

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ÓPTIMO PARA EL  
DESARROLLO/REPRODUCCIÓN DE *BREVIBACILLUS BREVIS* Y  
EVALUACIÓN DEL CARÁCTER ANTAGONISTA SOBRE HONGOS  
FITOPATÓGENOS

Tesis

Que presenta ULDARICO BIGURRA QUINTERO

como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

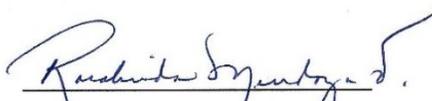
Saltillo, Coahuila

Junio 2019

SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ÓPTIMO PARA EL  
DESARROLLO/REPRODUCCIÓN DE *BREVIBACILLUS BREVIS* Y  
EVALUACIÓN DEL CARÁCTER ANTAGONISTA SOBRE HONGOS  
FITOPATÓGENOS

Tesis

Elaborada por ULDARICO BIGURRA QUINTERO como requisito parcial para  
obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA con la  
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



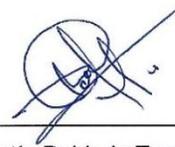
Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Asesor Principal



Dr. Armando Robledo Olivo

Asesor



Dr. Valentín Robledo Torres

Asesor



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez

Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente

Subdirector de Postgrado

UAAAN

Saltillo, Coahuila

Junio 2019

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente a Dios por darme vida, y el anhelo de superación, porque hoy contigo llego a esta meta que tenías planeada para mí y porque sin ti no soy nada.

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, mi segunda casa, mi Alma Mater y debido a ella me permite ser el profesionista que hoy en día soy.

A la Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal, por todo el apoyo dentro y fuera de los ámbitos escolares y de investigación, siempre sentí su apoyo incondicional aun y cuando los momentos fueron difíciles, cuando los resultados no eran los esperados y cuando los planes se tuvieron que modificar.

Al Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo por los invaluable conocimientos compartidos sin recelo, paciencia a la hora de explicar, tiempo para atenderme o contestar una llamada, útiles a lo largo de la realización de este proyecto.

Al Dr. Valentín Robledo Torres por apoyarme y siempre dar ánimos para seguir adelante con la investigación, siempre impulsando y retando a ensuciarse las botas en campo y agarrar color con el sol.

Al Dr. Armando Robledo Olivo a pesar de que las cosas no salían como pensábamos siempre me impulsaba a seguir avanzando, con esa buena actitud que lo caracteriza.

Al Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez porque a pesar de no haber trabajado tanto como hubiéramos pensado o querido, siempre estuvo interesado en la investigación y dispuesto a dar un consejo sobre la misma.

A la Ing. Martina De la Cruz Casillas, gracias por tu apoyo y sobre todo una amistad sincera, por la ayuda en la explicación de cómo utilizar los aparatos, saber dónde encontrar los reactivos y todo lo relacionado al laboratorio de cultivo de tejidos.

A Erika Solis Berlanga gracias por tu paciencia y sobre todo por el apoyo que me brindaste desde el inicio para el ingreso, hasta el final de este camino dentro de la maestría, no tengo como pagarte toda tu ayuda.

Al M.C. José Rafael Paredes Jácome que siempre estuvo en la mejor disposición en el correr y graficar los datos de este trabajo.

Al M.C. Marco Antonio Villegas Olguín por ayudarme en la parte de acomodo y formato de este documento.

A la M.C. Claudia Leticia Borjas Banda ya que debido a tu trabajo me permito continuar con esta investigación.

Al Ing. David Bladimir Hernández Méndez por tu apoyo, compromiso y dedicación dentro de la parte experimental de esta investigación.

## DEDICATORIAS

A mi Madre por estar siempre conmigo y apoyarme en cada paso que doy, sin importar si parece lógico o no. Gracias mami por enseñarme a ser consistente y trabajar por lo que quiero, por enseñarme a trabajar con respeto, puntualidad y honestidad en todo lo que hago, valores invaluable para mi vida.

A mi Padre, porque a través de tu ejemplo y apoyo hoy puedo alcanzar una meta más, agradezco tu respaldo en cualquier momento, sé que siempre cuento contigo, así como ahora tú sabes que cuentas conmigo para todo, siempre estaremos ahí para apoyarnos y de ahora en adelante trabajar juntos en lo que nos apasiona, que es el campo y para lo que amamos que es nuestra familia. Gracias por enseñarme lo que realmente es la vida.

A mis hermanas que siempre están para mí, sin importar lo lejos que pueda encontrarme y aun con los kilómetros siempre las sentía cerca de mi.

A mis hermanos Fernando y Decio por ser una parte importante en mi vida, ejemplo de responsabilidad, dedicación y trabajo, por todas esas platicas de lo que vendría y como siempre es un gusto estar juntos.

A mis sobrinos Fernando, Sofia, Fabio, Galia y Fabrizio, mis primeros hijos, que siempre serán mi orgullo y me alegrarán la vida, sin importar que tan difícil sea la situación. Ahora ya estará toda la tropa reunida ¡Gracias por siempre regalarme una sonrisa!

A mis compañeros de generación Moni, Tommy, Marco, Leonel y Gil, porque no solo fuimos eso, llegamos a tener una amistad sin igual y al día de hoy una hermandad, los muéganos nos consideraría por nuestra unión, apoyo, diversión, porque en momentos de fiesta estuvimos juntos pero también en aquellos momentos difíciles.

A todos mis viejos y nuevos amigos que están ahí, a pesar de la falta de tiempo, a pesar de la distancia y de las diferencias que pudimos llegar a tener.

A NMLF porque formas parte de mi vida y formaste parte de este camino dentro de la maestría, aún con la distancia, el llegar a la meta y alcanzar este logro también es pensando en ti.

## ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>iii</b>
<b>DEDICATORIAS</b>	<b>iv</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
Objetivo general	4
Objetivos específicos	4
Hipótesis	4
<b>RESVISIÓN DE LITERATURA</b>	<b>5</b>
Bacteria	5
Identificación bacteriana	5
Bacterias promotoras del crecimiento vegetal	6
Fijación biológica de nitrógeno	8
Síntesis de hormonas vegetales	10
Control biológico	11
Generalidades del genero <i>Bacillus spp.</i>	12
Generalidades de <i>Brevibacillus brevis (Bacillus brevis)</i>	13
Antecedentes del uso de <i>Brevibacillus</i>	13
Hongos fitopatógenos	16
Medios de cultivo	16
Medio nutritivo de Sábila y Melaza (SM)	17
Medio nutritivo Luria Bertani (LB)	21
Medio nutritivo Nitrogen Free broth (NFb)	21

Efecto del pH del medio de cultivo sobre el crecimiento	21
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
Ubicación del experimento	23
Tratamientos	23
Diseño experimental	23
Reactivación del microorganismo	24
Prueba de tinción de Gram	24
Preparación de medio de cultivo Sábila y Melaza (SM)	25
Preparación de medio de cultivo Luria Bertani (LB)	26
Preparación de medio de cultivo Nitrogen Free broth (NFb)	26
Inoculación e incubación del microorganismo	27
Diluciones	28
Pruebas de antagonismo	28
Variables evaluadas	29
<b>RESULTADOS</b>	<b>30</b>
Interacción Medio de Cultivo - pH	30
Interacción Medio de Cultivo - Tiempo de Incubación	31
Interacción pH - Tiempo de Incubación	31
Interacción Medio de Cultivo - pH - Tiempo de Incubación	32
Porcentaje de Inhibición	33
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>38</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>39</b>

## LISTA DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Criterios y ejemplos metodológicos aplicados a la identificación bacteriana.	6
<b>Tabla 2.</b> Componentes químicos de la planta Aloe vera.	18
<b>Tabla 3.</b> Composición de la melaza de caña de azúcar.	20
<b>Tabla 4.</b> Reactivos y cantidades necesarios para elaborar 1 L de medio de cultivo NFb.	27

---

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Imágenes de <i>B. brevis</i> obtenidas con un microscopio óptico a 40x (a) y 100x (b).	25
<b>Figura 2.</b> Interacción (doble), entre los factores medio de cultivo y pH en relación a la reproducción de <i>Brevibacillus brevis</i> (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	30
<b>Figura 3.</b> Interacción (doble), entre los factores pH y tiempo (horas), de incubación en relación a la reproducción de <i>Brevibacillus brevis</i> (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	31
<b>Figura 4.</b> Interacción (doble), entre los factores pH y tiempo (horas), de incubación en relación a la reproducción de <i>Brevibacillus brevis</i> (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	32
<b>Figura 5.</b> Interacción (triple), de los tres factores medio de cultivo, pH y tiempo (horas), de incubación en relación a la reproducción de <i>Brevibacillus brevis</i> (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	33
<b>Figura 6.</b> Efecto inhibitorio de <i>Brevibacillus brevis</i> como cepa antagonista sobre el crecimiento micelial de <i>Rhizoctonia solani</i> (Tukey, $p \leq 0.05$ ).	34

---

## RESUMEN

SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO ÓPTIMO PARA EL  
DESARROLLO/REPRODUCCIÓN DE *BREVIBACILLUS BREVIS* Y  
EVALUACIÓN DEL CARÁCTER ANTAGONISTA SOBRE HONGOS  
FITOPATÓGENOS

POR

ULDARICO BIGURRA QUINTERO

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. ROSALINDA MENDOZA VILLARREAL – ASESOR -

Saltillo, Coahuila

Junio 2019

El desarrollo de técnicas que promuevan la reproducción de las rizobacterias benéficas del suelo abre una gama de alternativas para su investigación, esto aunado a las capacidades antagónicas que se han encontrado en el género *Bacillus*. El desconocimiento de condiciones químicas y físicas de un medio óptimo para el desarrollo de la bacteria *Brevibacillus brevis* generó la presente investigación donde se evaluaron cinco medios de cultivo líquidos (SM 1%, SM 0.5%, SM 0.1%, LB y NFb), tres pH (6, 7 y 8) y dos tiempos de incubación (48 y 96 h). El objetivo del presente trabajo fue evaluar un medio que obtuviera los mejores resultados para la reproducción de la bacteria a nivel laboratorio. La metodología incluyó elaboración y estandarización de los medios de cultivo, reactivación de la cepa bacteriana, pruebas de tinción de Gram, inoculación en los medios, incubación para su reproducción. Posteriormente se realizaron diluciones para vaciado en placa y recuento de UFC mL<sup>-1</sup>. La triple interacción demostró que el medio SM 1% (Sábila y Melaza), con pH 7 y 48 h obtuvo los mejores resultados, teniendo mayor número de UFC mL<sup>-1</sup> comparado a los otros medios y condiciones. Concluyendo que la bacteria encontró condiciones óptimas para su desarrollo en el medio SM 1%, pH 7 y a 48 h, esto por la cantidad de unidades cuantificadas en la dilución 10<sup>11</sup> fue de 15.38 UFC mL<sup>-1</sup>, superando a los otros medios, además la velocidad de adaptación de la cepa bacteriana en este medio y condiciones.

**Palabras clave:** *Bacillus*, melaza, rizobacterias, sábila, sustratos.

**ABSTRACT**

SELECTION OF OPTIMAL CULTURE MEDIUM FOR THE  
DEVELOPMENT/REPRODUCTION OF *BREVIBACILLUS BREVIS* AND  
EVALUATION OF THE ANTAGONIST CHARACTER ON  
PHYTOPATHOGENIC FUNGI

BY

ULDARICO BIGURRA QUINTERO

MASTER OF SCIENCE IN HORTICULTURE  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. ROSALINDA MENDOZA VILLARREAL –ADVISOR–

Saltillo, Coahuila

June 2019

The development of techniques that promote the reproduction of the beneficial rhizobacteria of the soil opens a range of alternatives for their research, this added to the antagonistic capacities that have been found in the genus *Bacillus*. The ignorance of chemical and physical conditions of an optimal medium for the development of the *Brevibacillus brevis* bacteria generated the present investigation where five liquid culture media were evaluated (SM 1%, SM 0.5%, SM 0.1%, LB and NFb), three pH (6, 7 and 8) and two incubation times (48 and 96 h). The objective of the present work was to evaluate a medium that obtained the best results for the reproduction of the bacterium at laboratory level. The methodology included elaboration and standardization of culture media, reactivation of the bacterial strain, Gram stain tests, media inoculation, incubation for reproduction. Subsequently dilutions were made for plaque casting and UFC mL<sup>-1</sup> count. The triple interaction showed that the SM 1% medium (Aloe and Molasses), with pH 7 and 48 h obtained the best results, having a higher number of CFU mL<sup>-1</sup> compared to the other media and conditions. Concluding that the bacterium found optimal conditions for its development in the medium SM 1%, pH 7 and 48 h, due to the number of units quantified in the 10<sup>11</sup> dilution was 15.38 CFU mL<sup>-1</sup>, surpassing the other means, besides the velocity of adaptation of the bacterial strain in this medium and conditions.

**Key words:** Aloe, *Bacillus*, molasses, rhizobacteria, substrates.

## INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos procariotas que se clasifican según su forma, temperatura y pH en el que se desarrollan, según la estructura de su pared y por su requerimiento de oxígeno (Mollinedo y Gonzales, 2014), pero además, existen bacterias importantes como agentes de control biológico por su efecto antagónico frente a otros microorganismos (Földes *et al.*, 2000). Las bacterias Gram positivas que forman endosporas se agrupan en el género *Bacillus*, estas se encuentran distribuidas en diversos hábitats tanto marinos como terrestres y sus especies están asociadas a plantas, a estas se les conoce como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (Chen *et al.*, 2006). El término rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, por sus siglas en inglés PGPR (plant growth promoting rhizobacteria), propuesto para bacterias que habitan en las raíces de las plantas y que ejercen un efecto positivo sobre los cultivos (Kloepper, 1978, Hernández *et al.*, 2006, Pedraza *et al.*, 2010). En últimos años la utilización de este tipo de bacterias ha tenido una fuerte demanda, ya que ésta nueva tecnología promete mejorar la productividad de los sistemas agropecuarios a largo plazo (Naiman *et al.*, 2009, Cassán *et al.*, 2016).

Como alternativa sustentable y aprovechando las capacidades que presentan algunos microorganismos como las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, surge la formulación de biofertilizantes comerciales. Para formularlos, se utilizan microorganismos inocuos y se requiere de un cuidadoso manejo para no menguar su efectividad. En muchos países en desarrollo no hay industrias de inoculantes, lo cual hace aún más difícil su popularización. Además, en muchas áreas rurales hay una renuencia básica a usar bacterias y hongos como microorganismos benéficos, ya que, en estas culturas, los microbios están asociados con enfermedades humanas y de los animales (Bashan *et al.*, 1996).

Las diversas especies del género *Bacillus* se utilizan para la producción de antibióticos, enzimas, la solubilización de fosfatos y fijación biológica del nitrógeno, lo que ha provocado el interés por conocer más sobre dicho género

(Ooi *et al.*, 2008). El estudio de estas bacterias permitirá su utilización en diversos rubros, principalmente en el área agrícola (Tejera *et al.*, 2011).

La bacteria *Brevibacillus brevis* se clasificó de acuerdo a su genotipo y filogenética (Goto *et al.*, 2004), siendo un grupo importante de bacterias que fungen como agentes de control biológico, presentando antagonismo frente a otros microorganismos ya que produce sustancias antimicrobianas y antifúngicas, así como también una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal, debido a la producción de ácido indolacético (AIA), hormona utilizada para el desarrollo radical, vegetativo y producción de frutos (Reinoso-Pozo *et al.*, 2007, Reinoso-Pozo *et al.*, 2012, Chalé-Carrillo *et al.*, 2016). En anteriores estudios *Brevibacillus brevis* se utilizó para control del hongo *Botrytis cinérea* (Edwards y Seddon, 2001). Es importante señalar que los medios de cultivo son sustancias en las cuales el desarrollo de microorganismos es posible dentro del laboratorio; debido a que les brinda de manera artificial las condiciones necesarias para su crecimiento (Negroni, 2009). Los elementos que se requieren para el crecimiento de una bacteria son principalmente C, H, O, N, P y K, el S, Ca y Mg en una proporción menor de Fe, Mn, Zn, Cu y Mo en mínimas cantidades (Pelczar *et al.*, 2010).

Los medios que actualmente se utilizan para el desarrollo de microorganismos, son de costos elevados por ello hay la búsqueda de medios de bajo costo adecuados para la reproducción de *Brevibacillus*, la sábila (*Aloe vera*) compuesta químicamente por más de 200 sustancias biológicamente activas puede ser una alternativa (Zari y Zari, 2015). Se constituye por una mezcla compleja de compuestos como lo son vitaminas, minerales, carbohidratos, enzimas, aminoácidos, lípidos y compuestos orgánicos; que permiten cumplir las funciones vitales de algunos microorganismos (Domínguez-Fernández *et al.*, 2012).

La melaza es un líquido viscoso de color oscuro, alto en contenido de azúcares (35%), que es obtenido de la refinación de la sacarosa que se extrae de la caña de azúcar. Entre los azúcares que contiene se encuentra la sacarosa, glucosa, fructosa, rafinosa, los cuales son fermentables, aunque

también contiene sustancias no fermentables (Aguilar- Zárata *et al.*, 2012). La melaza ha sido utilizada para el cultivo de bacterias ácido lácticas a nivel industrial como miel o melaza blackstrap, también contiene melanoidinas a base de nitrógeno, derivados de la condensación del azúcar y aminocompuestos (Hoing 1974, Swan y Karalazos, 1990). Esto le confiere a esta sustancia características favorables para su utilización como un medio viable en el desarrollo de bacterias.

El medio nutritivo Luria Bertani (LB) ha sido ampliamente utilizado por bacteriólogos ya que permite un rápido crecimiento y rendimientos altos de desarrollo para distintas especies bacterianas. El medio contiene: 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl en 1 litro de agua destilada. La peptona utilizada se extrae de la digestión pancreática de caseína de la leche de vaca, y el extracto de levadura de una digestión de *Saccharomyces cerevisiae*. El caldo Luria-Bertani deshidratado con la composición anterior se llama caldo LB, Miller; y con 5 g L<sup>-1</sup> de NaCl se le llama caldo LB, Lennox (Sezonov *et al.*, 2007).

Nitrogen Free broth (NFb) es un medio selectivo carente de nitrógeno, comúnmente utilizado para identificar y aislar bacterias con capacidad de fijar nitrógeno (Mantilla-Paredes *et al.*, 2009). El aislamiento de los microorganismos del género *Azospirillum* es realizado con medios libres de nitrógeno, como es el caso del medio NFb, en el cual dependiendo de la escala de pH se pueden aislar diversas especies, además este medio por su carácter selectivo tiene la ventaja de reducir la contaminación con otro tipo de microorganismo (Cárdenas *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta que los factores como pH y la concentración del sustrato, afectan directamente en los patrones de crecimiento y formación de productos asociados con el metabolismo del microorganismo (Ossa *et al.*, 2010). Por ello en el presente trabajo, se evaluaron los factores fisicoquímicos del sustrato para el óptimo desarrollo y reproducción *in vitro* de *Brevibacillus brevis*, de esta manera, eficientar tiempo e insumos en la preparación de medios, además evaluar el potencial antagonista de dicha bacteria, sobre el desarrollo de

hongos fitopatógenos.

### **Objetivo general**

Obtener un medio óptimo para el desarrollo de la bacteria *Brevibacillus brevis* y evaluar su actividad antifúngica sobre *Rhizoctonia solani in vitro*.

### **Objetivos específicos**

- Seleccionar el medio que permita la óptima reproducción y desarrollo de *Brevibacillus brevis*.
- Evaluar el control inhibitorio de *B. brevis* sobre *R. solani* y *F. oxysporum in vitro*.
- Determinar la concentración que ejerce mayor efecto para el control de *R. Solani* y *F. oxysporum*.

### **Hipótesis**

- El medio propuesto en esta investigación tendrá resultados favorables en cuantificación de UFC mL<sup>-1</sup>
- Al menos una concentración de *Brevibacillus* tendrá control sobre *Rhizoctonia* y *Fusarium*.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### **Bacteria**

Las bacterias poseen un tamaño medio que oscila entre 2 y 10  $\mu\text{m}$ , son células procariotas que no presentan núcleo y poseen un solo cromosoma. Reciben su nombre según su forma, de esta manera si tienen forma alargada y cilíndrica serán denominados como bacilos, si tienen forma redondeada se denominarán cocos, los de aspecto helicoidal serán los espirilos, y los cortos y curvados con forma de coma se denominarán vibrios (Prats, 2006). Las bacterias se subclasifican en Gram negativas (-) y Gram positivas (+); las Gram (-) poseen en su pared celular una sola capa de peptidoglucanos a diferencia de las Gram (+) que presentan varias capas. En cuanto a su nutrición, la mayoría de las bacterias son heterótrofas, otras, en menor cantidad, son autótrofas, saprofitas o simbioses (Vargas y Villazante, 2014).

### **Identificación Bacteriana**

La taxonomía bacteriana tiene como objetivo la construcción de sistemas que permiten clasificar a las bacterias. Dentro de la clasificación taxonómica, las categorías y definiciones más utilizadas son familia (un grupo de géneros relacionados entre sí), género (un grupo de especies relacionadas entre sí), especie (un grupo de cepas relacionadas entre sí), tipo (grupos de cepas interrelacionados dentro de las especies; por ejemplo, biotipo, serotipo) y cepa (aislamiento concreto de una especie en particular) (López *et al.*, 2015). La taxonomía bacteriana convencional permite la identificación de géneros y especies mediante la aplicación de diversos criterios basados en las características fenotípicas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Criterios y ejemplos metodológicos aplicados a la identificación bacteriana.

Criterio	Metodología de ejemplo
Observación Macroscópica	Observación e inspección de colonias: disposición, tamaños, textura, formas, pigmentos, etc.
Observación Microscópica	Tinciones: formas, agrupación, esporas, capsula, flagelos, etc.
Metabolismo	Bacterias bioquímicas: uso de sustratos (oxidación/fermentación), producción de metabolitos secundarios, etc.
Otras Propiedades	Resistencia a antibióticos: antibiograma y antibiotipos, ribotipos, fagotipos, estudio de las concentraciones mínimas inhibitorias, estudio de sinergias o antagonismos, etc.

La ausencia de concordancia entre las características observables se han impuesto a los métodos genotípicos de identificación bacteriana como procedimientos complementarios o alternativos, la cual consiste en secuenciar el genoma del microorganismo utilizando genes como dianas moleculares para los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos géneros y especies bacterianas que constituye el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y, en numerosas situaciones el marcador suficiente para realizar una identificación más precisa (Bou *et al.*, 2011).

### **Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal**

El papel de los microorganismos en el crecimiento vegetal, la administración de los nutrientes y el control biológico han sido ampliamente estudiados, y se encuentran bien sustentados. Estos microorganismos benéficos, colonizan la rizosfera y endorizosfera de las plantas y promueven el crecimiento vegetal mediante diversos mecanismos de modo directo e indirecto (Grover *et al.*, 2011).

En particular los microorganismos denominados como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), comprenden un grupo que es benéfico para las plantas teniendo la capacidad de colonizar la superficie de la raíz, la rizosfera y filósfera, así como tejidos internos de las plantas (Kloepper *et al.*, 1989).

Estas bacterias colonizan la rizosfera de muchas especies de plantas y muestran efectos benéficos, como incrementar el crecimiento vegetal y reducir la susceptibilidad a enfermedades causadas por hongos patogénicos, bacterias virus y nematodos (Kloepper *et al.*, 2004).

Muchos estudios se han enfocado en el uso de microorganismos para cambiar la zona de la rizosfera en el suelo, aumentando con esto la disponibilidad de macro y micronutrientes. Las BPCV regulan el crecimiento de la planta, al aumentar la síntesis de hormonas vegetales y la capacidad de asimilar los nutrientes minerales en el suelo, así como disminuyendo la susceptibilidad de la planta a enfermedades (Yang *et al.*, 2009).

Estos microorganismos promueven el crecimiento vegetal a través de diversos mecanismos, incluyendo entre otros la fijación atmosférica de nitrógeno, producción de auxinas, además de otras fitohormonas, solubilización de fósforo, producción de sideróforos y ACC (1-aminocycloporpano-1-ácido carboxílico) síntesis de aminosasa (Glick, 2012).

Los géneros de bacterias más representativos son los pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter* y *Erwinia* (Kalitkiewicz y Kępczyńska, 2008).

Además de promover el crecimiento vegetal, estas bacterias promueven el desarrollo de las raíces, modificando la estructura de estas mediante la producción de fitohormonas como el ácido indolacético (Mantelin y Touraine, 2004), incrementando la superficie de raíz y aumentando el número de raíces apicales. Esta estimulación en las raíces puede significar una mayor defensa de las plantas contra diversos patógenos. Al tener mayor superficie de contacto y mayor cantidad de raíces, se aumentan los sitios de toma de nutrientes, este es uno de los mecanismos que las bacterias utilizan para incrementar la toma de nutrientes al estimular el desarrollo de la raíz (Kloepper *et al.*, 2007).

La asociación entre plantas y estas BPCV puede ser altamente benéfico, especialmente en suelos con condiciones de baja fertilidad (Carvalho *et al.*, 2013; Hungria *et al.*, 2010). Las bacterias promotoras actúan beneficiando a las plantas mediante una serie de mecanismos que pueden trabajar de manera simultánea o trabajar desencadenados en un sistema de cascada, se considera que en partes o en cascada un mecanismo estimula a otro causando un mayor crecimiento, ejemplo de esto son las relaciones vistas entre la producción de fitohormonas, óxido nítrico, la actividad de las membranas y la proliferación de las raíces. Además, la promoción del crecimiento puede ser también una combinación de mecanismos no relacionados que operan bajo alguna condición causada por el ambiente o por el manejo agronómico del cultivo, lo cual causa en la planta necesidades específicas (Bashan y De-Bashan, 2010).

### **Fijación Biológica de Nitrógeno**

Como un constituyente de todas las biomoléculas el nitrógeno ( $N_2$ ) es esencial para todos los organismos vivos, incluyendo las plantas. Existe un grupo de organismos capaces de reducir  $N_2$  a  $NH_4$ , desempeñando un papel fundamental en la biosfera, estos organismos son conocidos como diazotróficos (Kavadia *et al.*, 2008).

La fijación biológica de nitrógeno es de hecho, una actividad única, dentro de la cual, una población específica de bacterias están involucradas, y que es controlada y restringida por muchos factores biológicos y fisicoquímicos (Kavadia *et al.*, 2008).

El crecimiento de estas bacterias depende de la abundancia de recursos energéticos en el medio de crecimiento. En los ecosistemas naturales la baja habilidad de asimilación de carbono es crítica para la supervivencia y crecimiento de microorganismos, especialmente para los fijadores de nitrógeno, importante mencionar que la actividad de fijación de nitrógeno requiere de grandes cantidades de energía, hablamos de 20 a 30 moléculas de ATP por mol de  $N_2$  reducido a  $NH_3$  (Klucas, 1991).

Esta fijación es mediada por el complejo nitrogenasa, el cual se encuentra presente en los organismos fijadores antes mencionados, y que son capaces de catalizar la conversión del  $N_2$  a  $NH_4$  mediante la reacción general:



Esta requiere grandes cantidades de poder reductor y energía (ATP) y una reducción obligada de protones (Kavadia *et al.*, 2008).

El primer producto de la reacción de fijación es  $NH_3$  (amoníaco), el cual es rápidamente protonado, formándose  $NH_4^+$ , lo cual es favorecido por el pK (9,25) de la reacción, de tal manera que amonio es la especie predominante a los pHs fisiológicos y la que toma parte en las reacciones de asimilación (Kavadia *et al.*, 2008).

La actividad de este complejo enzimático puede verse disminuida por la presencia de oxígeno, de tal manera que los organismos fijadores poseen mecanismos que les permiten mantener bajas concentraciones de éste, para mantener a esta enzima funcionando (Ureta y Nordlund, 2002).

Por tales motivos las bacterias aeróbicas utilizan dos mecanismos de protección de la nitrogenasa: la protección respiratoria, donde se produce una elevada tasa respiratoria a expensas de un alto consumo de carbono y energía, manteniendo así una concentración intracelular de oxígeno baja; y la protección conformacional, en la cual la nitrogenasa cambia su disposición a una forma reversible inactiva (Robson y Postgate, 1980).

Por otro lado, está demostrado que el nitrato de amonio inhibe la actividad del complejo nitrogenasa (responsable de la reducción molecular de nitrógeno a amonio) hablando de la actividad transcripcional, así como en la actividad enzimática, lo que puede indicar que en condiciones de restricción del mismo, el complejo debería de funcionar adecuadamente (Steenhoudt y Vandereyden, 2000).

### **Síntesis de Hormonas Vegetales**

La síntesis de hormonas de crecimiento *i. e.* ácido indolacético (IAA), ácido giberélico (GA), citoquininas y etileno, aunado a la producción de sideróforos, son las características que mejoran el crecimiento de los cultivos (Meena *et al.*, 2015; Verma *et al.*, 2014).

Las BPCV pueden inducir una amplia gama de efectos como la adquisición de producción de fósforo, prolina y ácido indolacético (IAA) que juega un rol importante en las respuestas que una bacteria muestra a condiciones de estrés (Dobra *et al.*, 2010).

Además, el IAA y sideróforos producidos por estas bacterias incrementan, ya sea directa o indirectamente la biomasa de los cultivos (Zahid *et al.*, 2015). Las plantas responden a los compuestos que son producidos por las bacterias mediante la activación del sistema de defensa adquirido, propio de su mecanismo de defensa, en la cual se emplea toda una cascada de defensa, dentro de la cual el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno son parte de la señalización de esta. Por lo tanto, estas hormonas deben de ser parte de los efectos de estimulación para crecimiento de la planta. Sin embargo, no se conoce totalmente el proceso en el cual intervienen estas hormonas y el rol que juegan en los cultivos al ser inoculados con bacterias benéficas (Métraux, 2001).

La producción de fitohormonas denominadas auxinas, citoquininas y giberelinas, son las más estudiadas, como parte del mecanismo de promoción de crecimiento por parte de las bacterias, específicamente las que trabajan de manera extracelular, siendo las auxinas las que más trabajos de investigación han generado (Garcia *et al.*, 2001).

Las auxinas están bien caracterizadas como una hormona sintetizada en las plantas, siendo el 3 ácido indolacético, el más conocido para estimular respuestas a corto y largo plazo en las plantas (Hagen, 1990).

El ácido indolacético que es producido por la bacteria, puede mejorar los efectos benéficos otorgados por la promoción de síntesis de las auxinas y con

esto afectar directamente el crecimiento de las raíces, mediante la estimulación de la división celular y con esto, la elongación de la planta (Kepczynska, 2008).

### **Control Biológico**

La protección de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal está bien documentada e involucra diversos procesos (Handelsman y Stabb, 1996).

En primer lugar, la competencia entre microorganismos (benéficos y patógenos) puede limitar el crecimiento de los patógenos (Lemanceau *et al.*, 1993). Segundo, las interacciones directas entre el simbiote y el patógeno reducen la posterior virulencia, la producción de sustancias antimicrobiales, probablemente elegidas por competición de los recursos de la planta hospedera, funciona tal como se ha demostrado en cepas mutantes, que a su vez carecen de protección de toxinas y de efectos (Chin *et al.*, 2013). Tercero, además de la competencia y la interacción directa, algunas cepas de bacterias promotoras del crecimiento vegetal, activan la respuesta de defensa inducida en las plantas (Pieterse *et al.*, 2007, Sturz *et al.*, 2000). Este es elicitado después del contacto con agentes de la rizosfera (Bakker *et al.*, 2003, Ramamoorthy, 2001) e involucra la producción de elicitores o análogos de hormonas de las plantas, formando parte de la señalización en el sistema de resistencia, tal y cómo lo hace el ácido salicílico (Maurhofer *et al.*, 1998)

Para que el control biológico suceda, la rizobacteria necesita estar presente en la raíz en el lugar adecuado (bajo la punta de la raíz) y en el tiempo correcto (antes de que el patógeno haya causado un daño severo) y en la concentración correcta, lo cual dependerá de diferentes factores propios de la bacteria y de la planta hospedera (Emmert y Handelsman, 1999).

La rizobacteria puede ayudar a la producción de una gran cantidad de metabolitos secundarios, los cuales pueden ayudar a la formación de antibióticos. El término idiofase (la fase peculiar), describe el periodo de crecimiento durante la cual el microorganismo produce metabolitos secundarios y se distingue de la trofofase (la fase nutricional) cuando los microorganismos dedican su metabolismo a la máxima síntesis de compuestos celulares y en

crecer. La idiofase se caracteriza por un crecimiento lento y no exponencial, típicamente causado por la limitante de nutrientes y por una alta densidad celular (Liao *et al.*, 1995).

La importancia del uso del biocontrol en la agricultura es evitar las desventajas asociadas con los pesticidas sintéticos, incluyendo el desarrollo de resistencia en las poblaciones de una plaga. Una característica atractiva de las estrategias usadas en biocontrol, es que las poblaciones de patógenos resistentes a los antibióticos producidos en el mismo crean una resistencia muy lenta. Primeramente, la mayoría de los agentes de biocontrol producen más de un antibiótico y la resistencia a múltiples antibióticos ocurre con muy poca frecuencia, por otro lado, la exposición total de la población de patógenos a los antibióticos es baja, debido a que en general las poblaciones de los agentes de biocontrol se encuentran localizadas en las raíces, por lo que las presiones de selección se minimizan (Handelsman y Stabb, 1996).

### **Generalidades del Género *Bacillus* spp.**

El género *Bacillus* es un amplio y diverso grupo de bacterias Gram-positivo y Gram-negativo, capaces de formar endoesporas, ser aeróbicas, facultativas anaeróbicas y se pueden identificar por su forma de barra (Nazina *et al.*, 2001), son móviles por la presencia de flagelos laterales, son catalasa positiva, presentan hemólisis variable y un crecimiento activo en un rango de pH entre 5.5 a 8.5. La propagación activa del microorganismo se produce en medios que presentan superficie húmeda y por lo general se desarrollan bien en agar sangre, produciendo colonias blanquecinas, grandes, extendidas e irregulares (Layton, 2011).

Este género se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza e incluye bacterias termófilas, psicrófilas, acidófilas, alcalófilas y halófilas, que utilizan diversas fuentes de carbono para crecer, si son heterótrofas u otras fuentes si son autótrofas. Su hábitat se encuentra en diversos ambientes que incluyen rocas, polvo, ambientes acuáticos y en el interior de varios insectos y animales (Nicholson, 2002).

Se han demostrado las potencialidades del género *Bacillus* para la producción de antibióticos, enzimas, la solubilización de fosfatos y la fijación biológica del nitrógeno. En este sentido, se han realizado estudios de promoción del crecimiento vegetal y control biológico de patógenos, buscando estrategias que permitan la disminución del uso de fertilizantes químicos, que no solo encarecen la producción, sino también, traen consigo un impacto negativo sobre el medio ambiente (Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

### **Generalidades de *Brevibacillus brevis* (*Bacillus brevis*)**

*Brevibacillus brevis*, anteriormente conocida como *Bacillus brevis*, es una bacteria estrictamente aeróbica, Gram-positiva, formadora de esporas (Shida *et al.*, 1996), siendo estas últimas de forma elipsoidal. La bacteria tiene forma de varilla (bacilo) y la temperatura máxima de crecimiento es de 45 a 55 °C (Takagi *et al.*, 1993). También es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal (RPCV) la cual puede producir ácido indolacético (AIA), hormona vegetal que promueve el desarrollo radical, vegetativo y producción de frutos (Chalé-Carrillo *et al.*, 2016).

Por otro lado, esta especie tiene la habilidad de fijar nitrógeno (N<sub>2</sub>) atmosférico, reduciéndolo y fijándolo en formas más asimilables para las plantas, como los iones amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) o nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) (Restrepo-Correa *et al.*, 2017). De igual manera ha demostrado estimular el crecimiento de las plantas en más de un 70% por su habilidad de hacer disponible el hierro (Fe) (Jha y Saraf, 2012). El interés en *B. brevis* floreció a principios de la década de 1940 con el descubrimiento de que algunas cepas de esta bacteria producen el antibiótico gramicidina (Nakamura, 1991). La gramicidina S (GS) es un decapeptido cíclico que se ha utilizado de manera prominente como un antibiótico, la cual ejerce una amplia gama de efectos antimicrobianos, incluida la actividad contra bacterias de Gram-positivos y Gram-negativos, virus, hongos y células individuales eucariotas patógenos (Berditsch *et al.*, 2007).

### **Antecedentes del Uso de *Brevibacillus***

En este modelo de investigación, una sola inoculación con la cepa aislada más tolerante a la presencia de níquel del género *Brevibacillus brevis*, fue particularmente efectiva incrementando la biomasa de tallos y de raíces en el modelo biológico utilizado, al aplicar tres niveles diferentes de concentración o contaminación de Ni, en comparación con otras cepas nativas inoculadas en la planta control. Al coinocular las cepas anteriores con *G. mosseae* se presentó el valor más alto de peso seco y biomasa (tallos y raíces), así como el mayor contenido de nitrógeno y fósforo, junto con el nivel más bajo de Ni en los tallos. Los resultados sugieren que la coinoculación con micorrizas mejora la asimilación de nutrientes y en la disminución de la toxicidad del Ni (Vivas *et al.*, 2006).

La habilidad de *Brevibacillus brevis* para influir en el desarrollo de la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* en el cultivo del tomate, se ha investigado usando plantas cultivadas en cajas Petri en microclimas controlados y en invernadero utilizando macetas. El desarrollo de síntomas en plantas desarrolladas en ambas condiciones, se reducen en coinoculaciones de *F. oxysporum f.sp. lycopersici* con *B. brevis*, comparándolo con inoculaciones únicamente con el patógeno. Además, la coinoculación presenta crecimientos significativos en las plantas, peso de la planta y mayor longitud de raíz en invernadero. Los resultados muestran que *Brevibacillus brevis* es una opción ideal para el control de esta enfermedad en tomate (Chandel *et al.*, 2010).

Los microorganismos influyen en el destino de los metales en el medio ambiente, el hecho de que la contaminación por este vaya en aumento, ha hecho que la investigación para solucionarlo utilizando microorganismos haya aumentado en años recientes, llamándola bioremediación, en este trabajo se estudió el rol del arsénico, siendo transformado por bacterias e incorporándolo en el diseño de la bioremediación. Las muestras fueron tomadas en Nadia, distrito conocido por estar contaminado con arsénico. De seis bacterias aisladas, una mostró tolerancia al arsénico, mostrando similitud molecular con

*Brevibacillus brevis* según los resultados de la prueba del gen 16s rRNA (Banerjee *et al.* 2013).

La importancia de *Brevibacillus* se ha documentado científicamente en literatura publicada y comercialmente en productos diversos. Siendo uno del grupo más conocidos de las bacterias Gram positiva. Su alta y rápida tasa de crecimiento, su buena transformación para eficientar la electroporación, disponibilidad de producir diversos vectores, la producción de una cantidad apreciable de proteasas extracelulares, y la continua expresión de proteínas heterologas hacen a algunas cepas de este género, excelentes modelos de laboratorio. En referencia a sus aplicaciones biotecnológicas, en esta investigación se revisaron sus variadas aplicaciones tales como el ser una fuente de varias enzimas con un alto interés biotecnológico, aunado a su habilidad para degradar polietileno de baja densidad, además de ser útil en el biocontrol, y más recientemente descubierto como ser una herramienta útil para la sobre expresión (Panda *et al.*, 2014).

En los cultivos de berenjena (*Solanum melongena L.*) y de ají (*Capsicum annuum L.*) cuyas semillas crecieron en sustratos adicionados con humus de lombriz, residuos agrícolas y suelo, los cuales aportan nutrientes a las posturas pero carecen de fitohormonas, se suministraron mediante la adición de rizobacterias estimuladoras del crecimiento vegetal evaluando los efectos de un biopreparado de la rizobacteria *Brevibacillus borstelensis* B65 sobre la germinación y el desarrollo de las posturas de berenjena y de ají en fase de semillero. Los resultados mostraron los efectos de B65 sobre el aumento del porcentaje de germinación de la berenjena y del ají por encima de sus controles. Igualmente aceleró la emergencia de las plántulas, así como el aumento en la longitud de tallo y de las raíces y de la biomasa de tallos, hojas y raíces de ají (Nápoles *et al.*, 2014)

La inoculación con la rizobacteria *Brevibacillus brevis* CBTC1 en el crecimiento y respuesta a la mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) en genotipos de *Capsicum annuum*, se evaluó el efecto de esta cepa productora de ácido indolacético, teniendo efectos significativos en el diámetro de tallo, altura de planta, biomasa,

número de hojas y biomasa de raíz, por otro lado no modificó la concentración de N foliar ni la atracción de adultos de *B. tabaci* en los genotipos (Chalé-Carrillo *et al.*, 2016).

*Brevibacillus laterosporus* es una bacteria entomopatógena que muestra diversos grados de virulencia contra diversas plagas de insectos en la agricultura. A la inversa puede llegar a ser benéfico como parte de la flora intestinal de algunos otros insectos, incluyendo a las abejas. Una cepa purificada del interior de las abejas resultó ser patogénica contra la mosca doméstica, así se sustenta que el desarrollo de interacciones mutualistas o patogénicas de esta bacteria, con diversas especies de insectos resulta un proceso evolutivo (Marche *et al.*, 2016).

### **Hongos Fitopatógenos**

El control de organismos fitopatógenos habitantes del suelo es difícil de lograr e incluso tiene un costo elevado, ya que implica el desarrollo de nuevos pesticidas (López-Benitez *et al.*, 2005).

*Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* son hongos fitopatógenos que poseen un amplio rango hospedero que incluye algunos cultivos de importancia económica como la papa *Solanum tuberosum* y el tomate *Lycopersicon esculentum* (Krechel *et al.*, 2002). Estos fitopatógenos causan enfermedades en los tallos y raíces de gran variedad de cultivos y son responsables de la muerte de plántula en semillero, así como también pudriciones en etapa de pre y post-emergencia (Hoyos-Carvajal *et al.*, 2008).

Para el control de estos patógenos se aplican distintos fungicidas de acción sistémica (Almandoz *et al.*, 2000). Aunque el principal método de manejo de las enfermedades causadas por *A. solani* y *R. solani* ha sido el control químico, los problemas de contaminación ambiental derivados de la utilización de estos, han impactado negativamente en la biodiversidad de los agroecosistemas, así como seguridad y salud pública inherentes al uso inadecuado de los agroquímicos, condujeron a la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas (Zavaleta-Mejía, 2000).

## **Medios de Cultivo**

Los medios de cultivo son sustancias nutritivas que permiten obtener en laboratorio (es decir, *in vitro*) el desarrollo de microorganismos. Cultivar un microorganismo en un medio consiste en brindar artificialmente las condiciones óptimas para su crecimiento (Negroni, 2009). El crecimiento de una población bacteriana es influenciado tanto por factores nutricionales como de otra índole, entre estos la temperatura, el pH, la presión osmótica y la atmósfera de incubación (Cavallini, 2005).

Según la composición de los medios de cultivo, se puede clasificar en medios naturales y artificiales, los primeros hacen referencia a aquellos de origen animal y vegetal, los segundos hace mención a todo aquello que se prepara en el laboratorio. Pueden ser clasificados según su estado en líquidos (caldo) y sólidos, cuando al caldo se le agrega una sustancia capaz de solidificarse, como el agar; y de acuerdo con su función (Vanegas, 2015).

Los elementos esenciales para el crecimiento de una bacteria son: C, H, O y N en altas cantidades; S y P en menor proporción; y Ca, Mg, Fe, Mn, Zn, Cu y Mo en cantidades mínimas (Pelczar *et al.*, 2010).

La diversidad metabólica de los microorganismos es enorme, por ello la variedad de medios de cultivo es a su vez amplia y no existe un medio de cultivo universal capaz de adecuarse a todos ellos (Diaz *et al.*, 2005).

### **Medio Nutritivo de Sábila y Melaza (SM)**

La sábila (*Aloe vera*) tiene diferentes propiedades biológicas que ayudan a mejorar la salud y prevenir enfermedades. Es una de las fuentes naturales más ricas para la salud de los seres humanos. Su composición química ha revelado la presencia de más de 200 sustancias biológicamente activas diferentes (Zari y Zari, 2015). Con respecto a su composición química se ha reportado que la planta de Aloe vera está constituida por una mezcla compleja de compuestos como se muestra en la Tabla 2 y que más de veinte de estas sustancias poseen actividades benéficas para la salud (Domínguez-Fernández *et al.*, 2012).

**Tabla 2.** Componentes químicos de la planta *Aloe vera*.

Composición	Compuestos
Antraquinonas	Ácido aloético, antranol, ácido cinámico, barbaloina, ácido crisofánico, emodina, aloemodin, éster de ácido cinámico, aloína, isobarbaloina, antraceno, resistamos.
Vitaminas	Ácido fólico, vitamina B1, colina, vitamina B2, vitamina C, vitamina B3, vitamina E, vitamina B6, betacaroteno.
Minerales	Calcio, magnesio, potasio, zinc, sodio, cobre, hierro, manganeso, fósforo, cromo.
Carbohidratos	Celulosa, galactosa, glucosa, xilosa, manosa, arabinosa, aldopentosa, glucomanosa, fructuosa, acemanano, sustancias pépticas, L-ramnosa.
Enzimas	Amilasa, ciclooxidasas, carboxipeptidasa, lipasa, bradikinasas, catalasa, oxidasa, fosfatasa alcalina, ciclooxigenasa, superóxido dismutasa.
Lípidos y compuestos orgánicos	Esteroides (campesterol, colesterol, $\beta$ - sitoesterol), ácido salicílico, sorbato de potasio, triglicéridos, lignina, ácido úrico, saponinas, giberelina, triterpenos.
Aminoácidos	Alanina, ácido aspártico, arginina, ácido glutámico, glicina, histidina, isoleucina, lisina, metionina, finilalanina, prolina, tirosina, treonina, valina.

El gel de la sábila presenta acción cicatrizante, antiinflamatoria, protectora de la piel, además presenta propiedades bactericidas, laxantes y agentes desintoxicantes (Rodríguez *et al.*, 2006).

El gel está constituido principalmente de agua, mucílagos y otros carbohidratos, ácidos y sales orgánicas, enzimas, saponinas, taninos, heteróxidos antracénicos, esteroides, triacilglicéridos, aminoácidos, ARN, trazas de alcaloides, vitaminas y diversos minerales (Reynolds, 2004). Los mucílagos se caracterizan por estar formados por ácidos galacturónicos, glucorónicos y unidos a azúcares como glucosa, galactosa y arabinosa. También están

presentes otros polisacáridos con alto contenido en ácidos urónicos, fructosa y otros azúcares hidrolizables. Varios polisacáridos han sido detectados y aislados desde la pulpa del Aloe vera, incluyendo manosa, galactosa, arabinosa, sustancias pécticas y ácido glucorónico. (Vega *et al.*, 2005).

Por otro lado, la melaza es un líquido viscoso rico en azúcares de color oscuro, es producto final de la fabricación o refinación de la sacarosa procedente de la caña de azúcar, este subproducto actualmente se utiliza para la alimentación del ganado bovino, obtención de etanol y de levadura prensada (Basanta *et al.*, 2007).

La melaza es una mezcla que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali presentes en el jugo de caña. Además de la sacarosa, glucosa, fructosa, rafinosa, los cuales son fermentables, las melazas también contienen sustancias reductoras no fermentables (Tabla 3) (Aguilar-Zárate *et al.*, 2012).

**Tabla 3.** Composición de la melaza de caña de azúcar.

Componentes	Constituyentes	Contenido (p/p)
Componentes Mayores	Materia Seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60-63%
	Azucres Reductores	3-5%
	Sustancias Disueltas (Diferentes Azucres)	4-8%
	Agua	16%
	Grasas	0.40%
	Cenizas	9%
Contenido de Minerales	Calcio	0.74%
	Magnesio	0.35%
	Fósforo	0.08%
	Potasio	3.67%
Contenido de Aminoácidos	Glicina	0.10%
	Leucina	0.01%
	Lisina	0.01%
	Treonina	0.06%
	Valina	0.02%
Contenido de Vitaminas	Colina	600 ppm
	Niacina	48.86 ppm
	Ácido Pantoténico	42.90 ppm
	Piridoxina	44 ppm
	Riboflavina	4.40 ppm
	Tiamina	0.88 ppm

### **Medio Nutritivo Luria Bertani (LB)**

El medio LB es ampliamente usado por los bacteriólogos porque permite un rápido crecimiento y buen rendimiento de desarrollo para muchas especies bacterianas. La receta para el caldo de Luria-Bertani es el siguiente: combinar 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl y 1 litro de agua destilada. La triptona utilizada es una digestión pancreática de caseína de la leche de vaca, y el extracto de levadura es una digestión de *Saccharomyces cerevisiae*. El caldo Luria-Bertani deshidratado con la composición anterior se llama caldo LB, Miller; con 5 g/litro de NaCl se llama caldo LB, Lennox (Sezonov *et al.*, 2007).

### **Medio Nutritivo Nitrogen Free broth (NFb)**

El NFb es un medio selectivo libre de nitrógeno y es utilizado para identificar bacterias con capacidad de fijar nitrógeno (Mantilla-Paredes *et al.*, 2009). Microorganismos como del género *Azospirillum sp.* para su aislamiento se realiza con medios libres de nitrógeno, tal es el caso del medio NFb, en el cual según se modifique el pH se aíslan diversas especies (Cárdenas *et al.*, 2010). Este medio adicionado con rojo congo permite el crecimiento de *Azospirillum* identificando las colonias con un color rojo escarlata. Este medio selectivo tiene la ventaja de reducir la probabilidad de contaminación con otro tipo de microorganismo (Silva, 2017).

### **Efecto del pH del Medio de Cultivo Sobre el Crecimiento**

El pH es una medida de la acidez, y la escala va desde 0 (muy ácido) a 14 (elevada alcalinidad). Los valores de 0 a 7 son ácidos y los valores de 7 a 14 son de naturaleza básica o alcalina. Un pH de 7, neutro, indica una cantidad igual de ácido que de base o ausencia de base y de ácido (Miller y Palenic, 2000).

Los microorganismos solo pueden crecer dentro de un rango estrecho de pH, característico de cada tipo de ser vivo, que al sobrepasarlo mueren rápidamente. Teniendo en cuenta el rango de pH que toleran los microorganismos se clasifican en: Acidófilos, Neutrófilos y Basófilos. Se ha de

tener presente que, generalmente, el pH del medio es inferior al pH interno de la célula y de esta forma se genera energía metabólica mediante una bomba de protones (Rodríguez, 2010).

Bello-Gutiérrez (2000), afirma que el efecto del pH sobre el desarrollo de los microorganismos viene determinado por varias circunstancias que afectan a su mecanismo de acción:

- La disponibilidad de los distintos nutrientes para un determinado valor de la concentración protónica.
- La permeabilidad de la membrana, según el tipo de microorganismo se ve afectada por los valores de pH. Por debajo de un cierto nivel de pH, se considera que el medio es ácido y las permeasas catiónicas se saturan de protones y limitan, o anulan, el transporte de cationes indispensables para la vida de la célula; en cambio, por encima de ese nivel, el medio resulta alcalino y serán los iones hidroxilos los que saturan las membranas impidiendo la transferencia de aniones.
- Las actividades de los sistemas enzimáticos que intervienen en el metabolismo celular suelen estar relacionadas con un nivel óptimo del pH y cualquiera que difiera del mismo significa cambios en las cinéticas de las reacciones. En consecuencia, disminuye la actividad enzimática y se inhibe (o reduce) el crecimiento del correspondiente microorganismo.

Con frecuencia el metabolismo del propio microorganismo influye el pH de su hábitat. Por ejemplo, las bacterias fermentadoras de la leche, que producen ácido láctico, aumentan la concentración de hidrogeniones en su medio ambiente y tienden a crecer mejor a pH moderadamente bajos. Por otra parte, las bacterias de la putrefacción, que descomponen las proteínas generan aminas y amoníaco, elevan el pH de su entorno pues crecen mejor en condiciones alcalinas (Cavallini, 2005).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Ubicación del Experimento y Material Biológico

El presente trabajo se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en el laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Horticultura, en Saltillo, Coahuila, México. Como material biológico se utilizó una cepa extraída de raíces de nopal en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro e identificada mediante la técnica de PCR se obtuvo una secuencia de aminoácidos que se comparó con la base de datos *BLAST*®, determinando que es *Brevibacillus sp. G12*. utilizada en anteriores investigaciones y conservada en congelación a -20 °C.

### Tratamientos

En la selección del medio óptimo, se tuvieron treinta tratamientos con las combinaciones de Medios de cultivo: Sábila y Melaza 1% (SM 1%), Sábila y Melaza 0.5% (SM 0.5%), Sábila y Melaza 0.1% (SM 0.1%), Luria Bertani (LB), Nitrogen Free broth (NFb), pH: 6, 7 y 8 y Tiempo: 48 y 96h. Se utilizaron 4 repeticiones por tratamiento.

Para la prueba de antagonismo se tuvieron cinco tratamientos con diferentes concentraciones para el formulado bacteriano:  $10^{10}$ ,  $10^8$ ,  $10^6$ ,  $10^4$ ,  $10^2$  y un control o testigo al que solo se le agrego agua destilada, cada uno con 4 repeticiones.

### Diseño Experimental

El diseño experimental en el caso de la selección del medio, fue completamente al azar con un arreglo factorial (5x3x2). Los factores incluyeron medio de cultivo (con cinco niveles), pH (con tres niveles) y tiempo de incubación (con dos niveles). Los datos obtenidos fueron analizados en el programa SAS 9.4. utilizando una prueba de medias Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Así como para la prueba de antagonismo el diseño fue completamente al azar. Los datos obtenidos fueron analizados en el programa SAS 9.4. utilizando una prueba de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

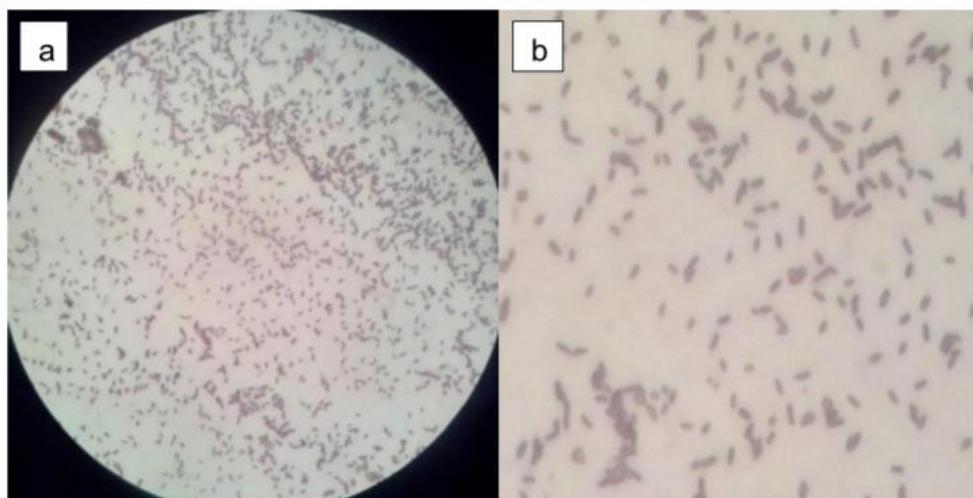
### **Reactivación del Microorganismo**

Usando la cepa bacteriana contenida en microtubos se procedió a su descongelación a 32 °C por 1 hora; pasado del tiempo se tomaron 160  $\mu$ L de la cepa y se inoculó en 80 mL de medio nutritivo líquido Nitrogen Free broth (NFb) a pH 7, posteriormente se incubó durante 48 horas a 32 °C. Después de dos días se hicieron diluciones seriadas 1 a 10 tomando 1 mL del caldo nutritivo y depositado en tubos de ensaye (kimble-KIMAX 16 x 150 mm) con 9 mL de agua destilada. De los tubos con dilución  $10^{10}$  y  $10^{11}$  se tomaron 500  $\mu$ L de cada tubo y fueron depositados en cajas de Petri (vaciado en placa) con medio NFb sólido pH 6.8 sembrado en estría, luego fueron incubados durante 48 horas a 32 °C. Se utilizó una caja de Petri para cada tubo.

### **Prueba de Tinción de Gram**

La prueba de tinción Gram se llevó a cabo después de 48 horas de la reactivación de la bacteria, se colocó una gota de agua destilada en un portaobjetos y en seguida, con un asa de platino se tomó una colonia de la bacteria sembrada en caja de Petri, mezclando con la gota de agua destilada. Con la ayuda de un mechero se secó el exceso de agua en el portaobjeto pasando por encima de la flama. Una vez seco, se cubrió la muestra con cristal violeta y se dejó actuar por 1 min; se dejó escurrir y se quitó el exceso del reactivo con agua destilada. Se secó pasando el portaobjeto nuevamente sobre la flama. Se añadió lugol cubriendo la muestra y se esperó 1 min; transcurrido ese tiempo, se escurrió y se lavó el exceso de reactivo con agua y se secó siguiendo la metodología de los pasos anteriores. A continuación, se colocaron tres gotas de alcohol cetona por cinco segundos y se escurrió el exceso, se lavó con agua destilada y se secó. Por último, se cubrió la muestra con safranina y

se dejó actuar por 1 min, se quitó el exceso y se lavó con agua destilada; se secó por último con ayuda de la flama del mechero. Posteriormente se llevó a



**Figura 1.** Imágenes de *B. brevis* obtenidas con un microscopio óptico a 40x (a) y 100x (b).

cabo la observación de la bacteria en el microscopio.

### **Preparación de Medio de Cultivo Sábila y Melaza (SM)**

La utilización de sábila y melaza para desarrollo de microorganismos es una opción debido a los contenidos de sustancias que son vitales para el desarrollo de estos. Entre los componentes de la sábila, Tabla 1, se encuentran las antraquinonas, Vitaminas (B1, 2, 3 y 6, E, C ácido fólico y beta caroteno), minerales (Calcio, magnesio, potasio, zinc, fósforo y hierro), carbohidratos (celulosa, fructosa, glucosa, glucomanosa), enzimas (lipasa, amilasa, catalasa y lipasa), aminoácidos (alanina, ácido aspártico, glicina, fenilalanina, ácido glutámico), lípidos y compuestos (esteroides, giberelinas, ácido úrico, ácido salicílico, saponinas y triterpenos). Por otro lado, la melaza contiene 20% de agua sacarosa 35%, glucosa 7%, levulosa 9%, sustancias reductoras 3%, carbohidratos estructurales 4%, cenizas 12%, compuestos nitrogenados 4.5%, compuestos no nitrogenados 5%, ceras, esteroides y esterofosfolípidos 0.4%, así como vitaminas en cantidades pequeñas. Para este medio SM se utilizaron 3 concentraciones tomando en cuenta la concentración de la melaza siendo 1%

(10 g L<sup>-1</sup>), 0.5% (5 g L<sup>-1</sup>) y 0.1% (1 g L<sup>-1</sup>), mezclando para cada concentración con 1% de pulpa de sábila (10 g L<sup>-1</sup>), los medios de cultivo de cada concentración se prepararon por triplicado. Con el potenciómetro (Hanna HI-98128), se reguló el pH a 6, 7 y 8. Se depositaron 80 mL de medio SM en frascos con capacidad de 100 mL, los frascos fueron esterilizados en autoclave (Felisa FE-398), a 120 °C por 15 min.

### **Preparación de Medio Luria Bertani (LB)**

Este medio es utilizado de forma rutinaria para el crecimiento bacteriano en líquido. Para la preparación de 1 L se pesaron 10 g de peptona de caseína, 5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio. Los reactivos se mezclaron de acuerdo con el orden descrito en un vaso de precipitados con capacidad de 1 L utilizando agua destilada, esta actividad se realizó por triplicado. Una vez homogeneizada la mezcla se reguló el pH a 6, 7 y 8. Se depositaron 80 mL de medio LB en frascos de 100 mL y se esterilizaron en autoclave (Felisa FE-398), a 120 °C por 15 min.

### **Preparación de Medio de Cultivo Nitrogen Free broth (NFb)**

Este medio de cultivo es carente de nitrógeno (N<sub>2</sub>) y permite el aislamiento y crecimiento de microorganismos que pueden fijar biológicamente este elemento. Además, contiene ácido málico, principal fuente de carbono para la bacteria (Dobereiner et al., 1976). Para la preparación de un litro de medio de cultivo se utilizaron los reactivos que se indican en la Tabla 4 y el orden en que se agregaron está dada por la posición en que se ubican en la tabla, siendo el fosfato de potasio el primero y el azul de bromotimol el último.

**Tabla 4.** Reactivos y cantidades necesarias para elaborar un 1 L de medio de cultivo NFb.

Fosfato de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0.04 g/L
Fosfato dipotásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0.5 g/L
Cloruro férrico ( $\text{FeCl}_3$ )	0.01 g/L
Molibdato de sodio ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ )	0.002 g/L
Sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ )	0.002 g/L
Sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ )	0.2 g/L
Cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ )	0.1 g/L
Ácido málico ( $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$ )	2 g/L
Agar bacteriológico	2 g/L
Azul de bromotimol	6 gotas/L

Posteriormente con un potenciómetro (Hanna Hi-98128), se reguló el pH a 6, 7 y 8. Se depositaron 80 mL del medio NFb líquido en frascos con capacidad de 100 mL, mismos que fueron llevados a esterilización en autoclave (Felisa FE-398), a 120 °C por 15 min.

### **Inoculación e Incubación del Microorganismo**

Con una micropipeta se midieron 160  $\mu\text{L}$  de la bacteria sembrada en medio NFb líquido de pH 7 y se depositaron en los medios nutritivos NFb, LB y SM contenidos en los frascos. Posteriormente fueron colocados en un agitador mecánico oscilatorio (Labnet 211DS), a temperatura de 32 °C y a 100 RPM, se evaluaron las rizobacterias a las 48 y 96 h. Se emplearon cuatro repeticiones de cada tiempo por medio nutritivo.

### Diluciones

Para cada tiempo (48 y 96 horas) y repetición (4) se hicieron diluciones seriadas 1/10 tomando 1 mL del medio nutritivo con la bacteria y posteriormente depositado en un tubo de ensaye (kimble-KIMAX 16 x 150 mm) con 9 mL de agua destilada previamente esterilizada, se aplicó el mismo procedimiento con el segundo tubo y así sucesivamente hasta llegar al undécimo tubo. Se tomaron 500  $\mu$ L de los tubos de la dilución  $10^{11}$ , depositados en placas para su siembra por estría y posterior incubación. Después de 48 h se contabilizaron las UFC  $\text{mL}^{-1}$  de cada placa.

### Prueba de Antagonismo

Esta se llevó a cabo dentro cajas Petri utilizando medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), se siembra  $0.5 \text{ cm}^2$  de *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani* al centro de la caja y en dirección de los 4 puntos cardinales se coloca una gota de los diferentes concentrados del formulado adicionado con *Brevibacillus brevis*, y dejando un testigo sin ningún tratamiento, para realizar las mediciones se dejan pasar 48 h tomando el crecimiento en cm y utilizando la formula siguiente para determinar el porcentaje de inhibición, descrita por Bashan *et al.*, (1996):

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{DCC - DCT}{DCC} \times 100$$

Donde DCC: Diámetro de la colonia control y DCT: Diámetro de la colonia tratada.

**Variables evaluadas**

1. Interacción Medios de cultivo - pH
2. Interacción Medios de cultivo - Tiempo
3. Interacción pH - Tiempo
4. Interacción Medios de cultivo - pH - Tiempo

Estos se expresan en UFC mL<sup>-1</sup> y se realizó el conteo de estas unidades de cada caja que se sembró por tratamiento, con sus repeticiones.

5. Porcentaje de inhibición

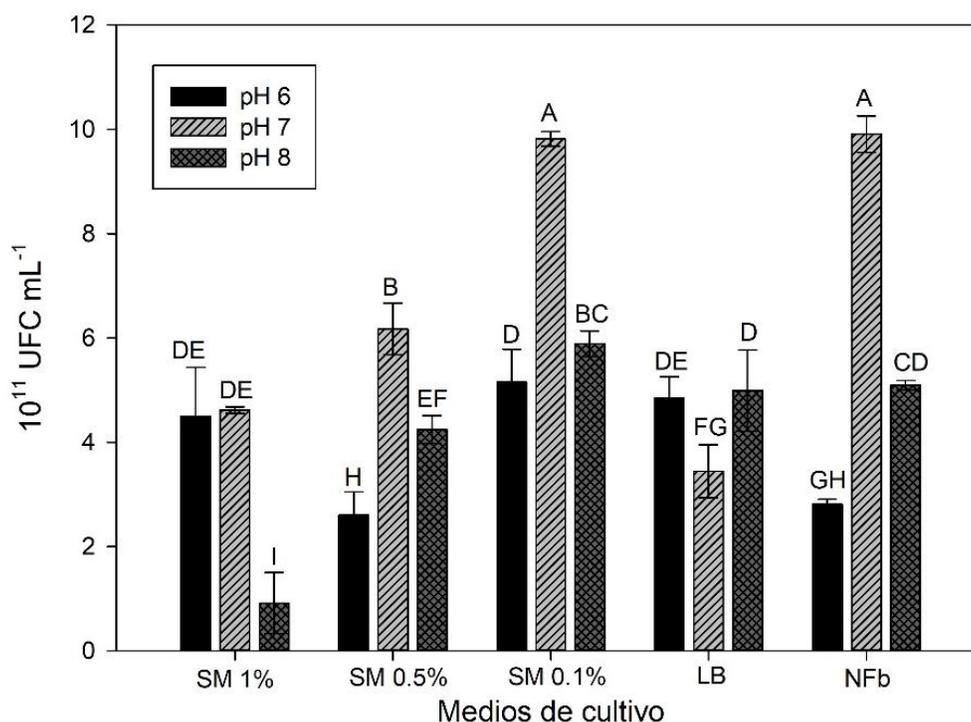
Estos se expresan en porcentaje, tomando la medida expresada en cm de cada caja sembrada y para cada concentración del formulado, se realiza el cálculo con la formula antes descrita.

## RESULTADOS

Los resultados obtenidos presentaron diferencias significativas con el ANOVA y estos fueron analizados bajo una prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ )

### Interacción Medio de Cultivo – pH

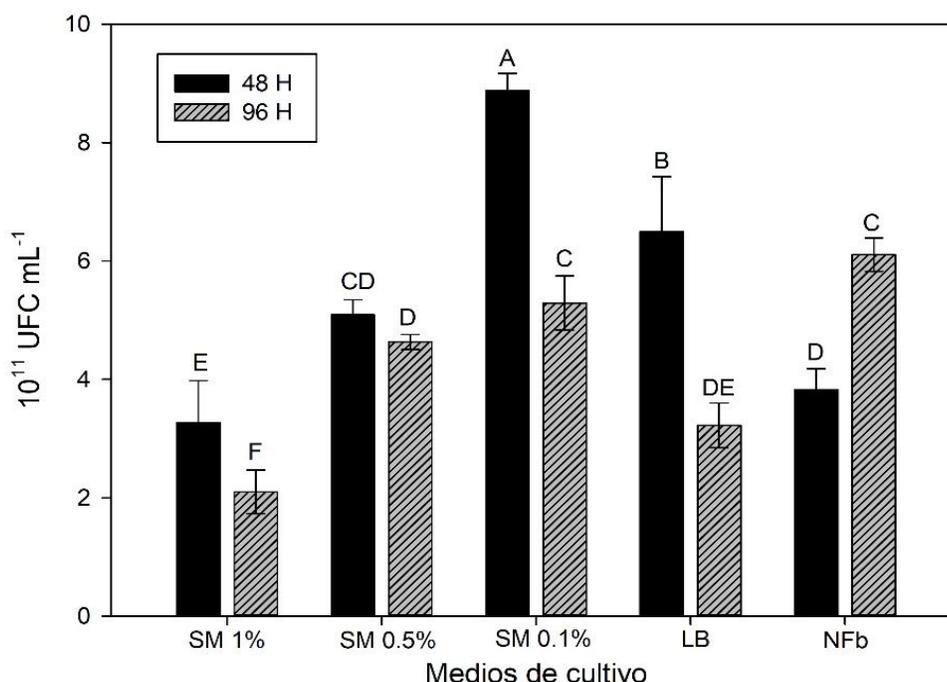
Los resultados de la doble interacción se muestran en la Figura 2, encontrando que entre el medio NFb pH 7 y SM 0.1% pH 7, son estadísticamente iguales para la dilución  $10^{11}$ . Para NFb y pH este resultado es 71.64% mayor al obtenido con pH 6 y 48.64% superior al de pH 8. En relación con el medio SM 0.1% con pH 7 éste fue superior por 47.55% al resultado obtenido por el mismo medio con pH 6 y 59.98% mayor al mostrado con pH 8.



**Figura 2.** Interacción entre los factores medio de cultivo y pH en relación con la reproducción de *Brevibacillus brevis*. (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

### Interacción Medio de Cultivo - Tiempo de Incubación

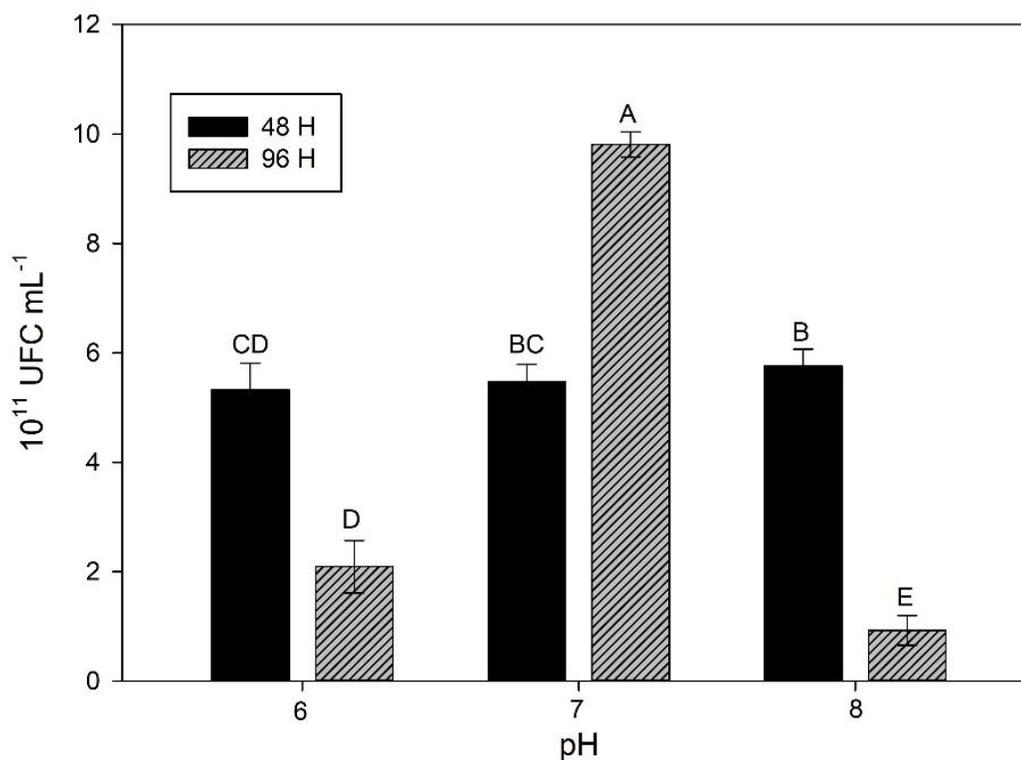
La Figura 3 muestra los resultados de la interacción entre estos factores, así para el medio SM 0.1% con 48 h de incubación la dilución  $10^{11}$  presenta diferencias significativas sobre los otros tiempos de incubación, el cual tiene un aumento de 37.05% en relación con 96 h de incubación.



**Figura 3.** Interacción entre los factores medio de cultivo y tiempo (horas) de incubación en relación con la reproducción de *Brevibacillus brevis*. (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

### Interacción pH - Tiempo de Incubación

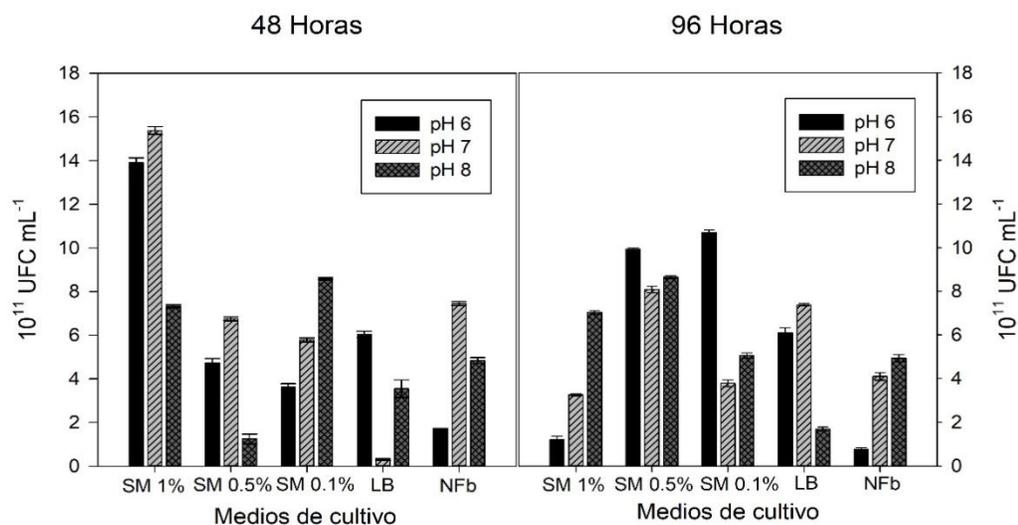
Los resultados de esta interacción se muestran en la Figura 4, donde se observa que el pH 7 por 96 h en la dilución  $10^{11}$  tuvo diferencias significativas sobre los demás resultados. Para las 96 h se obtuvo una diferencia de 78.7% sobre los demás resultados. Para las 96 h se obtuvo una diferencia de 78.7% en relación con el pH 6 y 90.52% para pH 8, siendo estos superiores por 38.84% al resultado más cercano obtenido por 48 h.



**Figura 4.** Interacción entre los factores pH y tiempo (horas) de incubación en relación con la reproducción de *Brevibacillus brevis*. (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

#### **Interacción Medio de Cultivo - pH - Tiempo de Incubación**

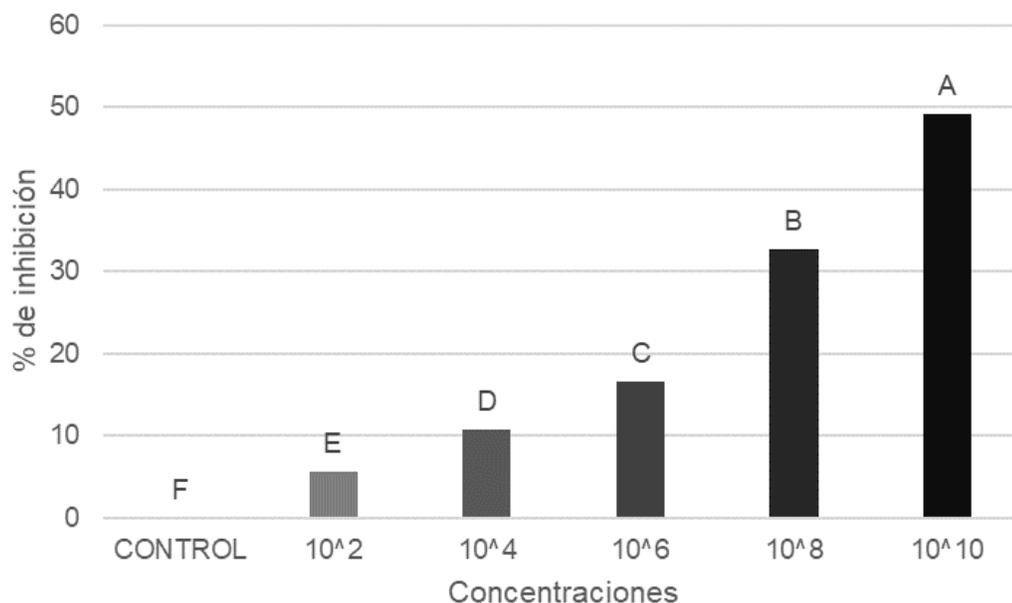
Los resultados más sobresalientes del estudio son los obtenidos de la triple interacción de los factores evaluados, los cuales se presentan en la Figura 5, mostrando que el medio SM 1%, pH 7 y por 48 h, en la dilución  $10^{11}$  se tienen diferencias significativas sobre el tratamiento SM 1%, pH 6 por 48 h al cual superó en 9.62%.



**Figura 5.** Interacción de los tres factores medio de cultivo, pH y tiempo (horas), de incubación en relación con la reproducción de *Brevibacillus brevis*. (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

### Porcentaje de Inhibición

En las pruebas de antagonismo los resultados se presentan en la Figura 6, de los cuales se obtuvo un porcentaje de inhibición sobre *Rhizoctonia solani* de 49.16% para la concentración más alta del formulado adicionado con *Brevibacillus brevis*, obteniendo diferencias significativas en este caso para  $10^{10}$ , siguiendo una tendencia directamente proporcional conforme la concentración del formulado disminuía, de igual forma lo hacia el porcentaje de inhibición.



**Figura 6.** Efecto inhibitorio de *Brevibacillus brevis* como cepa antagonista sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* (Tukey,  $p \leq 0.05$ ).

Para el control se aplicó únicamente agua destilada, la cual por lo tanto no tuvo inhibición del crecimiento del hongo, tomando este como testigo para comparación con la aplicación del formulado con *B. brevis*.

Dichas pruebas de antagonismo se replicaron sobre el hongo *Fusarium oxysporum*, para el cual no se obtuvo inhibición en las diferentes concentraciones del formulado con *Brevibacillus brevis*, para continuar con este apartado, se propone realizar las pruebas de antagonismo en semillas inoculadas con el hongo y así llevar la evaluación de control biológico en campo.

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de la interacción entre medio de cultivo por pH, Figura 2, resultó mejor el NFb pH 7 y LB pH 7. En un estudio realizado por Sezonov *et al.*, (2007) en donde evaluaron el crecimiento de *Escherichia coli* en medio LB encontraron que el crecimiento en este medio está limitado por la disponibilidad de las fuentes de carbono y no por el pH, aunque considera que el pH alcalino causa la inhibición del crecimiento. La utilización de medios libres de nitrógeno (NFb), para aislamiento de bacterias fijadoras de este elemento, es comprobado en el estudio realizado por Muangthong *et al.*, (2015) donde aislaron bacterias endofíticas fijadoras de nitrógeno obteniendo resultados favorables con un 29% de bacterias Gram-positivas en los aislamientos y 71% Gram-negativas.

De los resultados de la interacción doble entre medio de cultivo y tiempo, (Figura 3), el medio SM (0.1%) por 48 h fue el mejor, esto lo podemos corroborar con lo reportado en estudios realizados por Ossa *et al.*, (2010) en donde desarrollaron *Lactobacillus plantarum* utilizando la melaza de caña como sustrato obteniendo resultados favorables en recuento de unidades, al igual que Muangthong *et al.*, (2015), que utilizó de 24 a 48 h de incubación en bacterias fijadoras de nitrógeno.

En la interacción entre pH y tiempo de incubación, Figura 4, el resultado obtenido con pH 7 y 96 h fue el mejor en base al crecimiento de la bacteria. *Brevibacillus brevis* es un microorganismo neutrófilo por lo que se desarrolla de la mejor manera en pH 7, ya que de ser superior o inferior (6 u 8), disminuyen la reproducción de dicha bacteria. En un estudio realizado por Che *et al.*, (2015), encontraron que a 72 h se reducía el daño a solo el 14% por podredumbre en manzano, deduciendo que prolongar el tiempo de incubación de *B. brevis* (mayor a las 72 h), beneficiaba su utilización para control biológico de patógenos.

En análisis de la interacción entre medio de cultivo, pH y tiempo de incubación, Figura 5, muestra que el mejor resultado obtenido fue con el medio SM 1%, a pH 7 y 48 h esto en base al crecimiento de *Brevibacillus brevis*.

La utilización de la melaza de caña de azúcar como sustrato para crecimiento de bacterias ha demostrado buenos resultados, esto puede ser atribuido a la transformación de la sacarosa a monómeros de azúcar (glucosa y fructuosa) por la enzima invertasa, permitiendo así el aumento en la velocidad del crecimiento de la bacteria (Takehige y Ouchi, 1995).

Brock *et al.*, (1987) en un estudio realizado sobre el crecimiento y control en microbiología, encontró que, a concentraciones de melaza más altas, las bacterias llegan a la fase estacionaria en tiempo menor, esto antes de consumir todo el sustrato, lo que hace que los microorganismos no produzcan más biomasa, dado por el estado de saturación en el sustrato, con respecto a la concentración microbiana. A concentraciones moderadas y elevadas de sustrato las velocidades de crecimiento son idénticas; sin embargo, la proliferación queda limitada.

La escasez de nutrientes provoca la falta de fuentes de energía. La viabilidad de las células es determinada por la energía necesaria para el mantenimiento como para el crecimiento; si la bacteria carece del mínimo requerido, se inactiva. Cuanto mayor es la cantidad de alimento, más prolongada es la fase estacionaria, y cuanto más prolongada es la fase estacionaria, indica una menor velocidad de crecimiento (Cattaneo *et al.*, 2007).

Ossa *et al.*, (2010), menciona que la melaza tiene altos contenidos de carbohidratos y elementos tales como calcio (Ca), magnesio (Mg), fósforo (P) y potasio (K), por otro lado, un estudio realizado por Contreras, (2007), encontró que el *Aloe vera* contiene 20 aminoácidos entre esenciales y no esenciales, enzimas y elementos como calcio (Ca), potasio (K), cobre (Cu), hierro (Fe), fósforo (P), sodio (Na) y magnesio (Mg), que son indispensables para el metabolismo y actividad celular.

El pH es un factor de suma importancia que influye sobre el crecimiento de los microorganismos. Algunas bacterias crecen a pH bajos (3.0). Sin embargo, el rango óptimo de pH para las bacterias va de 6.0 hasta 8.5 y sólo pocas prefieren pH de 8.5 o mayor (Cervantes *et al.*, 2017). Algunas bacterias tienen

la capacidad de modificar el pH de un medio no amortiguado por los compuestos producidos durante su crecimiento (Buckman y Buckman, 1991).

*Brevibacillus brevis* es un microorganismo neutrófilo, esta característica permite a la bacteria ajustar el medio favoreciendo el movimiento de sustancias a través de la membrana (Pírez *et al.*, 2000). Por otro lado, Ossa *et al.*, (2010), mencionan que cuando el medio alcanza la alcalinidad el crecimiento tiende a disminuir ya que afecta la permeabilidad de la membrana. Además, en un estudio se encontró que a pH 7 se aumenta 1.5 veces la cantidad de compuestos antimicrobianos producidos por *Brevibacillus brevis* (Arumugan *et al.*, 2017).

Se encontró que 48 h fue el tiempo idóneo para la reproducción y desarrollo de *Brevibacillus brevis*, comparable con el tiempo utilizado por Sánchez-López *et al.*, (2012), para reproducción de *Pseudomonas p.* y *Bacillus sp.*, ya que a menor tiempo la bacteria se encuentra en adaptación y el proceso de reproducción no se lleva a cabo, así como prolongar el tiempo degrada el medio y eleva la saturación por el microorganismo lo que causa escasez de alimento y por ello un descenso en reproducción hasta llegar a la muerte.

Asaka y Shoda (1996), utilizaron *Bacillus* como biocontrol de *Rhizoctonia solani* en tomate. Con el tiempo ha surgido el interés de encontrar microorganismos que funjan como antagonistas para el control fitosanitario como lo menciona Fernández-Larrea (2001). Por los resultados obtenidos en esta investigación con *Brevibacillus brevis*, son coincidentes a los reportados por Reinoso *et al.*, (2007) donde utilizaron diferentes cepas antagonistas del género *Bacillus*, obteniendo 55% de antagonismo para *Rhizoctonia solani* y *Alternaria solani*. En otro trabajo realizado por Reinoso *et al.*, (2012), encontraron esta bacteria entre los aislados más promisorios, inhibiendo hasta un 65% el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y *Alternaria solani*, esto a pesar de que *B. brevis* no se encuentra entre las especies de mayores potencialidades para el control biológico de fitopatógenos, por lo que sugieren el uso de esta cepa para su uso efectivo en el control de patógenos.

## CONCLUSIONES

El medio de Sábila y Melaza 1%, pH 7, 100 RPM y 48 h de incubación logró incrementar la reproducción de *Brevibacillus brevis*, por lo tanto se infiere que este medio adecuado para la reproducción y desarrollo de la bacteria estudiada. Por lo tanto es una buena opción a utilizar para el desarrollo de un producto orgánico para uso agrícola.

El costo de los insumos del medio nutritivo SM es muy inferior a comparación con los medios comerciales; por esa razón se recomienda el medio nutritivo SM como sustrato para la reproducción de *B. brevis*.

*Brevibacillus brevis*, permite controlar el desarrollo de *Rhizoctonia solani*, mostrando su potencial para su uso en el desarrollo de agrobiológicos y para su utilización en sistemas de producción agrícola sustentable, disminuyendo el uso de agroquímicos en hortalizas susceptibles a esta enfermedad.

Es necesario hacer más estudios con otras especies de organismos antagonicos contra hongos y bacterias fitopatógenas evaluando el mismo sustrato ya que es un medio natural, el cual probablemente reducirá el costo de producción de bacterias benéficas y realizar investigaciones para la elaboración de formulados bioplaguicidas que la agricultura sustentable demanda.

## REFERENCIAS

- Aguilar-Zárate P, Aguilar-Zárate M, Inungaray MLC, Rivera OMP (2012) Importancia de la producción de transglutaminasa microbiana para su aplicación en alimentos. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila* 4: 1-17.
- Almandoz J, VM Pico, L Pérez, F Rodríguez, J Parra (2000) Efectividad de nuevos fungicidas para el control de *Alternaria solani* Ellisy Martin en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.), XIX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP), La Habana.
- Arumugam T, Senthil Kumar P (2017) Optimization of media components for production of antimicrobial compound by *Brevibacillus brevis* EGS9 isolated from mangrove ecosystem. *Journal of Microbiological Methods* 142: 83-89.
- Asaka O, M Shoda (1996) Biocontrol of *Rhizoctonia solani* Damping-Off of Tomato with *Bacillus subtilis* RB14, *Applied and Environmental Microbiology* 62:4081-4085.
- Bakker PAH M, Ran LX, Pieterse CMJ, Van Loon LC (2003) Understanding the involvement of rhizobacteria-mediated induction of systemic resistance in biocontrol of plant diseases. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 25(1), 5-9.
- Banerjee S, Majumdar J, Samal AC, Bhattachariya P, Santra SC (2013) Biotransformation and bioaccumulation of arsenic by *Brevibacillus brevis* isolated from arsenic contaminated region of West Bengal. *J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol*, 3, 1-10.
- Basanta R, Delgado MG, Martínez JC, Vázquez HM, Vázquez GB (2007) Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la agroindustria azucarera: una revisión sustainable recycling of waste from sugarcane agroindustry: a review. *CYTA-Journal of Food*, 5(4), 293-305.
- Bashan J, G Holgueri, R Ferrera (1996) Interacciones entre plantas y microorganismos benéficos, *Terra* 14:159-192.
- Bashan Y, De-Bashan LE (2010) Chapter two-how the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth a critical assessment. *Advances in agronomy*, 108, 77-136.
- Bello-Gutiérrez J (2000) *Ciencia bromatológica: principios generales de los alimentos*. Díaz de Santos. Madrid, España. 573 p.

- Berditsch M, Afonin S, Ulrich AS (2007) The ability of *Aneurinibacillus migulanus* (*Bacillus brevis*) to produce the antibiotic gramicidin S is correlated with phenotype variation. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6620-6628.
- Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S (2011) Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608.
- Brock TD, Smith DW, Madigan MT (1987) *Microbiología*. Editorial Prentice-Hall. México. 906p.
- Buckman SJ, Buckman JD (1991) *Microbiología. Pulpa y papel, química y tecnología química* (J. P. Casey, comp.), 1ª Edición. Limusa. México. 950p.
- Cárdenas DM, Garrido MF, Bonilla RR, Baldani VL (2010) Aislamiento e identificación de cepas de *Azospirillum sp.* en pasto guinea (*Panicum maximum Jacq.*) del Valle del Cesar. *Pastos y Forrajes* 33 (3): 1-7.
- Carvalhais LC, Dennis PG, Fan B, Fedoseyenko D, Kierul K, Becker A, Borriss R (2013) Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. *PLoS One*, 8(7), e68555.
- Cavallini ER (2005) *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. Universidad de Costa Rica. 1a ed. Costa Rica. 481 p.
- Cassán F, Díaz-Zorita M (2016) *Azospirillum sp.* in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry* 103: 117-130.
- Cattaneo C, Larcher L, Togo S, Chaillou L (2007) Aplicación de método de Monte Carlo para el estudio de crecimiento de bacterias y levaduras. *Mecánica Computacional* 25: 3380-3393.
- Cavallini ER (2005) *Bacteriología general: Principios y prácticas de laboratorio*. Universidad de Costa Rica. 1a ed. Costa Rica. 481 p.
- Cervantes-Martínez J, Orihuela-Equihua R, Rutiaga-Quiñones J (2017) Acerca del desarrollo y control de microorganismos en la fabricación de papel. *Conciencia Tecnológica* 54: 54-58
- Chalé-Carrillo VM, Ruiz-Sánchez E, Reyes-Ramírez A, Borges-Gómez L, Cristobal-Alejo J, Pacheco-Aguirre J (2016) Crecimiento y respuesta a *Bemisia tabaci* en genotipos de *Capsicum annuum* inoculados con *Brevibacillus brevis* CEPA CBTC1. *Agrociencia* 50: 323-334.

- Chandel S, Allan EJ, Woodward S (2010) Biological control of *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* on tomato by *Brevibacillus brevis*. Journal of phytopathology, 158(7-8), 470-478.
- Chen S, Jin W, Liu A, Zhang S, Liu D, Wang F, He C (2013) Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) increase growth and secondary metabolism in cucumber subjected to low temperature stress. Scientia Horticulturae, 160, 222-229.
- Chen YP, Rekha PD, Arun AB, Shen FT, Lai W, Young CC (2006) Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. Applied Soil Ecology 34: 33-41.
- Che J, Liu B, Ruan C, Tang J, Huang D (2015) Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX. Crop Protection 67: 178-183.
- Contreras-Pinzón M, Domínguez-Espinosa R, González-Burgos A (2007) Proceso de biotransformación láctica del jugo de *Aloe vera*. Tecnología, Ciencia, Educación 22: 35-42.
- Diaz R, Gamazo C, López-Goñi I (2005) Manual práctico de microbiología. MASSON. 3a ed. Barcelona, España. 264 p.
- Dobereiner J, Marriel IE, Nery M (1976) Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Canadian Journal of Microbiology, 22(10), 1464-1473.
- Dobra J, Motyka V, Dobrev P, Malbeck J, Prasil IT, Haisel D, Vankova R (2010) Comparison of hormonal responses to heat, drought and combined stress in tobacco plants with elevated proline content. Journal of plant physiology, 167(16), 1360-1370.
- Domínguez-Fernández RN, Arzate-Vázquez I, Chanona-Pérez JJ, Welti-Chanes JS, Alvarado-González JS, Calderón-Domínguez G, Gutiérrez-López GF (2012) El gel de *Aloe vera*: estructura, composición química, procesamiento, actividad biológica e importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. Revista Mexicana de Ingeniería Química 11: 23-43.
- Edwards S, Seddon B (2001) Mode of Antagonism of *Brevibacillus brevis* Against *Botrytis cinerea* *in vitro*. Journal of Applied Microbiology 91: 652-659.
- Emmert JE, B Handelsman (1999) "Biocontrol of Plant Disease: A Gram-Positive Perspective." FEMS Microbiology Letters 171: 1-9.

- Fernández-Larrea O (2001) Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario, *Revista Manejo Integrado de Plagas* 62:96-100.
- Földes T, Banhegyi I, Varga Z, Szageti J (2000) Isolation of *Bacillus* Strains from the Rhizosphere of Cereals and in Vitro Screening for Antagonism Against Phytopathogenic, Food-Borne Pathogenic and Spoilage Microorganisms. *Journal of Applied Microbiology* 89: 840-845.
- García de Salamone IE, Hynes RK, Nelson LM (2001) Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Canadian Journal of microbiology*, 47(5), 404-411.
- Glick BR (2012) Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica*, 2012.
- Goto K, Fujita R, Kato Y, Asahara M, Yokota A (2004) Reclassification of *Brevibacillus brevis* strains NCIMB 13288 and DSM 6472 (=NRRL NRS-887) as *Aneurinibacillus danicus* sp. nov. and *Brevibacillus limnophilus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54: 419–427.
- Grover M, Ali SZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B (2011) Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1231-1240.
- Hagen G (1990) The control of gene expression by auxin, *Plant Hormones and their role in plant growth and development*. The Netherlands: Davies, P.J.
- Handelsman J, Stabb EV (1996) Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The plant cell*, 8(10), 1855.
- Hernández-Rodríguez A, Heydrich-Pérez M, Velázquez-del Valle M, Hernández-Lauzardo A (2006) Perspectivas del empleo de Rizobacterias como agentes de control biológico en cultivos de importancia económica. *Revista Mexicana de Fitopatología* 24: 42-49.
- Hernández Pérez D, Díaz Castellanos M, Quiñones Ramos R, Santos Bermúdez R, Portal González N y Herrera Isla L (2018) Control de *Rhizoctonia solani* en frijol común con rizobacterias y productos naturales. *Centro Agrícola* 45: 55-60.
- Honig P (1974) Cristalización. En: *Principios de Tecnología Azucarera*. 2a ed. Compañía Edit. Continental. México. pp: 23-54.

- Hungria, M., Campo, R. J., Souza, E. M., & Pedrosa, F. O. (2010). Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil*, 331(1-2), 413-425.
- Jha CK, Saraf M (2012) Evaluation of Multispecies Plant-Growth-Promoting Consortia for the Growth Promotion of *Jatropha curcas* L. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(4), 588-598.
- Kavadia A, Vayenas DV, Pavlou S, Aggelis G (2008) Dynamics of free-living nitrogen-fixing bacterial populations and nitrogen fixation in a two-prey–one-predator system. *ecological modelling*, 218(3), 323-338.
- Kepeczynska AK (2008) The use of rhizobacteria to stimulate plants growth. *Biotechnology*, 102-114.
- Kloepper JW (1978) Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. In: Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, Angers, France, pp. 879-882.
- Kloepper JW, Lifshitz R, Zablotowicz RM (1989) Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in biotechnology*, 7(2), 39-44.
- Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S (2004) Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus spp.* *Phytopathology*, 94(11), 1259-1266.
- Kloepper JW, Gutierrez-Estrada A, McInroy JA (2007) Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Canadian journal of microbiology*, 53(2), 159-167.
- Klucas R (1991) Associative nitrogen fixation in plants. In: Dilworth, MJ, Glenn, A.R. (Eds.), *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation*, 1-5.
- Krechel A, A Faupel, J Hallmann, A Ulrich, G Berg (2002) Potato- Associated Bacteria and Their Antagonistic Potential Towards Plant- Pathogenic Fungi and the Plant-Parasitic Nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood, *Canadian Journal of Microbiology* 48:772-786.
- Layton C (2011) *Bacillus spp.*, perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Nova*, 9(16), 177-187.
- Lemanceau P, Bakker PA, De Kogel WJ, Alabouvette C, Schippers B (1993) Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Applied and Environmental microbiology*, 59(1), 74-82.

- Liao X, Vining LC, Doull JL (1995) Physiological control of trophophase–idiophase separation in streptomycete cultures producing secondary metabolites. *Canadian journal of microbiology*, 41(4-5), 309-315.
- López-Benítez A, López-Betancourt SR, Vázquez-Badillo ME, Rodríguez-Herrera SA, Mendoza-Elos M, Padrón-Corral E (2005) Inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. mediante extractos vegetales acuosos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2).
- López-Hontangas JL, Castillo FJ y Salavert M (2015) Técnicas de identificación. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 1(1), 27- 41.
- Mantelin S, Touraine B (2004) Plant growth-promoting bacteria and nitrate availability: impacts on root development and nitrate uptake. *Journal of experimental Botany*, 55(394), 27-34.
- Mantilla-Paredes AJ, Cardona G, Peña-Venegas CP, Murcia U, Rodríguez M, Zambrano MM (2009) Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia colombiana. *Revista de Biología Tropical* 57: 915-927.
- Marche MG, Mura ME., Ruiu L (2016) *Brevibacillus laterosporus* inside the insect body: Beneficial resident or pathogenic outsider? *Journal of invertebrate pathology*, 137, 58-61.
- Maurhofer M, Reimann C, Schmidli-Sacherer P, Heeb S, Haas D, Défago G (1998) Salicylic acid biosynthetic genes expressed in *Pseudomonas fluorescens* strain P3 improve the induction of systemic resistance in tobacco against tobacco necrosis virus. *Phytopathology*, 88(7), 678-684.
- Meena VS, Maurya BR, Verma JP, Aeron A, Kumar A, Kim K, Bajpai VK (2015) Potassium solubilizing rhizobacteria (KSR): isolation, identification, and K-release dynamics from waste mica. *Ecological Engineering*, 81, 340-347.
- Métraux JP (2001) “Systemic Acquired Resistance and Salicylic Acid: Current State of Knowledge.” *European Journal of Plant Pathology* 107: 13–18.
- Miller CH, Palenic CJ (2000) Control de la infección y manejo de materiales peligrosos para el equipo de profesionales de salud dental. Editorial ELSEVIER. 2a ed. Madrid, España. 361 p.
- Mollinedo Patzi M A y Gonzáles Villalobos C (2014) Bacterias Gram Negativas. *Revista de Actualización Clínica Investigada* 49: 2609.

- Muangthong A, Youpensuk S, Rerkasem B (2015) Isolation and Characterisation of Endophytic Nitrogen Fixing Bacteria in Sugarcane. *Tropical life sciences research* 26: 41-51.
- Naiman AD, Latrónico A, de Salamone IEG (2009) Inoculation of wheat with *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens*: impact on the production and culturable rhizosphere microflora. *European Journal of Soil Biology* 45: 44-51.
- Nakamura LK (1991) *Bacillus brevis* Migula 1900 taxonomy: reassociation and base composition of DNA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41(4), 510-515.
- Nápoles VS, Serrat Díaz M, Ortega Delgado E, Ramos Barbosa H, Orberá Ratón T (2014) Efectos de *Brevibacillus bortelensis* B65 sobre la germinación y el desarrollo de posturas de hortalizas en fase de semillero. *Cultivos Tropicales*, 35(3), 17-23.
- Nazina TN, Tourova TP, Poltarau AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Ivanov MV (2001) Taxonomic study of aerobic Thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(2), 433-446.
- Negróni M (2009) *Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica*. 2a ed. Edición Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina 656 p.
- Nicholson WL (2002) Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(3), 410-416.
- Ooi T C, Ariff AB, Halimi MS, Shamsuddin ZH (2008) Growth kinetics of diazotrophs *Bacillus sphaericus* UPMB cultured using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. *Malaysian Journal of Microbiology* 4: 15-25.
- Ossa J, Vanegas M, Badillo A (2010) Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 13: 97-104.
- Panda AK, Bisht SS, DeMondal S, Kumar NS, Gurusubramanian G, Panigrahi A K (2014) *Brevibacillus* as a biological tool: a short review. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105(4), 623-639.

- Pedraza RO, Teixeira KR, Scavino A, de Salamone I, Baca BE, Azcón R, *et al.* (2010) Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria* 11: 155-164.
- Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR (2010) *Microbiology: an application based approach*. 5th Edition. Tata McGraw-Hill Publishing Company Ltd. New Delhi. 918p.
- Pieterse CM, van Pelt JA, Verhagen BW, Ton J, van Wees ACM, León-Kloosterziel KM, Van Loon LC (2003) Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Symbiosis*, 35(1-3), 39-54.
- Pírez M, Mota M (2000) Morfología y estructura bacteriana. *Revista en internet* 2018 3(2): 23-42.  
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>  
Fecha de consulta: 8 de diciembre.
- Prats G (2006) *Microbiología clínica*. Editorial Médica Panamericana. 1a ed. Madrid, España. 400p.
- Ramamoorthy V (2001) "Induction of Systemic Resistance by Plant Growth Promoting Rhizobacteria in Crop Plants against Pests and Diseases." *Crop Protection* 20(1): 1–11.  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0261219400000569>.
- Reinoso Pozo Y, Vaillant Flores D, Casadesús Romero L, García Pérez E y Pazos Álvarez-Rivera V (2007) Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, 11 (1): 35-40.
- Reinoso Pozo Y, Vaillant Flores D, Casadesús Romero L, García Pérez E y Pazos Álvarez-Rivera V (2012) Cepas de *Brevibacillus laterosporus* y *Brevibacillus brevis* antagonistas de bacterias y hongos fitopatógenos del cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *Fitosanidad* 11: 79-80.
- Restrepo-Correa SP, Pineda-Meneses EC, Ríos-Osorio LA (2017) Mecanismos de acción de hongos y bacterias empleados como biofertilizantes en suelos agrícolas: una revisión sistemática. *Corpoica. Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 335-351.
- Reynolds T (2004) *Aloes: The Genus Aloe*. Medical and aromatic plants-industrial profiles. Editorial CPR Press. 1a ed. Boca Ratón, Florida, EUA. 408 p.
- Robson RL, Postgate JR (1980) Oxygen and hydrogen in biological nitrogen fixation. *Annual Reviews in Microbiology*, 34(1), 183-207.

- Rodríguez DI, Santana GO, Recio LO y Fuentes NM (2006) Beneficios del *Aloe Vera* l. (sábila) en las afecciones de la piel. *Revista Cubana de Enfermería*, 22(3), 1-5.
- Rodríguez EG (2010) Influencia de la temperatura y de la humedad en la dinámica de la materia orgánica de los suelos de Galicia y su relación con el cambio climático. Tesis, Universidad Santiago de Compostela, España, 735 p.
- Sánchez-López DB, Gómez-Vargas RM, Garrido Rubiano MF, Bonilla Buitrago RR (2012) Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3: 1401-1415.
- Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology* 189: 8746-8749.
- Silva MVE (2017) Aislamiento e identificación de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, y evaluación de la capacidad de crecimiento en medios de cultivo a gran escala como alternativa de biofertilizante en cultivos de *Rosa* sp. Tesis, Quito:Universidad de las Américas, Ecuador, 81 p.
- Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Komagata K (1996) Proposal for Two New Genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 46(4), 939-946.
- Steenhoudt O, J Vandereyden (2000) "Azospirillum, Free-Living Nitrogen Fixing Bacterium Closely Associated with Grasses: Genetic, Biochemical and Ecological Aspects." *FEMS Microbiology Reviews* 24(4): 487–506.
- Sturz AV, Christie BR, Nowak J (2000) Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. *Critical reviews in plant sciences*, 19(1), 1-30.
- Swan H, Karalazos A (1990) Las melazas y sus derivados. *Revista Tecnología* 19: 78- 82.
- Takagi H, Shida O, Kadowaki K, Komagata K, Udaka S (1993) Characterization of *Bacillus brevis* with Descriptions of *Bacillus migulanus* sp. nov., *Bacillus choshinensis* sp. nov., *Bacillus parabrevis* sp. nov., and *Bacillus galactophilus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(2), 221-231.

- Takehige K, Ouchi K (1995) Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. *Journal of fermentation and Bioengineering* 79: 449-452.
- Tejera-Hernandez B, Rojas-Badía M, Heydrich-Pérez M (2011) Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas* 43: 131-138.
- Ureta A, Nordlund S (2002) Evidence for conformational protection of nitrogenase against oxygen in *Gluconacetobacter diazotrophicus* by a putative FeSII protein. *Journal of bacteriology*, 184(20), 5805-5809.
- Vanegas LMC (2015) Guías para el laboratorio de bacteriología. Editorial Universidad de los Andes. 1a ed. Bogotá, Colombia. 186 p.
- Vargas F T, Villazante CLG (2014) Clasificación de los Microorganismos. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 44(1), 2309- 2313.
- Verma JP, Yadav J, Tiwari KN, Jaiswal DK (2014) Evaluation of plant growth promoting activities of microbial strains and their effect on growth and yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in India. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 33-37.
- Vega A, Ampuero N, Díaz L, Lemus R (2005) El Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) como componente de alimentos funcionales. *Revista Chilena de Nutrición*, 32(3), 208-214.
- Vivas A, Biro B, Németh T, Barea JM, Azcón R (2006) Nickel-tolerant *Brevibacillus brevis* and arbuscular mycorrhizal fungus can reduce metal acquisition and nickel toxicity effects in plant growing in nickel supplemented soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(9), 2694-2704.
- Yang J, Kloepper JW, Choong MR (2009) "Rhizosphere Bacteria Help Plants Tolerate Abiotic Stress." *Trends in Plant Science* 14(1): 1–4.
- Zahid M, Kaleem MA, Hameed S, Rahim N (2015) "Isolation and Identification of Indigenous Plant Growth Promoting Rhizobacteria from Himalayan Region of Kashmir and Their Effect on Improving Growth and Nutrient Contents of Maize (*Zea Mays* L.)." *Frontiers in Microbiology* 6(MAR): 1–11.
- Zari S T, Zari T A (2015) A review of four common medicinal plants used to treat eczema. *Journal of Medicinal Plants Research* 9: 702-711.
- Zavaleta-Mejía E (2000) Alternativas del manejo de las enfermedades de las plantas, *Terra* 17:202-217.