupach, G. and Kloepper, J. 1998. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88:1158- 1164.
- Sinclair, J. 1992. *Bacillus subtilis* as an agent for the biocontrol of plant diseases. *Sinclair Perspectives in plant pathology*, New Delhi 10005: 367-374.
- Smith R. 1992. Legume Inoculant Formulation and Application. *Can. J. Microbiol.* 38: 485-492.
- Statistical Analysis System Institute (SAS). 2002. SAS/STAT User's Guide, Software version 9.0. SAS Institute Inc. Cary, N.C. 27513. USA.
- Van Veen, J., Van Oberbeek, L. and Van Elsas, J. 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology Molecular Review* 61:121-135.
- Wilson, C., Solar, J., Ghaouth, A. and Wisniewski, M. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant disease* 81:204-210.
- Zuber, P., Nakano, M. M. and Marahieo, M. A. 1993. Peptide antibiotics en *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria, biochemistry, physiology and molecular genetics. A. L. Sonenshein Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 897-916 pp.

4. CONCLUSIONES GENERALES

- Los Extractos libres de células de *B. subtilis* cepa Mza01 de los medios de cultivo mantenidos en condiciones de agitación y sin agitación presentan fracciones peptídicas aniónica y catiónicas con capacidad de inhibir la germinación de esporas “*in vitro*” de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
- *Bacillus subtilis* promueven el crecimiento de raíz, y el área foliar de plantas de tomate y ejerce un efecto positivo al incrementar el rendimiento de fruto en el cultivo de tomate.

5. RESUMEN

Una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo de tomate es el marchitamiento vascular causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, debido a las grandes pérdidas en la producción de este cultivo. El control biológico de este patógeno a través del uso de *Bacillus subtilis* puede contribuir de manera substancial al desarrollo de una agricultura sustentable, disminuyendo el uso de productos químicos y contribuyendo al mejoramiento de los suelos, protección del medio ambiente y salud del hombre. Dado el potencial benéfico que presenta como inoculante microbiano a través de la producción de diferentes sustancias se planteó como objetivos determinar la capacidad promotora de crecimiento vegetal de *Bacillus subtilis* cepas Mza01 y cepas Lvpa en el cultivo de tomate variedad Floradade, separar y evaluar fracciones peptídicas de extractos libres de células (ELC) de *B. subtilis* cepa Mza01 sobre la germinación de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Para determinar la capacidad promotora de crecimiento, se estableció un sistema de cultivo en camas de invernadero en un diseño experimental de bloques al azar con tres tratamientos y tres repeticiones. Se determinó la acumulación de materia seca en tallos, hojas y raíces; asimismo se midió el área foliar y la producción total de fruto por planta. Los resultados mostraron que los tratamientos inoculados con *B. subtilis* cepas Mza01 y cepas Lvpa tuvieron significativamente mayor acumulación de materia seca en raíz y hojas, comparados con el tratamiento testigo ($P \leq 0.05$). El mayor rendimiento por planta se obtuvo al aplicar *B. subtilis* cepa Mza01 ($P \leq 0.05$). El ELC de *B. subtilis* se separó 32 fracciones peptídicas que fueron evaluadas sobre la germinación de esporas de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* por microscopía óptica en discos de Extracto de Malta Agar. El porcentaje de inhibición de la germinación de las esporas osciló de 0 a 13.5% con el ELC.

6. LITERATURA CITADA

- Aerts, A. M, Thevissen, K., Bresseleers, S. M., Sels, J., Wouters, P., Cammue, B. 2007. *Arabidopsis thaliana* Plants Expressing Human β -Defensin-2 are More Resistant to Fungal Attack: Functional Homology Between Plant and Human Defensins. *Plant Cell Rep.* 26 (8): 1391-1398.
- Agrios. 2005. *Pathology*. Fifth Edition. Elsevier Academic Press. 922p.
- Alippi A. y C. Mónico. 1994. Antagonismo *in vitro* de especies de *Bacillus* contra *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium solani*. Facultad de Agronomía, La Plata, Argentina 70: 91-95.
- Andreeva, I., Redkina, T. and Izmailov, S. 1993. The involvement of indoleacetic acid in the stimulation of Rhizobium-legume symbiosis by *Azospirillum brasilense*. *Russian J.Pl Phys.* 40: 901-906.
- Baker, R. and Griffin, G.J. 1995. Molecular strategies for biological control of fungal plant pathogens. In: *Novel Approaches to Integrated Pest Management*. Ed. Lewis Pub. Inc. Chelsea, M.I. 21: 9-17.
- Barber, S. 1995. *Soil nutrient bioavailability a mechanistic approach*. Willey and Sons, Inc. New York. 414 p.
- Barea, J., M. and P. Jeffries. 1995. Arbuscular mycorrhizas in sustainable soil-plant systems. Springer-Verlag. Heidelberg, Germany. 521-560 Pp.
- Berthelin, J., C. Leyval, F. Laheurte and P. De Giudici. 1991. Involvement of roots and rhizosphere microflora in the chemical weathering of soil minerals. ed. Atkinson, D. Blackwell Scientific Publications. Oxford, UK. 187-200 Pp.
- Bland. 1995. *Proc. Plant Growth Regulation Society America* 22:105-107.
- Brady, N., Weil, R. 2000. *Elements of the nature and properties of soil*. Prentice Hall, INC. New Jersey. 559 p.

- Brotz, G., Bierbaum, K., Leopold, P. E., Reynolds y Sahl, H. G. 1998. The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan synthesis by targeting lipid II. *Antimicrob Agents Chemother.*42:154-60.
- Brotz, H. M., Josten, I., Wiedemann, U., Schneider, F., Gotz, G., Bierbaum y Sahl, H. G. 1998. Role of lipid-bound peptidoglycan precursors in the formation of pores by nisin, epidermin and other lantibiotics. *Molecular Microbiology.* 30:317-27.
- Butt, T. M., Harris, J. G. and Powell. K. A. 1999. Microbial biopesticides, the European scene. In *Biopesticides. Use and delivery.* Eds. F.R. Hill & J. J. Menn. Humana Press, NJ. 23-44p.
- Carrillo, L. 2003. Microbiología agrícola. Capítulo 2.
<<http://www.unsa.edu.ar/matbib/micragri/micagricap2.pdf>search=%22mode%20e%20accion%20de%20antibioticos%20producidos%20por%20bacillus%20subt%20ilis%22 > (25 jun 2006).
- Cattelan A. J., Hartel P. G. Fuhrmann, J. J. 1990. Screening for Plant GrowthPromoting Rhizobacteria to Promote Early Soybean Growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 63:1670-1680
- Carsolio, C., Benhamou, N., Haran, S., Cortés, C., Gutierrez, A., Chet, I. and Herrera, A. 1999. Role of the *Trichoderma harzianum* endochitinase gene, ech 42 in mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology* 65 (3): 929-935.
- Cook, R.J. and Baker. K.F. 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens.* American Phytopathological Society, St. Paul, Minn., U.S.A. 539 pp.
- Corrales, G., Ligia, L., Ciro, G., Gelmy, L. 2010. Peptides with antimicrobial activity produced by isolated native microorganisms. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmacéutica17:181-190.
- Darrah, P. 1993. The rhizosphere and plant nutrition: a quantitative approach. *Plant and Soil* 155/156: 1-20
- Defreitas, J., Gupta, V. and Germida J. 1993. Influence of *Pseudomonas syringae* R25 and *P. Putida* R105 on the growth and N₂ fixation (acetylene reduction activity) of pea (*Pisum sativum* L.) And field bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biology Fertility Soils.* 16: 215-220.
- Díaz B. V. 1994. Evaluación del efecto fungicida y/o bactericida de extractos del árbol de cuachalalate (*Amphyterygium adstringens* S.) mediante antibiogramas y bioensayos in vitro. Memorias del XXI Congreso Nacional de Fitopatología. Cuernavaca, Morelos, México.45p.

- Dobereiner, J. y De-Polli, H., 1980. Diazotrophic rhizocoenosis. P 301-333. *En: Nitrogen fixation Proc. of phytochem Soc. Eur. Symp. No 18* Stewart, W.D.P. and J.R. Gallon (eds).Academic Press, London.
- Fiddaman, P. and Rossall, S. 1994. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. *Journal Applied Bacteriology* 76: 395-405.
- Foster, R.C. 1998. Microenvironments of soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*. 6: 189- 203.
- Garden, N. 1999. Trichopel, guard again soil borne diseases. <http://www.garden.manawatu.net.nz/tricho.htm>.
- Glick, B.R. 1995. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 41: 109-117.
- González B. M. 2000. Efecto de fungicidas o de *Bacillus subtilis* sobre la colonización radicular del jitomate (*Lycopersicon esculentum mill*) por hongos micorrícicos. Tesis de Licenciatura. Instituto Tecnológico de Celaya. Celaya, Gto., México. 57p.
- Gueldner, R. Reilly, C. Pusey, P. Costello, C. Arrendale, R. Cox, R. Himmelsbach, D. Crumley, G. And Cutler, H. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36: 366-370.
- Gueldner, R., Reilly, C., Pusey, P., Costello, C., Arrendale, R., Cox, R. Himmelsbach, D., Crumly, G. and Cutler, H. 1988. Isolation and identification of iturins as antifungal peptides in biological control of peach brown rot with *Bacillus subtilis*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36: 366-370.
- Gutiérrez, F.J., Acero, N., Lucas, J.A. y Probanza, A. 1996. The influence of native rhizobacteria on european alder [*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.] growth. II. Charaterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant and Soil*, 182: 67-74.
- Hancock R, Chapple D S. 1999. Peptide Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 43 (6): 1317 - 1323.
- Hiltner L. 1904. Uber neuerer erfahrungenger und problem auf em gebeit der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksinchtingung der grundungung und brache. *Arbeiten Deutscher Landwirtschafts Gesellschaft.* 98: 59-78.
- Hinsinger, P. 1999. How do plant roots acquire mineral nutrients Chemical processes involved in the rhizosphere. *Advances in Agronomy* 64: 225-265.

- Jiménez D. M. 2004. Péptidos secretados por *Bacillus subtilis* que modifican la arquitectura de la raíz de *Arabidopsis thaliana*. Tesis. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Guanajuato, México 84p.
- Jiménez, M., Ulacio, D., Perdomo, W. and Briceño, E. 2009. Micobiota y nematodos asociados con la rizósfera y raíz en el cultivo de ajo (*Allium sativum* L.) Bioagro 21(3): 209-216.
- Jones, D.L., Darrah, P. R., Kochian, L.V. 1994. Amino acid influx at the soil-root interface of *Zea mays* L. and its implications in the rhizosphere. Plant and Soil, 163:1-12.
- Kleijn, R.J., Liu F., Winden, W.A., Gulik, W.M., Ras, C., Heijnen, J.J. 2007. Cytosolic NADPH metabolism in penicillin-G producing and non-producing chemostat cultures of *Penicillium chrysogenum*. Metabolic Engineering 9: 112-123.
- Kloepper, J.W., Zablutowicz, R.M., Tipping, B. and Lifshitz, R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. In The Rhizosphere and Plant Growth. D.L. Keister and P.B. Cregan eds. Kluwer academic Publ. Dordrecht, 315-326 pp.
- Kloepper J.W. 1994. Plant growth-promoting rhizobacteria other systems. En: *Azospirillum/* plant associations. Ed. Y Okon. CRC Press. Boca Ratón. 111-118p.
- Kluepfel, D.A. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. Annual Review of Phytopathology 31: 441-472.
- Kloepper, J W 1993 Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents In: Metting. Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management., Marcel Dekker Inc, New York USA, 255-274 pp.
- Kokalis, B. N., Kloepper, J.W. and Reddy, M.S. 2006. Plant growth promoting Rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indigenous Rhizosphere microorganisms. Applied Soil Ecology 31: 91-100.
- Krupa, S.W. and Dommergues, Y.K. 1981. Ecology of root pathogens; 2da.ed. Elsevier scientific publishing company. EEUU.
- Kunioka, M. Biosynthesis of poly g-glutamic acid from Lglutamine, citric acid and ammonim sulfate in *Bacillus subtilis* IF03335. Appl Microbiol Biot. 1995 Dec; 44 (3-4): 501-506.
- Lahsen, H., Soler, A., Rey, M.J., de la Cruz, J., Monte, E., and Llobell, A. 2001. An antifungal Exo-1,3- Glucanase (AGN13.1) from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology 67:5833-5839.

- Lehmann J, Retz M, Harder J, Krams M, Kellner U, Hartmann J. 2002. Expression of Human β -Defensins 1 and 2 in Kidneys with Chronic Bacterial Infection. *BMC Infect Dis.* 2:1-10. <http://www.biomedcentral.com/1471-2334/2/20>.
- Lehrer RI, Ganz T. 2002. Defensins of Vertebrate Animals. *Current Opinion in Immunology* 14 (1): 96 - 102.
- Lemanceau, P., Bakker, P.A., De Kogel, W. J., Albouvette, C. and Schippers, B. 1993. Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo 47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianth.* *Applied and Environmental Microbiology*, 59:7582.
- Loon, L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *European Journal Plant Pathology* 119:243-254.
- Lynch, J., 1990, *The rhizosphere*, John Wiley and sons, Chichester, England, 458p.
- Marahiel, M., Nakano, M. and Zuber, P. 1993. Regulation of peptide antibiotic production in *Bacillus*. *Molecular Microbiology* 7(5) 6331-636.
- McAuliffe, R., Ross, P. y Hill C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *Microbiology Reviews.* 25:285-308.
- McKeen, C., Reilly, C. and Pusey, P. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 76:136-138.
- Moyne, A. L., Shelby R., Cleveland, T. E., Tuzun, S. 2001. Bacillomycin D: and inturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*. *Journal Applied Microbiology* 90:622-629.
- Olivares J. y Barea J. 1995. Fijación y movilización biológica de nutrientes. *Front. Ciencia Tecnología* 8: 42-44.
- Oppermann, F. B., Steinbuchel, A. 2002. Occurrence, Functions and Biosynthesis of Polyamides in Microorganisms and Biotechnological Production. *Naturwissenschaften.* 89 (1): 11-22.
- Park, J.H., Seok, S.H., Cho, S.A., Baek, M.W., Lee, H.Y., Kim, D.J., Cheng, M.J., Kim, S.D., Hong, U.P., y Park, J.H. 2005. Antimicrobial effect of lactic acid producing bacteria culture condensate mixture (LCCM) against *Salmonella enteritidis*. *International Journal of Food Microbiology*, 101:111-117.
- Piers KL, Brown MH, Hancock R. 1993. Recombinant DNA Procedures for Producing Small Antimicrobial Cationic Peptides in Bacteria. *Gene.* 134 (1): 7-13.

- Probanza A., Acero N., Ramos B. and Gutierrez Mañero F. 1997. Effects of european alder (*Alnus glutinosa* L. Gaertn) rhizobacteria on nodular metabolism and root development. *Plant Growth Regulation*. 22: 145-149.
- Roberts, D.P. and Lumnsden R.D. 1990. Effect of extracellular metabolites from *Gliocadium virens* on germination of sporangia and mycelial growth of *Pythium ultimum*. *Phytopathology* 80:461-465.
- Rodgers, P.B. 1989. Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for Agrochemichal and pharmaceutical product development. *Pesticide Science* 27: 155-164.
- Rodríguez-Romero A.S. 2003. Alternativas biológicas en cultivares de *Musa* frente a los principales patógenos de suelo en Canarias. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna, Tenerife. 299 pp.
- Ryan, P., Delhaize, E., Jones, D. 2001. Function and mechanism of organic anion exudation from plant roots. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology* 52: 527-560.
- Sahl, H. G. y Bierbaum, G. 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria. *Annual Review Microbiology*. 52:41-79.
- Sánchez, D., M. and Honrubia, M. 1994. Water relations and alleviation of drought stress in mycorrhizal plants. eds. Birkhäuser Verlag. Basel, Switzerland. 167-178 Pp.
- Santander C., Montealegre J. y Herrera R. 2003. Control biológico de *Rhizoctonia solani* en tomate en suelos previamente sometidos a solarización y bromuro de metilo. *Ciencia e Investigación Agraria* 30: 107- 112.
- Shoda, M. 2000. Bacterial Control of Plant Diseases. *Journal of Bioscience and Bioingeniery* 89:515-521.
- Sinclair, J. 1992. *Bacillus subtilis* as an agent for the biocontrol of plant diseases. *Sinclair Perspectives in plant pathology*, New Delhi 10005: 367-374.
- Slepecky, R. A., Hemphill, H. E. 1992. The Genus *Bacillus* Nonmedical. En *The Prokaryotes* 2a. Edición. Ed. Dworkin M, Schleifer KH y Stackebrandt, Springer Verlag, New York, EUA.
- Souto, G., Correa, O., Montecchia, M., Kerber, N., Pucheu, N., Bachur, M., García, A. 2004. Genetic and functional characterization of *Bacillus* sp. Strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin like compounds. *Journal of Applied Microbiology* 97:1247-1256.

- Statistical Analysis System Institute (SAS). 2002. SAS/STAT User's Guide, Software version 9.0. SAS Institute Inc. Cary, N.C. 27513. USA.
- Stein, T., Vater, J., Kruft, V., Otto, A., Wittmann, Liebold, B., Franke, P. 1996. The Multiple Carrier Model of Nonribosomal Peptide Biosynthesis at Modular Multienzymatic Templates. *Journal Biological Chemistry*. 271 (26): 15428-15435.
- Sumner, M.E. 1990. Crop responses to *Azospirillum* inoculation. *Adv. Soil Sci.*, 12: 53-168.
- Toro, M., Azcón R. y Herrera R. 1996. Effects on yield and nutrition of mycorrhizal and nodulated *Pueraria phaseoloides* exerted by P-solubilizing rhizobacteria. *Biology Fertility of Soils*. 21: 23-29.
- Vásquez R. y Zúñiga D. 2008. Efecto de diferentes inoculantes sobre la actividad microbiana en la rizósfera del cultivo de pallar (*Phaseolus lunatus* var. *Sieva*) en condiciones de campo. *Ecología Aplicada*. 2:1726-2216
- Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*. 255: 571-586.
- Weller, D.M. 1988. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria *Annual Review Phytopathology* 26: 379-407.
- Whipps, J. 2001. Microbial Interaction and Biocontrol in the Rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* 52:487-511.
- Yamanaka, K., Maruyama, C., Takagi, H., Hamano, Y., 2008. E- Poly-L-lysine. Diversity is Controlled by a Highly Unusual Nonribosomal Peptide Synthetase. *Nature Chemical Biology*. 4 (12): 766-772.
- Young, I.M. 1998. Biophysical interactions at the rootsoil interface: a review. *Journal of Agricultural Science* 130: 1-7.
- Zuber, P., Nakano, M. M. and Marahieo, M. A. 1993. Peptide antibiotics en *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria, biochemistry, physiology and molecular genetics. A. L. Sonenshein Ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 897-916 pp.

7. A N E X O

Cuadro 4. Propiedades de las resinas de intercambio iónico.

Propiedades	Resinas de intercambio iónico	
	Aniónico (Q)	Catiónico (S)
Tipo de soporte	Anión fuerte	Catión fuerte
Ligando funcional	-N+(CH ₃) ₃	-SO ₃
Capacidad de unión	400±75µeq/ml	170±75µeq/ml
Contra ión	Cl ⁻	Na ⁺
Tamaño de la partícula	50 µm	50µm
Tamaño del poro	1000 °A	1 000 A°
Tasa de flujo lineal máxima	3000 cm/h	3000 cm/h
Estabilidad química	≥ 48h	≥72h
1M HCl	≤ 24h	Excelente
1M NaOH (20°C)	Si	Si
Esterilización (121 °C/30 min)	1-14	1-14
Estabilidad de Ph	20% etanol	20% etanol
Agente antimicrobiano	1M Na	1M NaCl
Regeneración	Anión fuerte	Catión fuerte

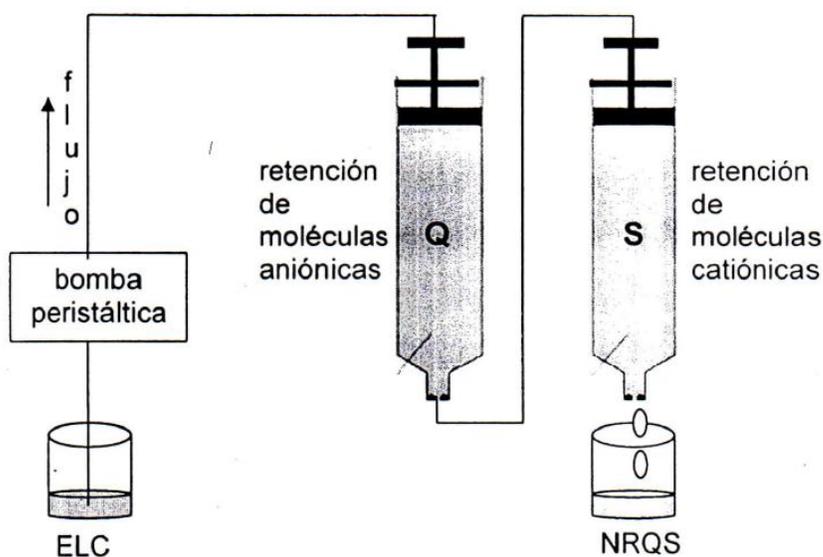
Lavado de las columnas de intercambio iónico.

Para lavar las columnas se preparó una solución de cloruro de potasio (KCl) 2 M, de cloruro de sodio 0.4 M + ácido acético 1 % + ácido fosfórico 1 %, una solución de ácido acético 1 % + ácido fosfórico 1 % y una solución del amortiguador TRIS al 0.01 M a un pH 8. Primeramente se pasó el KCl 2 M, posteriormente se pasó la solución de cloruro de sodio 0.4 M + ácido acético 1 % + ácido fosfórico 1 %, después se pasó la solución de ácido acético 1 % + ácido fosfórico 1 % de 2-3 volúmenes de cada una de las soluciones (aprox. 300 ml por columna). A continuación se lavaron las columnas con agua destilada estéril hasta que obtener un pH cercano a 5. Después se lavan con TRIS 0.01 M que tiene un pH de 8 (aprox. 200 ml por columna), se leyó el pH encontrándose entre 8-8.05, igualmente se midió la conductividad y está se encontró entre 0.21-0.26. Por lo que se dice que las columnas están equilibradas.

Cuadro 5. Agar Extracto de Malta.

Ingredientes	Cantidad (gr)
Extracto de Malta	30.0
Peptona harina de soya	3.0
Agar-Agar	1.5
pH final 5.6	

a) Separación del ELC



b) Separación de las moléculas

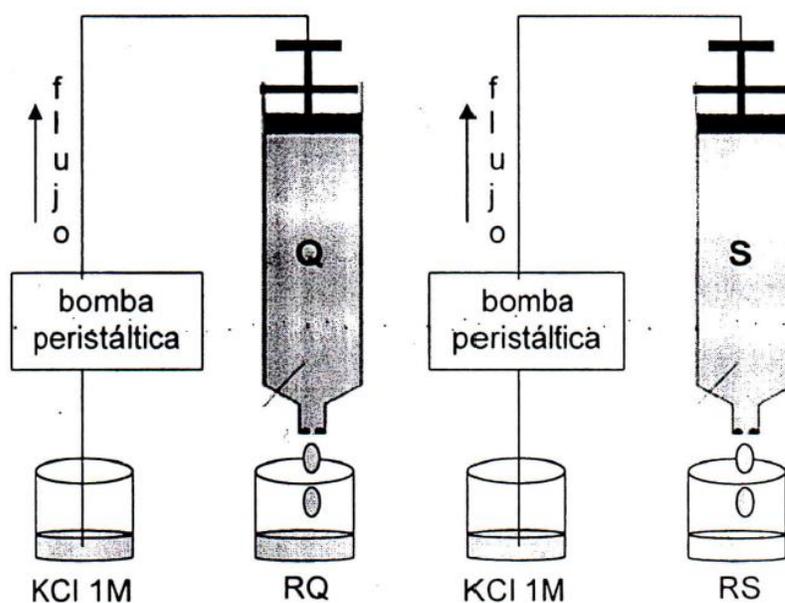


Figura 9. Fraccionamiento del extracto libre de células (ELC). (a) Separación del ELC ajustado a un pH 8, utilizando columnas empaquetadas con resinas de intercambio aniónico (Q) y catiónico (S) con flujo de elusión de 4ml/min. (b) Separación de las moléculas retenidas en cada una de las resinas de intercambio iónico, eluidas cada una de ellas con 50ml de KCl 1 M.

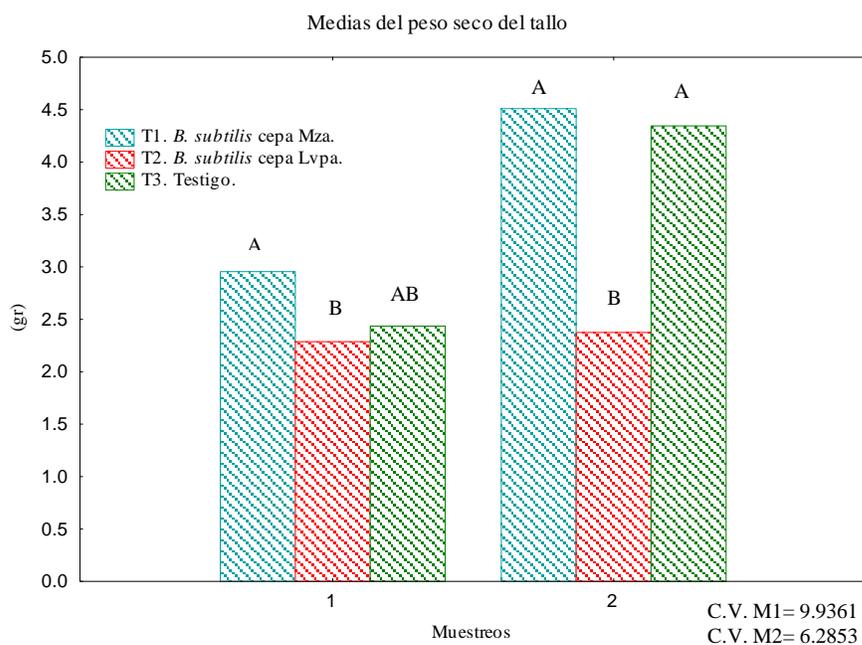


Figura 10. Efecto de *Bacillus subtilis* sobre acumulación de materia seca en tallo en plantas de tomate de acuerdo con los grupos de medias (Tukey $\alpha=0.05$).

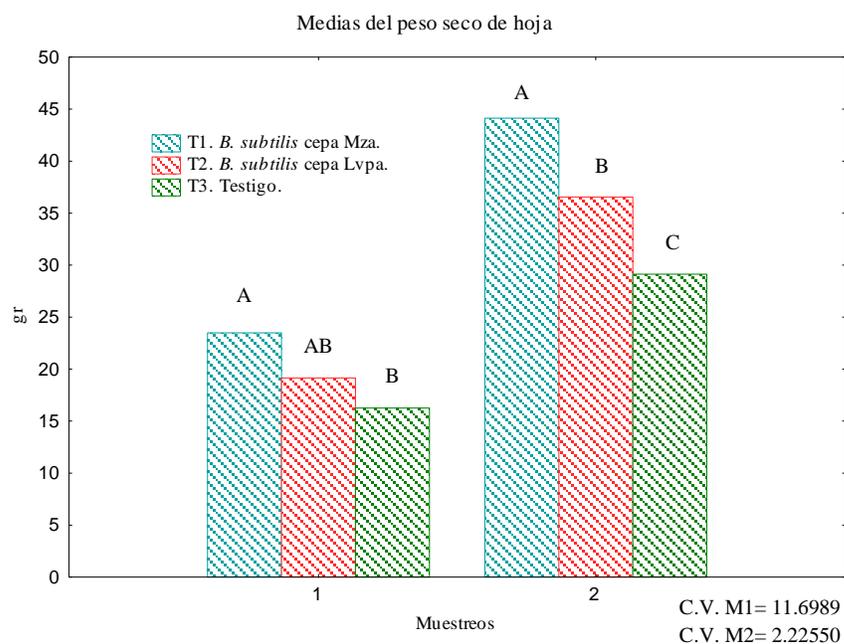


Figura 11. Efecto de *Bacillus subtilis* sobre la acumulación de materia seca en hoja de plantas de tomate de acuerdo con los grupos de medias (Tukey $\alpha=0.05$).

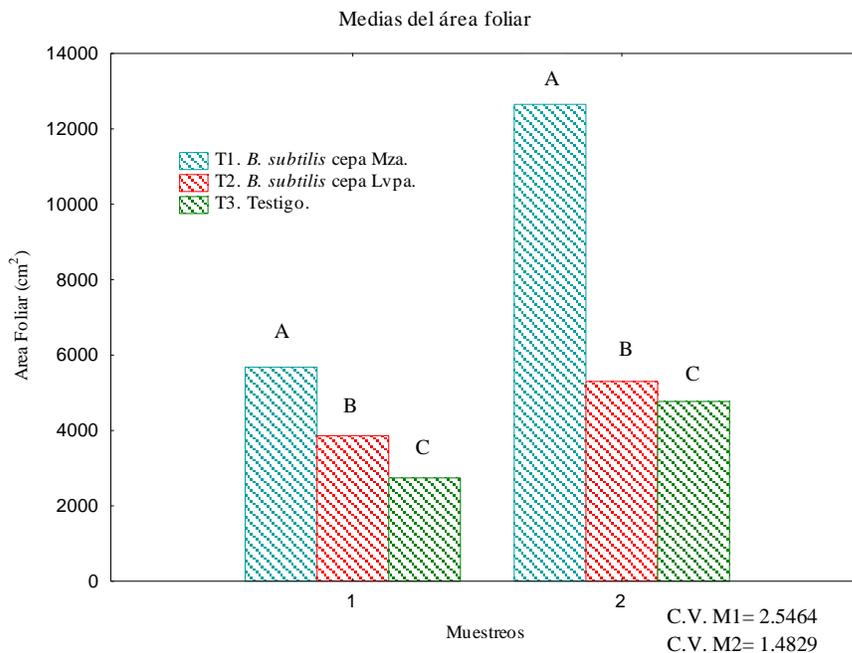


Figura 12. Efecto de *Bacillus subtilis* sobre hoja en plantas de tomate de acuerdo con los grupos de medias (Tukey $\alpha=0.05$).

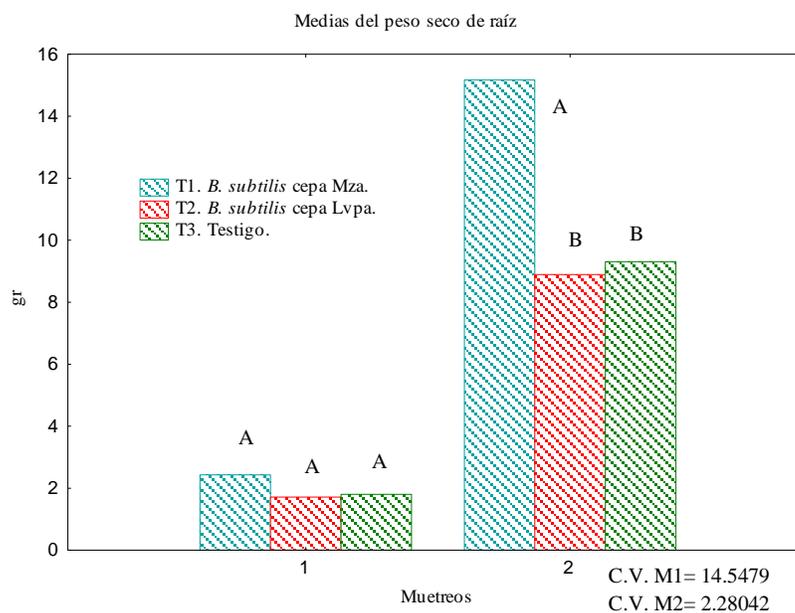


Figura 13. Efecto de *Bacillus subtilis* sobre acumulación de materia seca en raíz en plantas de tomate (Agrupamiento Tukey $\alpha=0.05$).

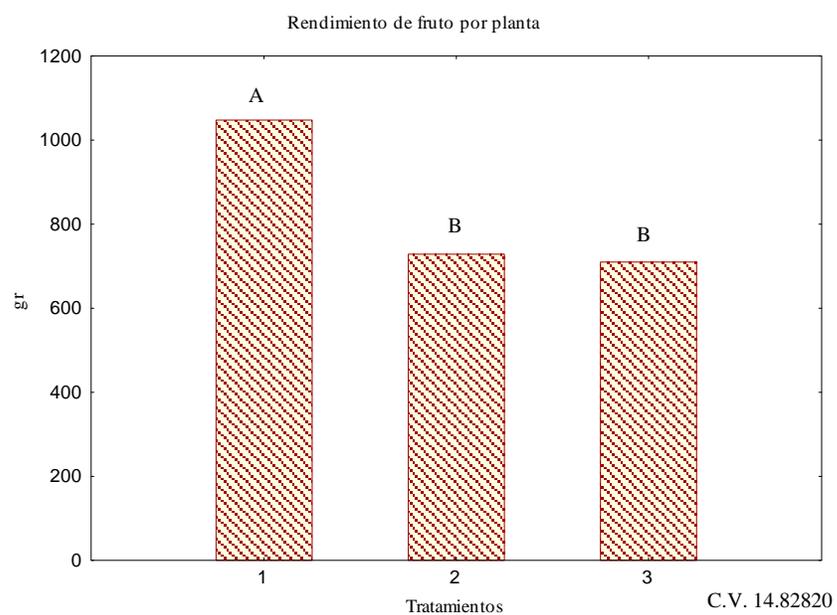


Figura 14. Efecto de *Bacillus subtilis* sobre rendimiento de fruto en plantas de tomate (Agrupamiento Tukey $\alpha=0.05$).