

Evaluación de la capacidad antagónica de cepas del orden bacillales aisladas de lixiviados de lombricomposta sobre hongos fitopatógenos

Evaluation of antagonist capacity of bacillales strains isolated from vermicompost leachate on phytopatogenic fungi

Bruce Manuel Morales-Barrón*, Francisco J. Vázquez-González*, Raquel González-Fernández*, Antonio De La Mora-Covarrubias*, Miroslava Quiñonez-Martínez*, Ángel Gabriel Díaz-Sánchez*, Alejandro Martínez-Martínez*, Virginia Nevárez-Moorillón**, José Valero-Galván*^o

RESUMEN

El orden Bacillales se ha descrito como antagónico de fitopatógenos, además se ha mencionado en varios estudios algunas especies de este orden se encuentra en lixiviados de lombricomposta. En el presente estudio se evaluó el efecto antagónico de cinco cepas del orden Bacillales aisladas de lixiviados de lombricomposta sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani*, y *Rhizopus* sp. Se aislaron e identificaron cinco cepas bacterianas por características morfológicas y bioquímicas de los lixiviados de lombricomposta, las cuales junto con *Bacillus subtilis* "tipo" se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, siendo *Bacillus licheniformis* y *B. badius* las que mostraron los mejores resultados sobre los cinco hongos fitopatógenos evaluados. Estos resultados demuestran la presencia de cepas el orden Bacillales en los lixiviados de lombricomposta, así como su efecto antagónico de diversos hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

The Bacillales order has been reported to exhibit an antagonistic activity toward some phytopathogens. In addition, several studies have mentioned the presence of some species of this order in the vermicompost leachate. In the present study, the antagonistic effect of five Bacillales strains on the mycelial growth of *Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* and *Rhizopus* sp. was evaluated. Five bacterial strains were isolated from vermicompost leachate and identified by their morphological and biochemical characteristics. Subsequently these strains and a standard *Bacillus subtilis* strain were used to observe the competition against four fungi strains by determining the percentage inhibition of mycelial growth. Significant differences in percentage inhibition were founded among strains. The greatest antagonistic capacity was observed in *Bacillus licheniformis* and *B. badius*. Results showed that vermicompost leachate containing Bacillales strains could be used as a biocontrol agent of various pathogenic fungi, running to a more effective and environmentally-friendly product to control those phytopathogens.

Recibido: 7 de abril del 2016

Aceptado: 7 de septiembre del 2017

Palabras clave:

Bacillus sp.; competencia; hongos fitopatógenos.

Keywords:

Bacillus sp.; competition; fungal pathogens.

Cómo citar:

Morales-Barrón, B. M., Vázquez-González, F. J., González-Fernández, R., De La Mora-Covarrubias, A., Quiñonez-Martínez, M., Díaz-Sánchez, A. G., Martínez-Martínez, A., Nevárez-Moorillón, V., & Valero-Galván, J. (2017). Evaluación de la capacidad antagónica de cepas del orden bacillales aisladas de lixiviados de lombricomposta sobre hongos fitopatógenos. *Acta Universitaria*, 27(5), 44-54. doi: 10.15174/au.2017.1313

INTRODUCCIÓN

El composteo se ha convertido en una herramienta para disponer de los desechos orgánicos, que al incluir lombrices al proceso ha llevado a una mejor calidad. Se ha reportado que las lombrices aplicadas en el lombricomposteo benefician la estructura microbiana al pasar a través de su tracto

* Instituto de Ciencias Biomédicas, Departamento de Química-Biológicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Chihuahua, Chihuahua, México. Correo electrónico: jose.valero@uacj.mx

** Facultad de Ciencias Químicas. Nuevo Campus Universitario, Circuito Universitario, Universidad Autónoma de Chihuahua; Chihuahua, Chihuahua, México.

^o Autor de correspondencia.

digestivo además de que almacenan algunos metales pesados (Hong, Wook, Su, Sam & Sub, 2011), lo cual produce un humus y lixiviado rico en nutrientes como fósforo, potasio y con compuestos que funcionan en la disminución de diversas enfermedades en plantas (Scheuerell & Mahaffee, 2002). Estas enfermedades son producidas principalmente por hongos, bacterias, nematodos y virus fitopatógenos, de los cuales los hongos son el grupo de mayor relevancia económica, debido a que se conocen más de 8000 especies de hongos que producen enfermedades en las plantas (Juárez-Becerra, Sosa-Morales & López-Malo, 2010), en comparación de las 50 que producen enfermedades en el hombre o en los animales (Guarro, 2012). Con fines de controlarlos, se han desarrollado diversos productos químicos que terminan depositados en los suelos, afectando aguas colindantes y la atmósfera, generando un gran impacto ambiental (Ramírez & Lacasaña, 2001), en particular por la capacidad de adaptación de los fitopatógenos a estos compuestos. Se han reportado que especies de *Phytophthora* sp. (Silva-Rojas, Fernandez-Pavía, Góngora-Canul, Macías-López & Ávila-Quezada, 2009), *Fusarium* sp. (González-Pérez, Yañe-Morales, Ortega-Escobar & Velázquez-Mendoza, 2009) y *Alternaria* sp. (Chaerani & Voorrips, 2006) presentan una alta variabilidad genética, que los beneficia al generar resistencia a diversos compuestos químicos que se aplican al campo. Sin embargo, actualmente se han desarrollado nuevas tecnologías para el control de hongos fitopatógenos basándose en compuestos u organismos que de forma natural presenten un efecto biocontrol sobre estos organismos y sean amigables con el medio ambiente. Se ha descrito la reducción de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos al aplicar lixiviado de lombricomposta a cultivos agrícolas; sin embargo, no se ha descrito la procedencia de los compuestos que realizan este efecto inhibitorio (Scheuerell & Mahaffee, 2002), además la realización de lombricompostaje debe de ser precisa ya que en sus fases de pre-composteo y maduración del lombricompostaje puede generar organismos que afecten tanto el desarrollo de la lombriz, así como un buen producto que funcione como bio-fertilizante. Dentro de los lixiviados de lombricomposta se ha descubierto la presencia de bacterias del orden Bacillales, a las cuales se les ha reconocido como productoras de antibióticos, enzimas líticas, con capacidad de solubilización de fosfatos y de fijación biológica de nitrógeno (Chen *et al.*, 2006; Ooi, Ariff, Halimi & Shamsuddin, 2008; Tejera-Hernández, Rojas-Badia & Heydrich-Pérez, 2011). Además se han caracterizado como bacterias promotoras de crecimiento vegetal debido a la secreción de ácido

índole-3-acético giberelinas y citoquininas, que son hormonas que promueven el crecimiento y desarrollo de organismos vegetales (Beneduzi, Ambrosini & Passaglia, 2012; Bloemberg & Lugtenberg, 2001; Bottini, Cassan & Piccoli, 2004) y las cuales les dan características sobresalientes para ser utilizadas como sustituyentes de fitoquímicos y realizar un efecto bicontrol. *Bacillus subtilis* se ha descrito con capacidad antagonica contra *Sclerotium cepivorum*, *Penicillium* sp. (Astorguirós, Meneses-Montero, Zuñiga-Vega, Brenes-Madriz & Rivera-Mendez, 2013), *Fusarium oxysporum*, *S. rolfsii* y *Rhizoctonia solani* (Paredes-Escalante *et al.*, 2009). Esta especie previamente secreta quitinasas, que son proteínas encargadas de la degradación de la quitina que forma la pared celular de hongos (Tjalsma *et al.*, 2004). En menor medida se ha descrito la misma capacidad en cepas como *B. japonicum* (Mojica-Marín *et al.*, 2009), *B. megaterium* (Akgül & Mirik, 2008), *B. licheniformis* (Reinoso, Vaillant, Casadesus, Garcia & Alvarez-Rivera, 2007) y *B. amyloliquefaciens* (Sato, Fukuda & Morita, 2011). Las características que presentan las cepas del orden Bacillales las convierten en cepas con potencial como biocontroladoras de hongos fitopatógenos. Por tanto, en el presente estudio se realizó el aislamiento de cepas del orden Bacillales a partir de lixiviados de lombricomposta y se evaluó su capacidad antagonica frente a las cepas de *P. capsici*, *F. oxysporum*, *A. solani* y *Rhizopus* sp. con pruebas *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación de cepas del orden Bacillales

A partir de una muestra de 500 mL de lixiviado de lombricomposta obtenida en el Invernadero del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICB) de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez (UACJ) se extrajo 1 mL de muestra para obtener una dilución 1:10 con agua destilada como diluyente y se colocó a baño maría a 80 °C durante 15 min, esto con la finalidad de obtener organismos formadores de esporas. Posteriormente, se inoculó 1 µL de esta dilución de lixiviado en una caja Petri con agar nutritivo y se dejó incubar en una cámara de crecimiento (Sheldon Manufacturing, INC modelo: GI2) a 37 °C ± 1 °C por 48 h. Todas las colonias se caracterizaron morfológica y bioquímicamente según las pruebas descritas en el manual de Bergey's (Holt & Krieg, 1994). Con la finalidad de corroborar la identificación efectiva de las bacterias aisladas, se usó una cepa de *B. subtilis* "tipo" proporcionada del cepario del laboratorio de Microbiología de ICB. Para la

identificación de las cepas del género *Bacillus* se emplearon cultivos bacterianos crecidos en agar y caldo nutritivo por 48 h. Todas las cepas se sometieron a tinciones de Gram y Fulton-Schaeffer para determinar el diámetro del bacilo y tipo de spora; prueba de la catalasa (Becton-Dickinson); amilasa (JALMEK); hidrólisis de gelatina; ureasa; reducción de nitrato a nitrito (Becton-DickinsonA), NaCl al 6.5%, pH ácido y alcalino, Voges-Proskauer-Rojo de metilo (MCD LAB y B.D.); citrato de Simmons; producción de ácidos a partir de glucosa (Becton-Dickinson); xilosa (GOLDEN BELL), manitol y arabinosa (JALMEK) y crecimiento en anaerobiosis (ANA-PAK-SYSTEMS).

Origen y mantenimiento de las cepas de hongos

Se realizó un muestreo en la central de abastos ubicada en Ciudad Juárez, Chihuahua, recolectando frutos con incidencia de hongos del género *F. oxysporum* y *Rhizopus* sp., así como un muestreo de hojas con incidencia de hongos del género *A. solani* en una nogalera ubicada en Ciudad Juárez, Chihuahua, las cuales fueron transportadas al laboratorio en bolsas de plástico. Las muestras fueron procesadas y almacenadas según la metodología de Valero, González & González, (2014). La identificación de los hongos se realizó siguiendo las claves de Barnett & Hunter (1998). La cepa de *P. capsici* fue proporcionada por el cepario del laboratorio de Genética Aplicada de ICB.

Estandarización de inóculos de bacterias y hongos

Las cepas bacterianas se inocularon en 10 mL de medio nutritivo líquido incubando a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Se realizaron tres diluciones seriadas 1:10 con agua destilada colocando 5 μL de cada dilución en agar nutritivo e incubando a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h, posteriormente se contabilizaron las unidades formadoras de colonias (UFC). Este procedimiento se realizó por triplicado con cada una de las cepas de *Bacillus*. Con respecto a las cepas de hongos, se inoculó 1 cm^3 de agar con micelio en una caja de agar nutritivo y se midió el crecimiento radial de la colonia cada 24 h por 7 días, realizando el procedimiento con cada una de las cepas de *A. solani*, *Rhizopus* sp., *F. oxysporum* y *P. capsici*.

Competencia antagónica de las cepas del orden Bacillales

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar. Para la realización de la competencia

se basó en la metodología propuesta por Wang, Wang, Jin & Zheng (2013) con ciertas modificaciones. Se inoculó 1 cm^3 de agar con micelio de la cepa de hongo en cajas Petri con agar nutritivo y se dejaron incubar a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h para *A. solani*, 48 h para *P. capsici* y *F. oxysporum* y 24 h para *Rhizopus* sp. en una cámara de crecimiento. Al mismo tiempo se inoculó la cepa bacteriana en 10 mL de medio nutritivo líquido y se dejó incubar en una cámara de crecimiento a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al finalizar el periodo de incubación en la caja Petri se midieron tres puntos a 15 mm desde la orilla del halo de crecimiento micelial del hongo y se colocaron 5 μL de una dilución 1×10^3 UFC/ml de *Bacillus* en cada punto, al mismo tiempo se colocó un control sin inóculo bacteriano. Las cajas Petri se dejaron en incubación a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ en una cámara de crecimiento. El crecimiento micelial de la colonia con respecto al punto del inóculo se midió a 48 h, 72 h y 96 h. El procedimiento se realizó en tres cajas Petri con tres inóculos por caja con la finalidad de tener nueve repeticiones para cada competencia. Este procedimiento también se llevó a cabo para la cepa de *B. subtilis* "tipo". Los valores de crecimiento del micelio de las cinco cepas y la cepa de *B. subtilis* "tipo" se usaron para calcular el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial calculado con la siguiente la fórmula: $\% \text{ I.C.M.} = (C - T/C) \times 100$. Donde: $\% \text{ I.C.M.}$ es el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio. C = es el crecimiento del micelio al punto del inóculo en la caja de Petri correspondiente al control sin inóculo bacteriano; y T = es el crecimiento del micelio al punto del inóculo en la caja de Petri correspondiente al tratamiento.

Análisis estadísticos

Para evaluar si las cepas presentaban diferencias significativas en la inhibición del crecimiento micelial de los hongos, los valores del porcentaje de inhibición del crecimiento radial se evaluaron a través de un análisis de varianza (ANOVA), usando para ello el programa estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (versión 15.0). Posteriormente se aplicó una prueba múltiple de medias de Duncan para determinar el mayor porcentaje de inhibición.

RESULTADOS

El primer objetivo de este estudio fue realizar el aislamiento de las cepas del orden Bacillales de lixiviados de lombricomposta. En este sentido, se caracterizaron

cinco cepas de acuerdo a sus características morfológicas y bioquímicas todas pertenecientes al orden Bacillales. Dentro de la familia Bacillaceae se identificó a *B. circulans*, dos cepas de *B.adius* [aislado 1 (A1), aislado 2 (A2)] y *B. licheniformis*. También se aisló una cepa de la familia Paenibacillaceae de la cual se identificó como *P. alvei* (tabla 1).

El segundo objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de las bacterias aisladas del lixiviado sobre el crecimiento del micelio de cuatro hongos fitopatógenos. Los valores del porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio se evaluaron a través de una ANOVA. Los resultados mostraron que a las 48 h de incubación existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la inhibición del crecimiento del micelio (tabla 2). La bacteria *B.adius* A1 y *B. licheniformis* mostraron los porcentajes de inhibición más elevados sobre *F. oxysporum* (tabla 2). Con respecto a *P. capsici*, las cepas *B. licheniformis* y *P. alvei* inhibieron en mayor proporción. Sin embargo, *B. subtilis* "tipo" no mostró ningún efecto de inhibición contra este hongo. *P. alvei* y *B.adius* A2 presentaron los valores de inhibición más elevados sobre *Rhizopus* sp., caso contrario, *B. circulans* se comportó igual que el control. Las demás bacterias presentaron porcentajes de inhibición del 20%. Las cepas *B.adius* A2 y *B. subtilis* "tipo" mostraron un porcentaje de inhibición del 49% sobre *A. solani*, mientras que *B. circulans* mostró una inhibición del 24% (tabla 2).

A las 72 h de competencia también se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en todos los tratamientos (tabla 3). Las cepas *B.adius* A1 y *B. licheniformis* mostraron una inhibición de un 40% sobre *F. oxysporum*. Sin embargo, *B. subtilis* "tipo" solo inhibió un 20%. A este mismo tiempo *B. licheniformis* también mostró una inhibición del 64% sobre *P. capsici*, mientras *B. subtilis* "tipo" solo inhibió un 2%. El efecto inhibitorio sobre *Rhizopus* sp. se observó más efectivo por *P. alvei* al inhibir el 31% a diferencia de *B. circulans* y *B. subtilis* "tipo" que se comportan igual que el control. Las cepas de *B.adius* A1, *B.adius* A2, *B. licheniformis* y *B. subtilis* "tipo" mostraron un efecto inhibitorio muy similar de 30% a 40% sobre la cepa de *A. solani*. Sin embargo, el menor efecto se observó para la cepa *P. alvei* que presentó un valor de 10%.

Al evaluar la competencia de las bacterias a las 96 h también se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los porcentajes de inhibición (tabla 4). *B.adius* A1 y *B. licheniformis* mostraron los porcentajes de inhibición más elevados con valores arriba del

40%, mientras que la cepa de *B. subtilis* los valores más bajos de inhibición sobre *F. oxysporum* (tabla 4, figura 1), así mismo *B. licheniformis* inhibió en mayor proporción (70%) a *P. capsici*, sin embargo, la cepa *B. circulans* mostró el porcentaje de inhibición más bajo (tabla 4, figura 2). La cepa *P. alvei* presentó los valores de inhibición más elevados sobre *Rhizopus* sp., caso contrario a la cepa *B. circulans* y *B. subtilis* se comportaron igual que el control (tabla 4, figura 3). Las cepas *B.adius* A1 y A2, y *B. subtilis* mostraron un porcentaje de inhibición por arriba del 40% sobre la cepa de *A. solani*, mientras que *B. circulans* mostró una inhibición del 19% (tabla 4, figura 4).

Tabla 1. Pruebas bioquímicas, morfológicas, y fisiológicas de las cepas aisladas de lixiviados de lombricomposta.

Especie	a	b	c	d	e	f
Swolle cell	+	-	-	-	-	-
Espora	C	L	C	C	L	L
T° 55 C	+	-	-	-	+	+
pH 8	+	+	+	+	+	-
pH 5	+	+	+	-	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+
Anaerobiosis	-	-	-	-	-	-
Forma Colonial	R	P	PC	P	PC	RC
Rojo de Metilo	-	+	+	-	-	-
Nitrato	-	-	-	-	-	-
Glucosa	+	+	+	-	+	+
Ureasa	-	-	-	-	-	-
Gelatina	-	+	+	-	-	+
Arabinosa	+	+	+	-	+	+
Manitol	-	+	+	-	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+	+
NaCl 6.5%	+	+	+	+	+	+
Citrato de Simmons	-	-	-	-	+	+
Diámetro ≥1	-	-	+	-	-	-
V. P.	-	-	-	+	+	+
Almidón	+	+	+	+	+	+
Cepa	B1	B2	B3	B4	B5	<i>B. subtilis</i>

a) *B. circulans*; b) *B.adius* A1; c) *B.adius* A2; d) *P. alvei*; e) *B. licheniformis*; f) *B. subtilis*; + Positivo; - Negativo; R: Rizoides; P: Plana; PC: Plana cremosa; RC: Rizoides Cremosa; C: Céntrica; L: Lateral; V.P.: Voges-Proskauer.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 2.

Porcentaje de inhibición de seis bacterias del orden Bacillales sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *P. capsici*, *A. solani* y *Rhizopus* sp. después de un periodo de competencia de 48 h. Las diferentes letras en la columna indican diferencias significativas de $p < 0.05$.

Cepas	Hongos fitopatógenos			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. capsici</i>	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>A. solani</i>
<i>B. circulans</i>	0.00 ± 4.35 ^a	20.31 ± 10.04 ^{bc}	0.00 ± 0.00 ^a	24.44 ± 4.71 ^b
<i>B.adius</i> A1	19.78 ± 9.80 ^b	14.61 ± 9.99 ^b	20.74 ± 6.18 ^b	45.18 ± 2.94 ^d
<i>B.adius</i> A2	0.00 ± 12.58 ^a	25.38 ± 11.92 ^{cd}	26.66 ± 7.45 ^c	49.63 ± 3.51 ^e
<i>P. alvei</i>	0.00 ± 8.01 ^a	33.86 ± 14.92 ^d	31.11 ± 3.33 ^d	27.4 ± 4.00 ^b
<i>B. licheniformis</i>	23.73 ± 4.26 ^b	58.50 ± 11.10 ^e	20.00 ± 3.33 ^b	40.74 ± 5.21 ^c
<i>B. subtilis</i>	0.00 ± 4.79 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	20.00 ± 3.33 ^b	49.62 ± 4.84 ^e
Control	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 3.

Porcentaje de inhibición de las bacterias del orden Bacillales sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *P. capsici*, *Rhizopus* sp. y *A. solani* después de un periodo de competencia de 72 h. Las diferentes letras en la columna indican diferencias significativas de una $p < 0.05$.

Cepas	Hongos fitopatógenos			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. capsici</i>	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>A. solani</i>
<i>B. circulans</i>	21.48 ± 2.94 ^c	15.55 ± 3.33 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	19.47 ± 3.66 ^b
<i>B.adius</i> A1	40.00 ± 6.66 ^d	34.81 ± 6.47 ^c	19.25 ± 4.00 ^c	42.75 ± 5.91 ^{cd}
<i>B.adius</i> A2	18.51 ± 6.47 ^c	35.55 ± 4.71 ^c	27.4 ± 7.77 ^d	44.28 ± 5.2 ^{cd}
<i>P. alvei</i>	20.74 ± 8.46 ^c	30.37 ± 9.49 ^c	31.11 ± 3.33 ^d	20.95 ± 4.87 ^b
<i>B. licheniformis</i>	42.96 ± 3.51 ^d	71.11 ± 6.66 ^d	18.51 ± 2.94 ^c	39.78 ± 6.71 ^c
<i>B. subtilis</i>	8.89 ± 3.33 ^b	20.00 ± 4.71 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	47.30 ± 3.77 ^d
Control	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 4.

Porcentaje de inhibición de las bacterias del orden Bacillales sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *P. capsici*, *Rhizopus* sp. y *A. solani* después de un periodo de competencia de 96 h. Las diferentes letras en la columna indican diferencias significativas de una $p < 0.05$.

Cepas	Hongos fitopatógenos			
	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. capsici</i>	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>A. solani</i>
<i>B. circulans</i>	21.48 ± 2.94 ^c	15.55 ± 3.33 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	19.47 ± 3.66 ^b
<i>B.adius</i> A1	40.00 ± 6.66 ^d	34.81 ± 6.47 ^c	19.25 ± 4.00 ^c	42.75 ± 5.91 ^{cd}
<i>B.adius</i> A2	18.51 ± 6.47 ^c	35.55 ± 4.71 ^c	27.4 ± 7.77 ^d	44.28 ± 5.2 ^{cd}
<i>P. alvei</i>	20.74 ± 8.46 ^c	30.37 ± 9.49 ^c	31.11 ± 3.33 ^d	20.95 ± 4.87 ^b
<i>B. licheniformis</i>	42.96 ± 3.51 ^d	71.11 ± 6.66 ^d	18.51 ± 2.94 ^c	39.78 ± 6.71 ^c
<i>B. subtilis</i>	8.89 ± 3.33 ^b	20.00 ± 4.71 ^b	0.00 ± 0.00 ^b	47.30 ± 3.77 ^d
Control	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a

Fuente: Elaboración propia.

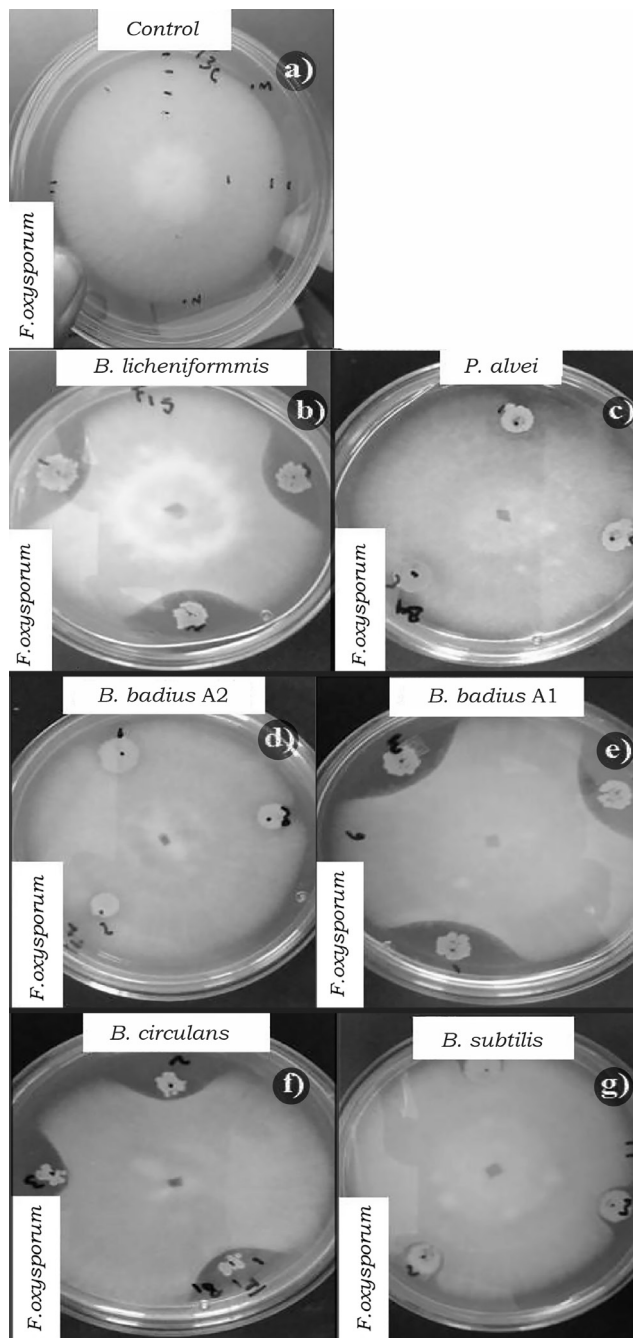


Figura 1. Efecto de las cepas del orden Bacillales en el crecimiento micelial de *F. oxysporum* a las 96 h de competencia. a) Control de *F. oxysporum*, b) *B. licheniformis* vs *F. oxysporum*, c) *P. alvei* vs *F. oxysporum*, d) *B.adius* A2 vs *F. oxysporum*, e) *B.adius* A1 vs *F. oxysporum*; f) *B. circulans* vs *F. oxysporum* y g) *B. subtilis* vs *F. oxysporum*.

Fuente: Elaboración propia.

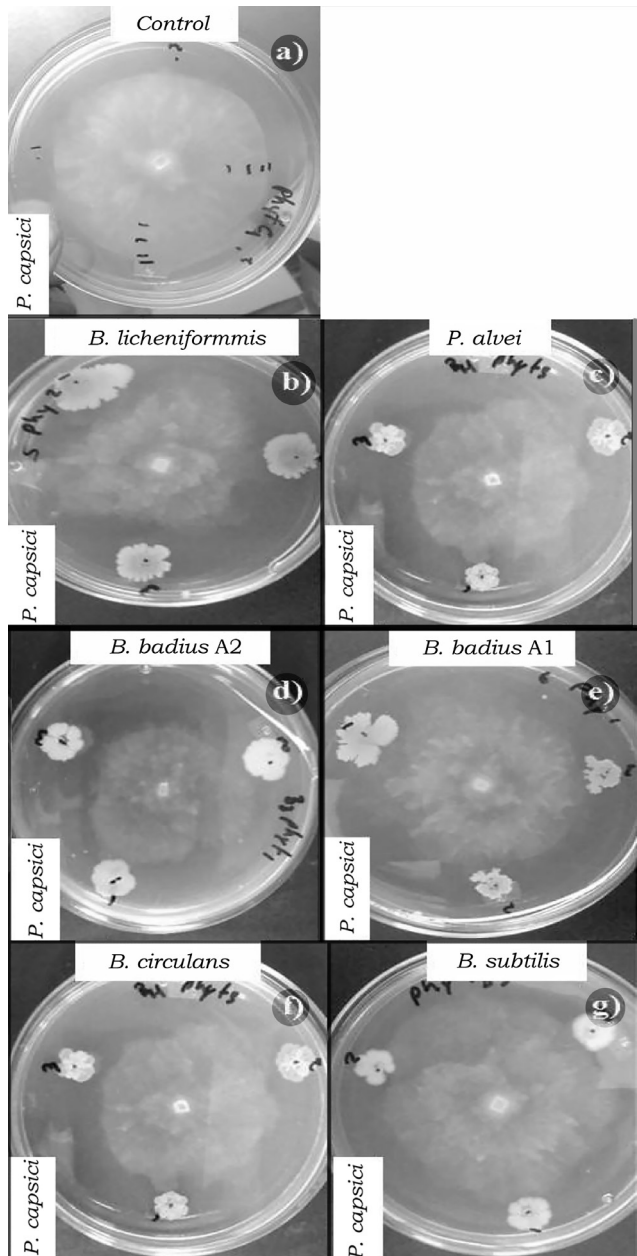


Figura 2. Efecto de las cepas del orden Bacillales en el crecimiento micelial de *P. capsici* a las 96 h de competencia. a) Control de *P. capsici*, b) *B. licheniformis* vs *P. capsici*, c) *P. alvei* vs *P. capsici*, d) *B.adius A2* vs *P. capsici*, e) *B.adius A1* vs *P. capsici*, f) *B. circulans* vs *P. capsici* y g) *B. subtilis* vs *P. capsici*.

Fuente: Elaboración propia.

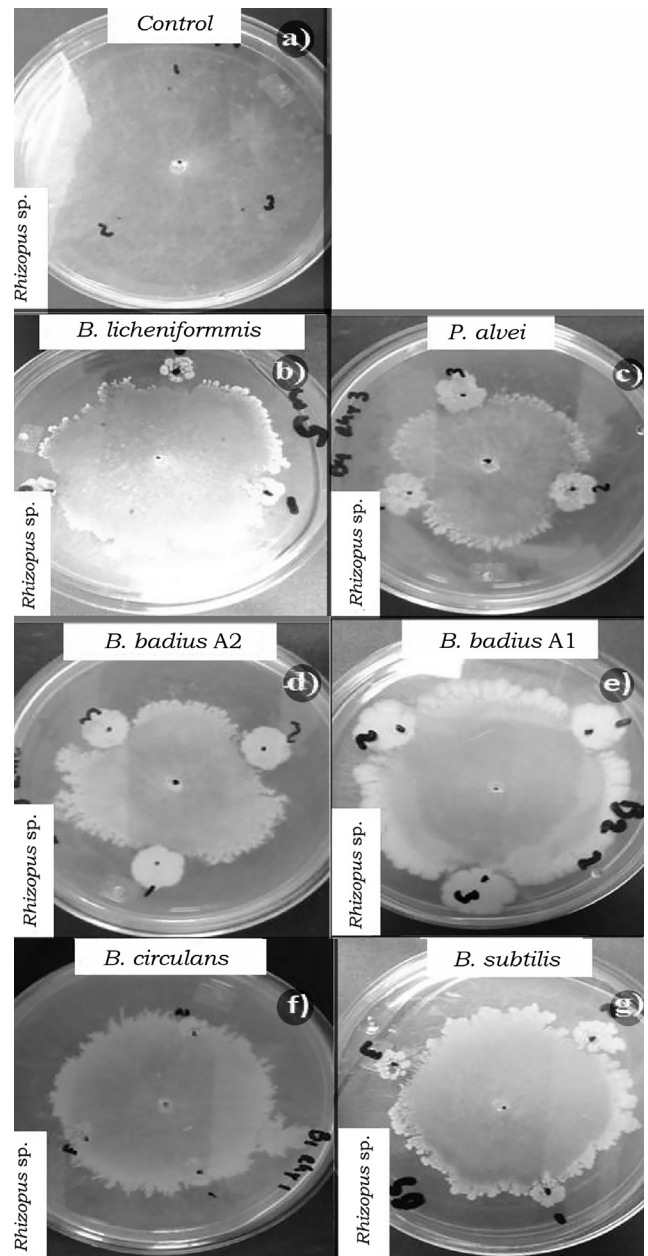


Figura 3. Efecto de las cepas del orden Bacillales en el crecimiento micelial de *Rhizopus sp.* a las 96 h de competencia. a) Control de *Rhizopus sp.* b) *B. licheniformis* vs *Rhizopus sp.*, c) *P. alvei* vs *Rhizopus sp.*, d) *B.adius A2* vs *Rhizopus sp.*, e) *B.adius A1* vs *Rhizopus sp.*, f) *B. circulans* vs *Rhizopus sp.* y g) *B. subtilis* vs *Rhizopus sp.*

Fuente: Elaboración propia.

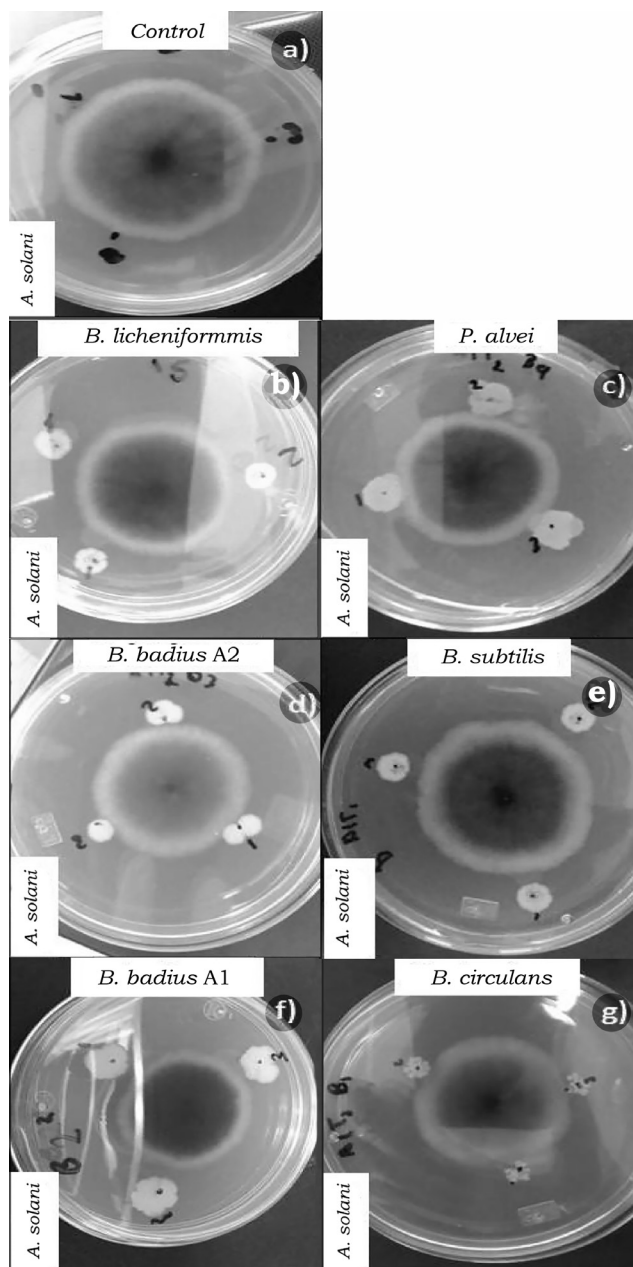


Figura 4. Efecto de las cepas del orden Bacillales en el crecimiento micelial sobre *A. solani* a las 96 h de competencia. a) Control de *A. solani*, b) *B. licheniformis* vs *A. solani*, c) *P. alvei* vs *A. solani*, d) *B.adius A2* vs *A. solani*, e) *B.adius A1* vs *A. solani*, f) *B. circulans* vs *A. solani* y g) *B. subtilis* vs *A. solani*.

Fuente: Elaboración propia.

DISCUSIÓN

El control de enfermedades en plantas producidas por los hongos patógenos se realiza principalmente con pesticidas sintéticos. Sin embargo, se ha demostrado que un gran número de productores agrícolas en pequeña escala no tienen el acceso a este tipo de productos. Aunado a esto, el uso inadecuado y la sobreexplotación de estos productos ha generado problemas ecológicos y de salud. Esto ha ocasionado un gran desafío para buscar productos más amigables con el medioambiente. Es por ello que se estudia el proceso de lombricompostaje en el cual se ha descrito la presencia de una amplia cantidad de bacterias que ayudan a la degradación de la materia orgánica (Félix-Herrán *et al.*, 2010). Uno de los grupos bacterianos que destacan en estos ambientes son las cepas del orden Bacillales las cuales se han reportado en el tracto digestivo de *Eiseia foetida* (Kim, Shin, Cha & Hur, 2004). Se ha descrito que estas bacterias secretan enzimas que no afectan a la lombriz y benefician la digestión y degradación de la materia orgánicas (Brito-Vega & Espinosa-Victoria, 2009). Un grupo importante de bacterias presentes en los lixiviados de lombricomposta es el del orden Bacillales el cual representa el 10% (Romero-Tepal *et al.*, 2014). En nuestro estudio se aislaron 5 cepas del orden Bacillales, cuatro pertenecientes al género *Bacillus*. Se ha descrito que estas especies de bacterias son endobiontes dentro del tracto digestivo de *E. foetida* (Kim *et al.*, 2004) y que tienen la capacidad de secreción de hormonas de crecimiento vegetal (Romero-Tepal *et al.*, 2014), sustancias con capacidad de solubilización de fosfatos, producción de ácido indolacético, sideróforos y tienen la capacidad de realizar una inhibición del crecimiento de hongos (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Además, la especie *P. alvei* (cepa B4) se ha descrito como degradadora de materia orgánica en procesos de compostaje (Silva *et al.*, 2009). Se conoce ampliamente que las especies pertenecientes al género *Bacillus* son genéticamente muy heterogéneas, alcanzando diferencias fenotípicas intraespecie de un 30% (Calvo & Zuniga, 2010) y presentan variaciones morfológicas y bioquímicas en las cepas de una misma especie (Nakamura, Roberts & Cohan, 1999), lo que hace que al identificar estas cepas presenten diferencias como las observadas en este estudio. En este sentido, se describió una variación intraespecie entre las cepas *B.adius A1* y *B.adius A2*, debido a que presentaron diferencias morfológicas coloniales y microscópicas al momento de la identificación (tabla 1). Las bacterias del orden Bacillales presentes en lixiviados de lombricomposta provienen de la materia

prima a lombricompostaje, sin embargo, existe una sucesión bacteriana al pasar por el tracto digestivo de la lombriz en la que las propiedades de las bacterias se mejoran y algunos casos se encuentran nuevas especies, además de que la competencia de microorganismos en el proceso beneficia a las bacterias para generar un efecto sobre otros organismos (De La Mora, Vazquez & Galvan, 2016).

Al evaluar la competencia de las bacterias contra las cepas de hongos fitopatógenos se observaron diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición (tabla 4). El uso de organismos que funcionan como biocontroladores de enfermedades causadas por hongos se ha estudiado ampliamente, sin embargo, hay pocos estudios relacionados con bacterias aisladas de lombricomposta. En este estudio se observó que *B. circulans* presenta valores bajos de inhibición de crecimiento para todos los tiempos evaluados. Estos resultados son contradictorios a los encontrados por Mehta, Chauhan, Mahajan & Shirkot (2010) en donde dicha bacteria inhibe el crecimiento micelial de *F. oxysporum* y *R. solani* (50%) y *Sclerotinia sclerotiorum* (55%). Esta especie se ha relacionado con la producción de sideróforos y la solubilización de fosfatos (Mehta *et al.*, 2010) y se ha comprobado que también es una especie secretora de quitinasa (Simonen & Palva, 1993); sin embargo, en el estudio la inhibición fue baja. Esto podría deberse al tiempo de adaptación y crecimiento de la colonia bacteriana en el medio, ya que presenta una adaptación completa hasta las 48 h a diferencia de las otras cepas que es a las 24 h. También se observó que el crecimiento micelial se mantiene constante sin una inhibición, este comportamiento se presentó principalmente en la competencia con *Rhizopus* sp. en la que se observa que a las 48 h de competencia *Rhizopus* creció hasta el filo de la caja Petri sin importar la presencia de la cepa.

La cepa *B. badius* A1 mostró diferencias significativas en la inhibición de *F. oxysporum* con respecto a *B. badius* A2, sin embargo, para *P. capsici*, *A. alternata* y *Rhizopus* sp. no mostró ninguna diferencia significativa entre ambas cepas (tabla 4). En otros estudios se ha observado una inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* sp., *Helmithosporium* sp., *Aspergillus* sp. (Raval & Desai, 2015), *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas* sp. (Kuta, Nimzing & Orka'a, 2009). La diferencia intraespecífica además de reflejarse en algunas bioquímicas se ve en la capacidad para inhibir organismos ya que no presenta la misma respuesta teniendo una variación en compuestos que secretan frente a competidores (tabla 4).

P. alvei presentó los valores de inhibición más altos para *Rhizopus* sp. inhibiendo en un 31% a las 96 h. Pero presentó valores bajos cuando se comparó con los otros hongos fitopatógenos, cabe resaltar que para las 48 h el porcentaje de inhibición en *F. oxysporum* es igual al control, en el que se observa una respuesta por parte del fitopatógenos a la presencia de *P. alvei* realizando un crecimiento de su micelio con la finalidad de ganar espacio disponible de nutrientes. Estos resultados son diferentes a los mostrados por esta cepa contra *Verticillium dahlie*. Contra este hongo se ha observado que esta cepa tiene la capacidad de secretar quitinasas las cuales reducen hasta un 70% el crecimiento micelial (Tjamos, Tsitsigiannis, Tjamos, Antoniou & Katinakis, 2004). Lo cual se infiere como mecanismo de inhibición para *Rhizopus* sp. en donde las quitinasas pueden degradar la pared del micelio impidiendo su desarrollo y crecimiento, sin embargo, la secreción no se presenta en abundancia y no se genera la misma respuesta al estar presente otros hongos.

B. licheniformis presentó los valores más altos de inhibición sobre *F. oxysporum* y *P. capsici* a las 96 h de competencia (tabla 4). Se ha reportado que esta bacteria tiene la capacidad de secreción de enzimas quitinolíticas, como quitinasas que hidrolizan el enlace glucosídico β 1-4 y degradan polímeros en oligómeros y monómeros en N-acetil-glucosamina (Sastoque-cala, Mercado-Reyes, Martínez-Salgado, Quevedo-Hidalgo & Pedroza-Rodríguez, 2007; Wang *et al.*, 2014) componentes principales en la pared del micelio de *F. oxysporum* y *A. alternata* (Bar-Nun, L'Hyvernay, Donèche & Mayer, 2007; Fesel & Zuccaro, 2016; Schoffelmeer, Klis, Sietsma & Cornelissen, 1999), además esta bacteria tiene la capacidad de la secretar glucanasas, las cuales degradan los enlaces β 1-3 glucanos y β 1-6 glucanos (Corrales, Sanchez, Cuervo, Joya & Marquez, 2012; Zakaria, 2012), los cuales son componentes principales en la estructura del micelio de *P. capsici* (Bartnicki-Garcia, 1966). Otros estudios han mostrado que además de glucanasas esta cepa puede secretar diversas proteasas, liasas e hidrolasas que benefician la inhibición del crecimiento micelial de diversos hongos fitopatógenos (Tang-Bing, Hai-yun & Li-Xian, 2012), por lo que es un posible mecanismo usado por la bacteria para causar un efecto sobre el crecimiento del micelio de los hongos. También se ha reportado la presencia de metabolitos secundarios que funcionan como inhibidores tales como la iturina A y surfactina que en presencia de un organismo son secretados para causar un daño y competir en la disponibilidad de alimentos (Ragazzo-Sánchez, Robles-Cabrera, Lomeli-Gonzalez,

Luna-Solano & Calderón-Santoyo, 2011). Los resultados mostrados en este estudio se relacionan con los reportados por Lim & Kim (2010) donde especifica que esta cepa tiene la capacidad de reducir la incidencia de *Phytophthora* (80%), *Fusarium* sp. (70%) (Corrales *et al.*, 2012) y *Rhizopus* sp. (42%) (Chávez-Díaz, Angoa-Pérez, López-Díaz, Velázquez-del Valle & Hernández-Lauzardo, 2014). Estos resultados muestran que esta bacteria presenta una capacidad de inhibición para una variedad amplia de cepas de hongos, aunque se desconoce todos los compuestos usados para realizar la inhibición en presencia de los diferentes hongos.

Se ha documentado que la especie bacteriana *B. subtilis* tiene características de inhibición para diversos hongos (Nagórska, Bikowski & Obuchowski, 2007) por lo que fue usada como control. Sin embargo, la cepa "tipo" utilizada en este estudio presentó los valores de inhibición más bajos en todos los tiempos, lo cual nos hace inferir que el método de preservación pudiera afectar a la capacidad de respuesta frente a organismos competidores. Esto se ha especulado entre algunos microbiólogos debido a que se pierde cierta capacidad al congelarse (Morales-García *et al.*, 2010). Algunos métodos de preservación como la congelación no son viables para la recuperación de las cepas después de un periodo largo (Parra, Pérez, Bernal, Suárez & Montoya, 2006). No obstante, no se descarta la capacidad de esta especie de inhibir el crecimiento de los hongos ya que se observa una pequeña capacidad de disminución del crecimiento sobre *F. oxysporum* y *P. capsici*, y en mayor medida sobre *A. solani*. Cabe resaltar que lo observado sobre el hongo del género *Rhizopus* sp. no es el comportamiento real, debido a que después de finalizar las 96 h de competencia se observó que en el momento de que el estolón o una hifa aérea alcanzara a tocar la cepa esta crecía sobre el micelio del hongo y en un lapso de 120 h se observaba la completa disminución del micelio de *Rhizopus* sp. Este comportamiento fue predominante en la cepa *B. licheniformis* y *B.adius* A2, estos datos no fueron reportados debido a que se desconocía este comportamiento por lo que se propone realizar estudios posteriores (figura 3).

De manera general se reporta la presencia de cepas del orden Bacillales dentro de los lixiviados de lombricomposta que contribuyen con la capacidad de inhibir hongos causantes de enfermedades en plantas y se destaca a la cepa de *B. licheniformis* (B5) y *B.adius* (B2) como potenciales biocontroladoras de hongos en cultivos vegetales, además de la aplicación de lixiviados de lombricomposta como biofertilizantes siempre que se realice el proceso adecuado de lombricomposteo.

CONCLUSIÓN

Las cepas del orden Bacillales se encuentran presentes en lixiviados de lombricomposta por lo que se destaca su capacidad para servir como beneficio para el suelo. Las cepas presentaron capacidad de inhibición sobre los hongos del género *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizopus* y *Phytophthora* observando la mayor capacidad en la cepa B5 identificada como *B. licheniformis* sobre *Phytophthora* y la cepa B2 que se identificó como *B.adius* ejerció un efecto casi igual para todos los hongos por lo que el uso de las cepas del orden Bacillales como biocontroladores de diversos hongos patógenos puede funcionar de manera efectiva y amigable para el ambiente.

REFERENCIAS

- Akgül, D. S., & Mirik, M. (2008). Biocontrol of phytophthora capsici on pepper plants by *Bacillus megaterium* strains. *Journal of Plant Pathology*, 90(1), 29-34.
- Astorga-quirós, K., Meneses-Montero, K., Zuñiga-Vega, C., Brenes-Madriz, J., & Rivera-Mendez, W. (2013). Evaluation of antagonism of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* against three garlic pathogens. *Tecnología en Marcha*, 27(2), 1-10.
- Bar-Nun, N., L'Hyvernay, A., Donèche, B., & Mayer, A. M. (2007). Changes in mycelial structure of *Botrytis cinerea* induced by removal of the glucan matrix. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, 41(3), 149-153.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. (1998). Illustrated Genera of Imperfect Fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 38(4), 480.
- Bartnicki-Garcia, S. (1966). Chemistry of hyphal walls of *Phytophthora*. *Journal of General Microbiology*, 42(1), 57-69.
- Beneduzi, A., Ambrosini, A., & Passaglia, L. M. P. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4 Suppl.), 1044-1051.
- Bloemberg, G. V., & Lugtenberg, B. J. J. (2001). Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion in Plant Biology*, 4(4), 343-50.
- Bottini, R., Cassan, F., & Piccoli, P. (2004). Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(5), 497-503.
- Brito-Vega, H., & Espinosa-Victoria, D. (2009). Bacterial diversity in the digestive tract of earthworms (oligochaeta). *Journal of Biological Sciences*, 9(3), 192-199.
- Calvo, P., & Zuniga, D. (2010). Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus* spp. aisladas de la rizosfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*, 9(1), 31-39.
- Chaerani, R., & Voorrips, R. E. (2006). Tomato early blight (*Alternaria solani*): The pathogen, genetics, and breeding for resistance. *Journal of General Plant Pathology*, 72(6), 335-347.

- Chávez-Díaz, I., Angoa-Pérez, V., López-Díaz, S., Velázquez-del Valle, M., & Hernández-Lauzardo, A. (2014). Antagonistic bacteria with potential for biocontrol on *Rhizopus stolonifer* obtained from blackberry fruits. *EDP Sciences*, 69(1), 41-46.
- Chen, Y. P., Rekha, P. D., Arun, A. B., Shen, F. T., Lai, W. A., & Young, C. C. (2006). Phosphate solubilizing bacteria from subtropical soil and their tricalcium phosphate solubilizing abilities. *Applied Soil Ecology*, 34(1), 33-41.
- Corrales, L. C., Sanchez, L., Cuervo, J., Joya, A., & Marquez, K. (2012). Efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* sp., bajo condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris* L.). *Nova, Publicación Científica En Ciencias Biomedicas*, 10(17), 1794-2470.
- De La Mora, A., Vazquez, F., & Galvan, J. V. (2016). Sucesión bacteriana del género *Bacillus* en el proceso de compostaje y lombricompostaje con diferentes fuentes de estiércol. *Medio Ambiente y Desarrollo Sustentable*, X(October), 23-31.
- Félix-Herrán, J. A., Serrato-Flores, R., Armenta-Bojorquez, A. D., Rodríguez-Quiroz, G., Martínez-Ruiz, R., Azpiroz-Rivero, H. S., & Olalde-Portugal, V. (2010). Propiedades Microbiológicas De Compostas Maduras Producidas a Partir De Diferente Materia Orgánica. *Ra Ximhai*, 6(1), 105-113.
- Fesel, P. H., & Zuccaro, A. (2016). B-glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology*, 90, 53-60.
- González-Pérez, E., Yañe-Morales, M., Ortega-Escobar, H., & Velázquez-Mendoza, J. (2009). Comparative Analysis among Pathogenic Fungal Species that Cause Gladiolus (*Gladiolus grandiflorus* Hort.) *Comm Rot in Mexico*, 27(1), 45-52.
- Guarro, J. (2012). Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 30(1), 33-39.
- Holt, J., & Krieg, N. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.
- Hong, Wook, S., Su, I., Sam, J., & Sub, K. (2011). Culture-based and denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the bacterial community structure from the intestinal tracts of earthworms (*Eisenia fetida*). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(9), 885-892.
- Juárez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E., & López-Malo, A. (2010). Hongos Fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 14-23.
- Kim, H., Shin, K., Cha, C., & Hur, H. (2004). Analysis of aerobic and culturable bacterial community structures in earthworm (*Eisenia fetida*) intestine. *Agricultural Chemistry & Biotechnology*, 47(3), 137-142.
- Kuta, F. A., Nimzing, L., & Orka'a, P. (2009). Screening of *Bacillus* Species with Potentials of Antibiotics Production. *Applied Medical Informatics*, 24(1), 42-46.
- Lim, J., & Kim, S. (2010). Biocontrol of Phytophthora Blight of Red Pepper Caused by *Phytophthora capsici* Using *Bacillus subtilis* AH18 and *B. licheniformis* K11 Formulations. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 53(6), 766-773. doi: 10.3839/jksabc.2010.116
- Mehta, P., Chauhan, A., Mahajan, R., Mahajan, P. K., & Shirkot, C. K. (2010). Strain of *Bacillus circulans* isolated from apple rhizosphere showing plant growth promoting potential. *Current Science*, 98(4), 538-542.
- Mojica-Marín, V., Luna-Olvera, H. A., Sandoval-Coronado, C. F., Pereyra-Alfárez, B., Morales-Ramos, L., González-Aguilar, N., & Alvarado-Gómez, O. (2009). Control biológico de la marchitez del chile (*Capsicum annum* L.) por *Bacillus thuringiensis* Biological control of chili pepper root rot (*Capsicum annum* L.) by *Bacillus thuringiensis*. *Revista Internacional de Botánica Experimental*, 78(618), 105-110.
- Morales-García, Y., Duque, E., Rodríguez-Andrade, O., De la Torre, J., Martínez-Contreras, R.-D., Pérez-Y-Terrón, R., & Muñoz-Rojas, J. (2010). Bacterias Preservadas, una Fuente Importante de Recursos Biotecnológicos. *Bio Tecnología*, 14(2), 11-29.
- Nagórská, K., Bikowski, M., & Obuchowski, M. (2007). Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54(3), 495-508.
- Nakamura, L. K., Roberts, M. S., & Cohan, F. M. (1999). Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49 Pt 3, 1211-1215.
- Ooi, T. C., Ariff, A. B., Halimi, M. S., & Shamsuddin, Z. H. (2008). Growth kinetics of diazotrophic *Bacillus sphaericus* UPMB10 cultured using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. *Malaysian Journal of Microbiology*, 4(2), 15-25.
- Paredes-Escalante, J., Carrillo-Fasio, J., García-Estrada, R., Allende-Molar, R., Sañudo-Barajas, J., & Valdez-Torres, J. (2009). Microorganismos Antagonistas para el Control del Complejo de Hongos Causantes de la Rabia del Garbanzo (*Cicer arietinum* L.) en el Estado de Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1), 27-36.
- Parra, S., Pérez, M., Bernal, M., Suárez, Z., & Montoya, D. (2006). Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (IBUN). *Nova - Publicación Científica*, 4(5), 39-49.
- Ragazzo-Sanchez, J., Robles-Cabrera, A., Lomeli-Gonzalez, L., Luna-Solano, G., & Calderón-Santoyo, M. (2011). Selección de cepas de *Bacillus* spp. productoras de antibióticos aisladas de frutos tropicales. *Revista Chapingo Serie Horticultural*, 17(Especial 1), 5-11.
- Ramírez, J. A., & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: Clasificación, Uso, Toxicología Y Medición De La Exposición. *Archivos de Prevención de Riesgos Laborales*, 4(2), 67-75.
- Raval, A., & Desai, P. (2015). Study of the Diverse Bio controlling Potential of *Bacillus* Species for Plant Growth Promotion. *International Journal of Current Research Academic Review*, 3(12), 124-138.
- Reinoso, Y., Vaillant, D., Casadesus, L., Garcia, E., & Alvarez-Rivera, V. (2007). Selección de cepas de *bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanida*, 11(1), 35-40.
- Romero-Tepal, E. M., Contreras-Blancas, E., Navarro-Noya, Y. E., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Luna-Guido, M., Gutiérrez-Miceli, F. A., & Dendooven, L. (2014). Changes in the bacterial community structure in stored wormbed leachate. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 24(2), 105-113.
- Sastoque-cala, L., Mercado-Reyes, M., Martínez-Salgado, M., Quevedo-Hidalgo, B., & Pedroza-Rodríguez, A. (2007). Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de residuos de camarón. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 6(2), 137-146.

- Sato, T., Fukuda, T., & Morita, H. (2011). Glucoamylase Production in Submerged Co-Culture System of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Rhizopus cohnii*. *Japan Journal of Food Engineering*, 12(2), 55-63.
- Scheuerell, S., & Mahaffee, W. (2002). Compost tea: Principles and prospects for plant disease control. *Compost Science & Utilization*, 10(4), 313-338.
- Schoffemeer, E. A., Klis, F. M., Sietsma, J. H., & Cornelissen, B. J. (1999). The cell wall of *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genetics and Biology*, 27(2-3), 275-82.
- Silva-Rojas, H., Fernandez-Pavía, S., Góngora-Canul, C., Macías-López, B., & Ávila-Quezada, G. (2009). Distribución Espacio Temporal de la Marchitez del Chile (*Capsicum annuum* L.) en Chihuahua e Identificación del Agente Causal in Chihuahua and Identification of the Causal Agent Phytophthora. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(2), 134-147.
- Silva, C. F., Azevedo, R. S., Braga, C., da Silva, R., Dias, E. S., & Schwan, R. F. (2009). Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the production of *Agaricus brasiliensis*. *Brazilian Journal of Microbiology: Publication of the Brazilian Society for Microbiology*, 40(3), 590-600.
- Simonen, M., & Palva, I. (1993). Protein secretion in *Bacillus* species. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 57(1), 109-137.
- Tang-Bing, C., Hai-yun, C., & Li-Xian, J. (2012). Isolation and Partial Characterization of an Antifungal Protein Produced by *Bacillus licheniformis* BS-3. *Molecules*, 17(6), 7336-7347.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badia, M., & Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos, 42(3), 131-138.
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J., Braun, P., Darmon, E., Dorenbos, R., Jean-Yves, F. D., Westers, H., Geeske, Z., Wim, J. Q., Kuipers, O. P., Bron, S., Hecker, M., & Van-Dijl, J. (2004). Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the Secrets of the Secretome Proteomics of Protein Secretion by *Bacillus subtilis*: Separating the "Secrets" of the Secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2, 68(2), 207-233.
- Tjamos, E. C., Tsitsigiannis, D. I., Tjamos, S. E., Antoniou, P. P., & Katinakis, P. (2004). Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. *European Journal of Plant Pathology*, 110(1), 35-44.
- Valero Galván, J., González Díaz, C. A., & González Fernández, R. (2014). Effect of aqueous extracts of leaves of creosote bush (*Larrea tridentata*), tarbush (*Flourensia cernua*) and oak (*Quercus pungens*) on in vitro mycelial growth of phytopathogenic fungi. *Acta Universitaria*, 24(5), 13-19.
- Wang, X., Wang, J., Jin, P., & Zheng, Y. (2013). Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 164(2-3), 141-147.
- Wang, Z., Wang, Y., Zheng, L., Yang, X., Liu, H., & Guo, J. (2014). Isolation and characterization of an antifungal protein from *Bacillus licheniformis* HS10. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 454(1), 48-52.
- Zakaria, E. (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: Their potential in antifungal biocontrol. *The Journal of Microbiology*, 50(1), 103-111.