



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
Facultad de Tecnología de la Construcción

Monografía

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICROBIANA (MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR) EN LA BÚSQUEDA DE *Bacillus subtilis* A PARTIR DE BIOINSUMOS COMERCIALES Y PRUEBAS DE ANTAGONISMO FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS

Para optar al título de Ingeniero Agrícola

Elaborado por

Br. Mario Sergio Flores Hernández

Br. Erick Vicente Roque Castellano

Tutor

PhD. Leandro Alberto Páramo Aguilera

Asesor

Ing. José Mamerto Méndez Úbeda

Managua, Marzo 2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
Programa de Investigación y Estudios Nacionales y Servicios Ambientales
PIENSA-UNI



RUC J013000006891

Telefax No.22781462 (Planta Dirección PIENSA/UNI) ext 102

MANAGUA, NICARAGUA

Managua, 07 de Marzo del 2017.

Dr. Oscar Gutiérrez Somarriba.
Decano, Facultad de Tecnología de la Construcción.

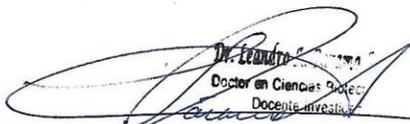
Apreciado Dr. Somarriba:

Al arribar al final de esta etapa del trabajo que corresponde a la tesis de grado titulada: *"Aislamiento y Caracterización microbiana (Microbiológica y molecular) en la búsqueda de Bacillus subtilis a partir de bioinsumos comerciales y pruebas de Antagonismo frente a hongos fitopatógenos"* y que fuera desarrollada por los Bachilleres **Mario Sergio Flores Hernández y Erick Vicente Roque Castellano**; me complace presentar ante su autoridad un trabajo que no solo ha cumplido con los requisitos científicos de rigor y los objetivos que se propuso para el mismo, sino que podemos decir con toda certeza que constituye un valioso aporte al conocimiento hasta ahora existente sobre los bioinsumos en Nicaragua y su constitución microbiológica.

Debo reconocer el gran esfuerzo desarrollado por los Bachilleres Flores y Roque al desarrollar este trabajo, ya que debieron estudiar diversos contenidos que no figuran en su perfil profesional como ingeniero agrícola y esto desde luego constituye una gran ganancia para la formación profesional de los mismos. Así mismo destaco la capacidad autodidáctica demostrada, su disciplina de trabajo y deseos de superación demostrada en todo el tiempo de la investigación.

Es debido a todo lo antes expuesto que con mucho respeto, solicito ante usted (en su calidad de Decano de la Facultad de Tecnología de la Construcción) que considere someter el presente trabajo a presentación y defensa para que los Bachilleres Flores y Roque opten el título de Ingeniero Agrícola que mi juicio y consideración los mismos han cumplido y finalizado con calidad el trabajo que hoy presentan.

Agradeciéndole, le saluda cordialmente.



Dr. Leandro Páramo Aguilera
Doctor en Ciencias Exactas
Docente Investigador

PhD. Leandro Alberto Páramo Aguilera
Tutor de tesis. Programa PIENSA-UNI.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
FACULTAD DE TECNOLOGIA DE LA CONSTRUCCION
DECANATURA

DEC-FTC-REF-No.0118
Managua, Octubre 24 del 2016

Bachilleres
MARIO SERGIO FLORES HERNÁNDEZ
ERICK VICENTE ROQUE CASTELLANO
Su despacho

Estimados Bachilleres:

Atendiendo a su solicitud de hacer el cambio en el Título de su protocolo de monografía: **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICROBIANA (MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR) EN LA BÚSQUEDA DE BACILLUS SUBTILIS A PARTIR DE BIOINSUMOS COMERCIALES Y PRUEBAS DE ANTAGONISMO FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS (FUSARIUM SP, ALTERNARIA SOLANI Y RHIZOCTONIA SOLANI)”**. Por **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICROBIANA (MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR) EN LA BÚSQUEDA DE BACILLUS SUBTILIS A PARTIR DE BIOINSUMOS COMERCIALES Y PRUEBAS DE ANTAGONISMO FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS”**.

Esta Decanatura aprueba la misma, Considerando los problemas planteados en su comunicación.

Sin otro particular y deseándoles una exitosa culminación de su monografía me despido.

Atentamente,


Dr. Ing. Oscar Gutiérrez Somarriba
Decano

CC: Protocolo
Tutor
Archivo*Consecutivo
IJGG*Dara



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
FACULTAD DE TECNOLOGIA DE LA CONSTRUCCION
DECANATURA

DEC-FTC-REF-No.040
Managua, Abril 26 del 2016

Bachilleres
MARIO SERGIO FLORES HERNÁNDEZ
ERICK VICENTE ROQUE CASTELLANO
Estimados Bachilleres:

Es de mi agrado informarles que el PROTOCOLO de su Tema MONOGRAFICO, titulado "AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICROBIANA (MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR) EN LA BÚSQUEDA DE BACILLUS SUBTILIS A PARTIR DE BIOINSUMOS COMERCIALES Y PRUEBAS DE ANTAGONISMO FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS (FUSARIUM SP, ALTERNARIA SOLANI Y RHIZOCTONIA SOLANI)", ha sido aprobado por esta Decanatura.

Asimismo les comunico estar totalmente de acuerdo, que el Dr. LEANDRO PÁRAMO AGUILERA, sea el tutor de su trabajo final.

La fecha límite, para que presenten concluido su documento, debidamente revisado por el tutor guía será el **26 de Octubre del 2016**.

Esperando puntualidad en la entrega de la Tesis, me despido.

Atentamente,


UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
Facultad de Tecnología de la Construcción
Dr. Ing. Oscar Gutiérrez Somarriba
Decano

CC: Protocolo
Tutor
Archivo*Consecutivo
IJG*Dara



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERIA
FACULTAD DE TECNOLOGIA DE LA CONSTRUCCION
DECANATURA

DEC.FTC.REF No. 0145
Managua, 24 Octubre del 2016.

Bachilleres
MARIO SERGIO FLORES HERNÁNDEZ
ERICK VICENTE ROQUE CASTELLANO
Presentes

Estimados Bachilleres:

En atención a su carta de solicitud de **PRORROGA (DE 3 MESES)**, para finalizar su trabajo De **Monografía** titulado **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN MICROBIANA (MICROBIOLÓGICA Y MOLECULAR) EN LA BÚSQUEDA DE BACILLUS SUBTILIS A PARTIR DE BIOINSUMOS COMERCIALES Y PRUEBAS DE ANTAGONISMO FRENTE A HONGOS FITOPATÓGENOS”**. Esta Decanatura aprueba la misma considerando los problemas planteados en su comunicación.

Deberá presentar concluido su documento debidamente revisado por el tutor guía el **24 Enero del 2016**.

Esperando de ustedes puntualidad en la entrega de su trabajo final, me despido.

Atentamente,



Dr. Ing. Oscar Gutiérrez Somarriba
Decano

CC: Tutor
Archivo-Consecutivo

Dedicatoria

A mi Dios, por ser mi roca y mi fortaleza, por las bendiciones que ha puesto en mi camino y que me han ayudado a ser una mejor persona.

A mis padres, por ser luz en mi vida, por ser un ejemplo de honestidad y fortaleza, por brindarme sus sabios consejos y apoyarme día a día en las metas que me he propuesto.

A mis hermanas y a mi novia por ser esas bendiciones que Dios me ha regalado, por ser fuente de inspiración y motivarme a dar lo mejor de mí en cada proyecto que emprendo.

Mario Sergio Flores Hernández

Agradecimiento

A Dios, por haberme permitido cumplir esta meta, regalarme salud y una familia maravillosa.

A mis Padres: Mario José Flores Jirón y Silvia Argentina Hernández Mercado, por brindarme su inmenso amor, apoyo incondicional y por su esfuerzo para darme la oportunidad de prepararme profesionalmente, los amo.

A mis hermanas Marjourie y Silvia por sus palabras de aliento y constante compañía. De igual manera a mis sobrinas Guadalupe y Monserrat por ser fuente de alegría y de inspiración en mi hogar.

A María-Ángeles Gómez Echaverry, mi novia, por su amor sincero, consejos oportunos y motivación durante todos estos años.

A nuestro tutor Dr. Leandro Páramo y asesor Ing. José Méndez por confiar en nosotros para la realización de este proyecto, por su paciencia y guía en todas las etapas de este.

Al PIENSA por abrirnos las puertas y permitirnos el uso de sus laboratorios para el desarrollo de esta investigación, en especial al personal del Laboratorio de microbiología de las aguas Lic. Omara Gari y Hassel Aragón, por sus buenos consejos y amistad.

A mis amigos, familiares, profesores y demás personas que de una u otra manera aportaron con sus sugerencias, comentarios e hicieron posible alcanzar este logro tan importante en mi vida.

Mario Sergio Flores Hernández

Dedicatoria

A Dios sobre todas las cosas, por llenarme de vida y fortalecer mi corazón, por haber puesto en mi vida cada una de sus bendiciones, porque todo se logra con su ayuda

A mi madre Amanda Castellano, por ser fuente de mi motivación personal, quien con sus palabras de aliento no me deja caer en los momentos difíciles, para que siempre siga adelante.

A mi padre Vicente Roque, por su apoyo y sus consejos, por haber llenado mi vida de buenos valores orientándome por el camino del bien.

A mi hermana Blanca Roque, por ser el ejemplo de una hermana mayor, por brindarme su confianza, consejos y oportunidades, contribuyendo a lograr mis metas y objetivos propuestos.

A mis hermanos, por todo el apoyo moral y económico, por inspirarme a desarrollarme como profesional.

Erick Vicente Roque Castellano

Agradecimiento

A Dios, por el regalo maravilloso de la vida y guiar mis pasos cuando el camino se pone difícil. Por darme la sabiduría y fortaleza para enfrentar las dificultades, darme lo necesario para conquistar mis metas.

A mis padres y mis hermanos, por darme todo el apoyo incondicional todos estos años y por depositar toda su confianza en mí.

A nuestro tutor Dr. Leandro Alberto Páramo Aguilera y nuestro asesor Ing. José Mamerto Méndez Úbeda, por su dedicación y por compartir sus conocimientos profesionales para la elaboración de este proyecto monográfico.

Al personal del laboratorio de microbiología de aguas y al PIENSA, por su apoyo brindado en esta investigación.

A todos los amigos que me acompañaron en esta formación profesional, con los que compartí buenos momentos y a los que compartieron su confianza conmigo, especialmente aquellos que me motivaron en la elaboración de este proyecto.

Gracias a todos.

Erick Vicente Roque Castellano

“Si de todos los organismos creados por Dios los más pequeños y aparentemente menos útiles fueran suprimidos, la vida se tornaría imposible, ya que el regreso a la atmósfera y al reino mineral de todo lo que dejó de vivir sería bruscamente suprimido”.

LOUIS PASTEUR

RESUMEN

El control de microorganismos fitopatógenos mediante el uso de microorganismos antagonistas es una práctica mundial, lo que ha llevado a la investigación y búsqueda de nuevos aislamientos que sean efectivos en el control biológico. Especial atención ha sido puesta en la bacteria *Bacillus subtilis*, que ha sido reportada con un gran potencial en el control de fitopatógenos y otras características que le permiten promover el crecimiento de los cultivos, directa y/o indirectamente. Mediante esta investigación, realizada en el laboratorio de microbiología de aguas del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales, PIENSA-UNI, se caracterizó microbiológica y molecularmente la diversidad microbiana cultivable de bioinsumos comerciales producidos artesanalmente en Nicaragua, en la búsqueda de cepas nativas de *Bacillus subtilis* que permitieron el posterior desarrollo de pruebas de antagonismo in vitro frente a hongos fitopatógenos de interés agrícola.

Para desarrollar la caracterización microbiológica y molecular se aislaron y caracterizaron microorganismos cultivables de 4 bioinsumos comerciales provenientes del occidente y norte de Nicaragua. Para esto se utilizaron 3 medios de cultivo enriquecidos: Agar nutritivo (AN), Agar Plate Count (PCA) y Agar Papa Dextrosa (PDA). Esta caracterización involucró la identificación morfológica de los microorganismos mediante pruebas como: tinción Gram, para el caso de bacterias, tinción simple para hongos levaduriformes y esporas en el caso de hongos filamentosos a través de observaciones al microscopio de luz. Las secuencias genómicas para cada microorganismo en estudio, fueron obtenidos como un servicio solicitado al Centro de Biología Molecular (CBM) de la Universidad Centroamericana (UCA) y procesadas posteriormente para la obtención de los árboles filogenéticos. Finalmente, se realizó una confrontación dual de aquellas bacterias con propiedades inhibitorias frente a los hongos fitopatógenos involucrados en este estudio.

Como resultado del presente trabajo se logró aislar una diversidad de microorganismos entre los que se encuentran 23 bacterias, 6 hongos filamentosos y 1 levaduriforme (posible *Aerobasidium pullulans*). Como producto de la secuenciación del gen ADNr 16s para 14 bacterias, se obtuvo un predominio del género *Bacillus* con 10 aislados, 2 de estos *B. subtilis*; y de la región ITS1 se identificaron los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium sp.* Finalmente, se evaluó el efecto antagónico de las bacterias con propiedades inhibitorias mediante confrontación dual, resultando la cepa *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) con los mejores porcentajes de inhibición cuando se realizan pruebas de antagonismo frente a todas las cepas de fitopatógenos (rango 50-100% de inhibición). Otros resultados de interés fueron obtenidos mediante la identificación de *Bacillus megaterium* y la utilización de *Rhizobium sp.*

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
III. JUSTIFICACIÓN	4
IV. OBJETIVOS	6
4.1. Objetivo General	6
4.2. Objetivos Específicos	6
V. MARCO TEÓRICO	7
5.1. Bioinsumos	7
5.2. Microorganismos	7
5.2.1. Bacterias	8
5.2.2. Hongos	12
5.3. Cultivo de microorganismos en el laboratorio	16
5.3.1. Requerimientos nutricionales de los microorganismos	16
5.3.2. Aislamiento de microorganismos	17
5.4. Identificación molecular de microorganismos	20
5.4.1. Fundamento de las técnicas de identificación molecular	20
5.4.2. Bioinformática	23
5.5. Antagonismo microbiano para el control fitosanitario	25
5.5.1. Género <i>Bacillus</i> como biocontrolador de enfermedades	27
VI. DISEÑO METODOLÓGICO	30
6.1. Ubicación del estudio	30
6.2. Métodos	30
6.2.1. Recolección de bioinsumos comerciales	30
6.2.2. Aislamiento de microorganismos	30
6.2.3. Identificación morfológica de los microorganismos de bioinsumos	34
6.2.4. Conservación de los microorganismos aislados	36
6.2.5. Identificación molecular de los microorganismos seleccionados	36
6.2.6. Pruebas de antagonismo	40
VII. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	44
7.1. Aislamiento de microorganismos	44
7.2. Identificación morfológica de los microorganismos	47
7.2.1. Identificación Gram de bacterias	47
7.2.2. Identificación de hongos filamentosos de los bioinsumos según su tipo de espora	50

7.2.3. Identificación de levaduras _____	53
7.2.4. Identificación de hongos fitopatógenos según su tipo de espora _____	54
7.3. Identificación molecular de los microorganismos seleccionados _____	56
7.3.1. Identificación molecular de bacterias _____	57
7.3.2. Identificación molecular de hongos fitopatógenos _____	61
7.4. Pruebas de antagonismo _____	65
7.4.1. Preselección de cepas antagonistas (screen grueso) _____	65
7.4.2. Evaluación del efecto antagónico _____	68
CONCLUSIONES _____	74
RECOMENDACIONES _____	76
BIBLIOGRAFÍA _____	77

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Evolución del mundo vivo basada en la estructura del ARN de los ribosomas. _____</i>	<i>8</i>
<i>Figura 2. Distintas formas bacterianas. _____</i>	<i>9</i>
<i>Figura 3. Técnica de Gram. _____</i>	<i>11</i>
<i>Figura 4. Partes de un hongo microscópico. _____</i>	<i>12</i>
<i>Figura 5. Marchitez causada por Fusarium oxysporum en cultivo de tomate. _____</i>	<i>14</i>
<i>Figura 6. Manchas foliares ocasionadas por Alternaria sp. en cultivo de papa (Solanum tuberosum). _____</i>	<i>15</i>
<i>Figura 7. Siembra de inóculo en placa Petri con medio de cultivo. _____</i>	<i>18</i>
<i>Figura 8. Cultivo impuro/ cultivo puro. _____</i>	<i>20</i>
<i>Figura 9. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S. _____</i>	<i>21</i>
<i>Figura 10. Preparación de los medios de cultivo. _____</i>	<i>31</i>
<i>Figura 11. Proceso de inoculación (siembra) por extensión o bañado en superficie. _____</i>	<i>32</i>
<i>Figura 12. Placas Petri con cultivos mixtos producto de la primera siembra. _____</i>	<i>33</i>
<i>Figura 13. Re inoculación (Resiembra) por agotamiento en estrias de las colonias seleccionadas. _____</i>	<i>33</i>
<i>Figura 14: Aislamiento de hongos filamentosos. _____</i>	<i>34</i>
<i>Figura 15. Tinción Gram en bacterias. _____</i>	<i>35</i>
<i>Figura 16. Electroferograma corregido con el uso de Bioedit v7.0.9. _____</i>	<i>38</i>
<i>Figura 17. Secuencia nucleotídica en formato FASTA. _____</i>	<i>38</i>
<i>Figura 18. Listado de secuencias de microorganismos con mayor porcentaje de identidad respecto a la secuencia en estudio mostrado por BLAST. _____</i>	<i>39</i>
<i>Figura 19. Ventana mostrada en el alineamiento múltiple usando Clustal W versión 1.4 incluido en el programa Bioedit v7.0.9. _____</i>	<i>40</i>
<i>Figura 20. Colocación de los microorganismos a utilizarse en la preselección. _____</i>	<i>41</i>
<i>Figura 21. Colocación de los microorganismos en las pruebas de confrontación dual (screen fino). _____</i>	<i>43</i>
<i>Figura 22. Aislamiento de microorganismos cultivables presentes en las muestras de los bioinsumos. _____</i>	<i>46</i>
<i>Figura 23. Morfología en placa y tinción de Gram de los aislados bacterianos. _____</i>	<i>49</i>
<i>Figura 24 . Hongos filamentosos aislados de muestras de bioinsumos. _____</i>	<i>52</i>

Figura 25. Morfología en placa y observación de tinción simple al microscopio de luz con objetivo 40x de DCLIV-11 posible <i>Aerobasidium pullulans</i> .	54
Figura 26. Hongos fitopatógenos a utilizarse en pruebas de antagonismo.	55
Figura 27. Árbol filogenético de aislados bacterianos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas.	58
Figura 28. Árbol filogenético de hongos fitopatógenos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas.	62
Figura 29. Muestra de la preselección de bacterias con efecto antagónico.	67
Figura 30. Efecto antagónico in vitro de <i>Bacillus subtilis</i> DCL4-31 (F), <i>Bacillus subtilis</i> LS6-11 (G), <i>Bacillus</i> sp LS6-211 (P), <i>Rhizobium</i> sp. DCL12-11 (Q), <i>Bacillus cereus</i> X2-10(2)2 (R) y <i>Bacillus cereus</i> X5-9CD2 (S) frente a AI: <i>Fusarium</i> sp. M 1-2-1 (D); All: <i>Fusarium</i> sp. F15 (E); AllI: <i>Alternaria alternata</i> M5-62N (I).	70
Figura 31. Efecto antagónico de la cepa DCL4-31 F identificada como <i>B. subtilis</i> frente a los diferentes fitopatógenos.	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Cantidad de microorganismos aislados a partir de las muestras de los 4 bioinsumos, estado del producto (sólido o líquido), zona de procedencia y código de estos.	45
Cuadro 2. Características macro y microscópicas de los hongos filamentosos aislados de muestras de bioinsumos.	51
Cuadro 3. Identificación de bacterias mediante secuenciación genética.	59
Cuadro 4. Identificación vía molecular de hongos fitopatógenos.	63
Cuadro 5. Resultados de las cepas seleccionadas en el screen grueso.	66
Cuadro 6. Tasa de crecimiento de fitopatógenos: <i>Fusarium</i> sp. M 1-2-1 (D), <i>Fusarium</i> sp. F15 (E), <i>Alternaria alternata</i> M5-62N (I), <i>Fusarium equiseti</i> M 3-1-1 (J) y <i>Fusarium equiseti</i> F9 (T), en presencia de bacterias seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: <i>Bacillus subtilis</i> DCL4-31 (F), <i>Bacillus subtilis</i> LS6-11 (G), <i>Bacillus</i> sp LS6-211 (P), <i>Rhizobium</i> sp. DCL12-11 (Q), <i>Bacillus cereus</i> X2-10(2)2 (R) y <i>Bacillus cereus</i> X5-9CD2 (S).	69

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Árbol filogenético de bacterias y hongos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas.	i
Anexo 2: Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de microorganismos identificados vía molecular.	ii
Anexo 3: Fotografías de cultivo mixto inicial, morfología en placa, tinción de Gram y pruebas de antagonismo a bacterias seleccionadas.	viii
Anexo 4: Porcentaje de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos: <i>Fusarium</i> sp. M 1-2-1 (D), <i>Fusarium</i> sp. F15 (E), <i>Alternaria alternata</i> M5-62N (I), <i>Fusarium equiseti</i> M 3-1-1 (J) y <i>Fusarium equiseti</i> F9 (T), frente a las Bacterias previamente seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: <i>Bacillus subtilis</i> DCL4-31 (F), <i>Bacillus subtilis</i> LS6-11 (G), <i>Bacillus</i> sp. LS6-211 (P), <i>Rhizobium</i> sp. DCL12-11 (Q), <i>Bacillus cereus</i> X2-10(2)2 (R) y <i>Bacillus cereus</i> X5-9CD2 (S).	xiv

I. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas ha surgido una tendencia hacia la producción limpia, cuyo fin es reducir el uso de insumos químicos para la fertilización y control de fitopatógenos que producen pérdidas agronómicas en los cultivos. Estos agroquímicos están implicados en la alteración de la microbiota natural del suelo, de manera que la reducen considerablemente y perjudican las interacciones benéficas entre el microorganismo y la planta. Por esta razón las investigaciones se han enfocado en la búsqueda de microorganismos nativos que actúen bajo las condiciones ambientales de la región y puedan usarse para restablecer estas interacciones, al punto que sean empleados como biofertilizantes y/o biocontroladores, que mitiguen el impacto ambiental de los agroquímicos y reduzcan los costos de producción (Rodríguez C., 2013).

Se ha demostrado que las bacterias del género *Bacillus* presentan un gran potencial como antagonistas, principalmente por la gran cantidad de enzimas líticas, antibióticos y otras sustancias con actividad biocida, que son capaces de producir efectos de control sobre varias especies de organismos fitopatógenos (Sosa *et al.*, 2005).

Esta investigación estuvo orientada al aislamiento y caracterización de la diversidad microbiana cultivable partiendo de bioinsumos comerciales, con el propósito de encontrar especies nativas de la bacteria *Bacillus subtilis* para ser confrontadas frente a fitopatógenos, ya que diversos autores han reportado su actividad antifúngica. Para esto se realizó un proceso de aislamiento y purificación de los microorganismos, así como pruebas moleculares (secuenciación del ADNr 16S para bacterias y de la región ITS1 para hongos) de aislados seleccionados para su respectiva identificación a nivel de especie, finalizando con las pruebas de antagonismo *in vitro* de especies identificadas y que resultaron promisorias en el control biológico como *Bacillus subtilis*, frente a hongos fitopatógenos de los géneros *Alternaria* y *Fusarium*.

II. ANTECEDENTES

Bacillus subtilis ha demostrado eficiencia *in vitro* en el control de más de 23 tipos de patógenos de plantas, la competencia frente a otros microorganismos patógenos, se da mediante la secreción de diversas sustancias que se producen cuando la bacteria recibe los nutrientes presentes en la superficie de las raíces de las plantas que induce la elaboración de metabolitos secundarios con capacidad de suprimir el crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas (Raghavendra J., 2006) citado por (Layton *et al.*, 2011).

A nivel mundial se han realizado numerosas investigaciones donde se han aislado bacterias del género *Bacillus* a partir de muestras recolectadas en la rizósfera de distintos cultivos, con el fin de probar su acción antifúngica frente a fitopatógenos. Dentro de estas destacamos las siguientes:

- Badía *et al.* (2011) reportaron que cepas de *Bacillus subtilis* aisladas de muestras de raíces y suelo en el cultivo de arroz, presentaron potencialidades para la promoción del crecimiento y el control biológico de hongos fitopatógenos. Se demostró que producen auxinas estimuladoras del crecimiento vegetal, solubilizan fosfatos y fijan nitrógeno, lo que pudiera actuar en la promoción del crecimiento del cultivo del arroz. A la vez ejercen efecto antagónico contra cuatro hongos fitopatógenos: *Pyricularia grisea*, *Alternaria solani*, *Fusarium sp.* y *Curvularia sp.*, lo que permitiría su utilización en el control biológico.
- Corrales *et al.* (2012) evaluaron *in vitro* y en condiciones de invernadero en plantas de tomillo (*Thymus vulgaris L.*) 6 aislados de rizósfera de *Bacillus sp.* frente a un aislamiento de *Fusarium sp.* En las pruebas de antagonismo directo en placa evaluaron el radio de crecimiento de la colonia, porcentaje de inhibición y tasa de crecimiento. La identificación de los bacilos se realizó mediante pruebas bioquímicas y en los resultados la cepa bacteriana que mostró los mayores porcentajes de inhibición fue identificada como *Bacillus subtilis*.

- Orberá *et al.* (2014) describen las potencialidades de una cepa autóctona de la microbiota de los suelos de Cuba, *Bacillus subtilis* SR/B-16, aislada a partir de rizósfera de cultivos fertilizados con substrato orgánico, para el control de hongos fitopatógenos en cultivos de importancia económica. Las investigaciones dirigidas a evaluar las potencialidades de SR/B-16 para el control de enfermedades, mostraron la actividad inhibitoria del crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos procedentes de cultivos de plantas ornamentales y de bancos de semillas de caña de azúcar, pertenecientes a las especies *Curvularia lunata*, *Curvularia gudauskasii*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y al género *Colletotrichum*.

III. JUSTIFICACIÓN

Las pérdidas en la producción de alimentos causada por la incidencia de enfermedades, además del impacto ecológico al tratar de controlar estas mediante el uso de plaguicidas químicos y la demanda insatisfecha de productos orgánicos en el mercado internacional, constituyen actualmente algunas de las principales limitantes en el sector agrícola. En Nicaragua, se estima que las pérdidas por concepto de plagas y enfermedades podrían llegar hasta el 30% de la cosecha, siendo su control mediante productos químicos que resultan de alto valor económico (según el MAGFOR en 2013, las importaciones de agroquímicos fueron de 148 millones de dólares), a la vez aumentan la contaminación en los ecosistemas e incrementan la resistencia de los hongos (IICA & MAG, 1992).

El poder generar una alternativa de control eficiente frente a enfermedades tan agresivas como las causadas por los géneros fúngicos *Fusarium* y *Alternaria*, que disminuya las pérdidas económicas de los productores, ayudaría a aumentar la producción de los cultivos y a abrir cada vez más mercados internacionales, que son mucho más exigentes en cuanto a la calidad fitosanitaria del producto.

El control biológico de organismos fitopatógenos es una de éstas alternativas. Se trata de una práctica “amigable con el medio ambiente”, basada en el uso de enemigos naturales de las plagas y enfermedades (Orberá *et al.*, 2014). A partir de este concepto, en nuestro país han surgido productos como los bioinsumos para el control de plagas y enfermedades. Sin embargo, como se menciona en el documento “Estado de la Agricultura Orgánica en Nicaragua: Propuesta para su Fomento y Desarrollo” (2005) la mayoría de estos poseen un bajo nivel tecnológico, por lo que se desconoce las alternativas de biocontrol (parasitoides, presencia y tipo de microorganismos, entre otros) y no se cuenta con estudios del espectro de funcionamiento de estos.

Con el propósito de brindar nuestro aporte ante esta problemática proporcionando alternativas de biocontrol que contribuyan a una agricultura más sostenible, se aisló y caracterizó molecularmente la diversidad microbiana

cultivable de bioinsumos comerciales en la búsqueda de *Bacillus subtilis*, bacteria que ha sido reportada como antagonista de un amplio rango de hongos fitopatógenos que afectan distintos cultivos, para la realización de pruebas de antagonismo in vitro.

Esta investigación es la primera fase en el desarrollo de un producto biológico nacional que tendrá como ingrediente activo microorganismos nativos, y que será usado para el control de enfermedades en cultivos de interés. Además, nos permitió crear un banco de aislados con posible potencial biotecnológico que podrán ser utilizados en estudios posteriores.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

- Caracterizar microbiológica y molecularmente la diversidad microbiana cultivable de bioinsumos comerciales en la búsqueda de *Bacillus subtilis* para el control de hongos fitopatógenos de interés agrícola y desarrollo de pruebas de antagonismo.

4.2. Objetivos Específicos

- Explorar la diversidad microbiana posible de obtener por métodos cultivables, utilizando medios enriquecidos partiendo de bioinsumos comerciales procedentes de dos zonas del país (occidente y norte).
- Identificar los microorganismos seleccionados a través de pruebas moleculares.
- Realizar pruebas de antagonismo *in vitro* de las bacterias con potencial antagónico, seleccionadas en un screen grueso, frente a hongos fitopatógenos de interés agrícola.

V. MARCO TEÓRICO

5.1. Bioinsumos

En Nicaragua, la Norma Técnica Obligatoria Nicaragüense de Agricultura Ecológica NTON 11 010-03 define insumo orgánico o bioinsumo como: “todo aquel material de origen orgánico o de síntesis biológica utilizado en la producción agropecuaria” y materia orgánica como: “los restos de cualquier organismo, y residuos o desperdicios de productos de origen vegetal o animal”.

Los bioinsumos son componentes vitales de los sistemas sostenibles dado que constituyen medios económicamente activos y ecológicamente aceptables para reducir los insumos químicos y mejorar la calidad y cantidad de los productos, se clasifican como insumos de riesgo reducido, principalmente productos naturales u organismos, derivados de materiales naturales como animales, plantas, microorganismos y ciertos minerales (Barquero *et al.*, 2007).

En Nicaragua existe una demanda insatisfecha de bioinsumos por parte de cooperativas y asociaciones de productores orgánicos. Sin embargo, la mayoría de estos productos no poseen certificación orgánica ni están registrados, a como mandatan las regulaciones nacionales. No obstante, recalcamos que no se debe menospreciar su potencial y servicio para mejorar la nutrición y salud de las plantas y el suelo (IICA; MAGFOR; Cooperación Austriaca;, 2009).

5.2. Microorganismos

Los microorganismos constituyen un grupo de seres vivos sumamente heterogéneo cuya única característica común es su reducido tamaño: todos son lo suficientemente pequeños como para pasar inadvertidos al ojo humano, siendo preciso el uso de dispositivos de aumento como el microscopio óptico o, en algunos casos, el microscopio electrónico para poder observarlos (Frioni, 2005).

Gracias a las diversas técnicas innovadoras en las investigaciones microbiológicas, como el uso de las técnicas de secuenciación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y el estudio del ARN de los ribosomas, los microorganismos se han agrupado desde el punto de vista evolutivo en tres grupos principales: arqueobacterias, eubacterias y eucariotas. La Figura 1 muestra un esquema de la evolución del mundo vivo basado en la estructura del ARN de los ribosomas (Frioni, 2005).

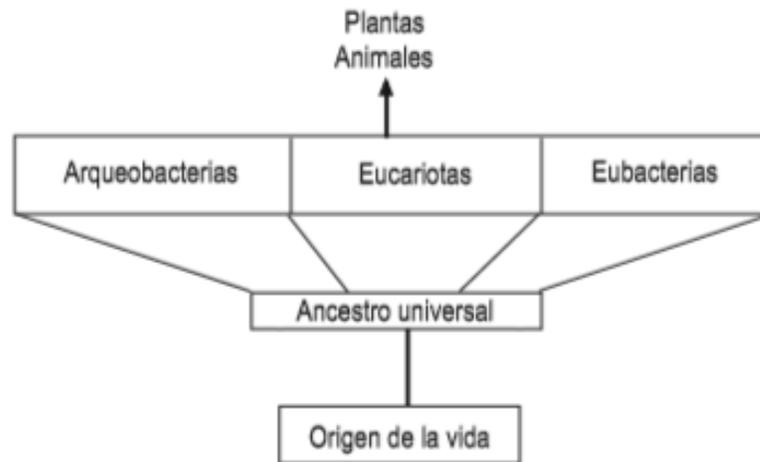


Figura 1. Evolución del mundo vivo basada en la estructura del ARN de los ribosomas. Fuente: (Frioni, 2005)

5.2.1. Bacterias

Las bacterias son organismos unicelulares que se reproducen generalmente por fisión binaria (una célula se parte y se convierte en dos células idénticas) y generalmente necesitan de un medio de crecimiento rico en proteínas y con ambiente de alta humedad relativa para su reproducción y diseminación. Bajo condiciones ambientales favorables de temperatura, humedad y nutrientes, las bacterias pueden dividirse cada 20 minutos. Sin embargo, este exagerado ritmo de crecimiento puede verse limitado por la falta de nutrientes, acumulación de desechos metabólicos y otros factores limitantes (Lastres & Soza, 2009).

5.2.1.1. Morfología bacteriana

5.2.1.1.1. Microscópica

La forma de las bacterias al microscopio está determinada por la rigidez de su pared celular. Básicamente, se diferencian según su forma en cocos (esféricas u ovaladas), bacilos (cilíndrica o de bastones; rectos o curvos) y espirilos (espiral) (Figura 2). Las bacterias pueden mantenerse unidas unas con otras después de la división celular, pero conservando siempre la independencia celular. Si el plano de división es único, podemos encontrar diplococos o cocos en cadena (microorganismos del género *Streptococcus*). Si los planos de división son muchos, los cocos pueden agruparse en tétradas o en racimos (*Staphylococcus*). Los bacilos pueden ser muy cortos (cocobacilos) o muy largos. Sus extremos pueden ser redondeados o rectos; pueden estar aislados, en cadenas, en filamentos o formando letras chinas (*Corynebacterium*). Los bacilos curvos pueden tener forma de coma (*Vibrio cholerae*) (Pírez & Mota, 2006)

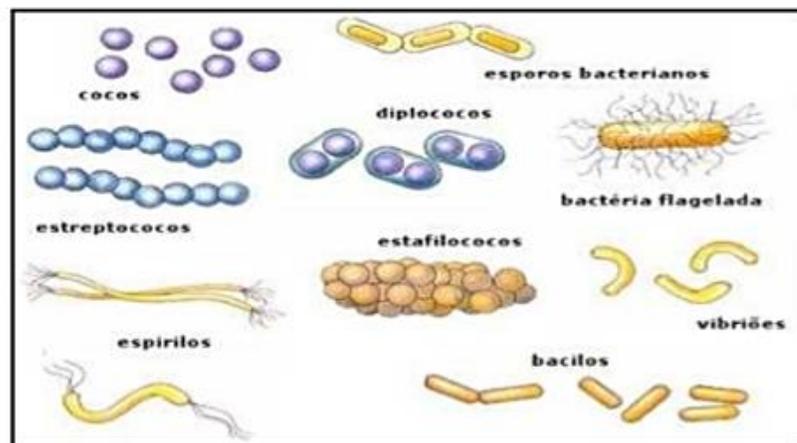


Figura 2. Distintas formas bacterianas. Fuente: (Bravo, 2014)

La morfología bacteriana debe ser observada con el microscopio óptico o el microscopio electrónico, dado el tamaño pequeño de estos microorganismos. El más usado en el laboratorio es el microscopio óptico de campo claro.

Las bacterias pueden observarse sin tinción (examen en fresco) si se las coloca en glicerol o soluciones no acuosas que aumenten el índice de refracción o con tinción usando distintas coloraciones que mejoran su visualización ya que son células incoloras. Dichas tinciones se basan en la afinidad que presentan los colorantes por las estructuras bacterianas. Los colorantes catiónicos por ejemplo, son atraídos por los componentes de carga negativa como los ácidos nucleicos y los polisacáridos. Ejemplo de este tipo son: el azul de metileno, el cristal violeta y la safranina.

El examen en fresco no es el más usado para observar la morfología bacteriana porque las bacterias tienen citoplasma incoloro y su índice de refracción no difiere mucho del vidrio y del agua. Con esta técnica se puede verificar la existencia de bacterias y evidenciar su capacidad para moverse. El examen en fresco también puede ser usado con técnicas especiales como la tinción con tinta china que nos permite determinar la presencia de cápsula rodeando la bacteria.

5.2.1.1.1.1. Tinción Gram

La coloración de Gram es la más usada en bacteriología; debe su nombre a quién la describió en 1884. Es una coloración diferencial, dado que las bacterias pueden clasificarse según su respuesta en Gram positivas o Gram negativos. Las primeras se tiñen de color azul violeta y las segundas adquieren un color rosado o rojo. La diferente reacción de las bacterias a la coloración de Gram se relaciona con diferencias fundamentales de la envoltura celular de estas dos clases de células (Pérez & Mota, 2006).

La pared celular es responsable del resultado de la tinción de Gram. El procedimiento se inicia con una tinción de las células bacterianas fijadas (frotis) mediante el colorante básico cristal violeta. Posteriormente se trata con una disolución de yodo, que a su vez forma un complejo con el cristal violeta insoluble en agua y sólo medianamente soluble en alcohol o acetona (Pérez, 2006).

Las células se tratan después con alcohol para diferenciarlas: las células Gram positivas retienen el complejo colorante-yodo, por lo que las vemos de color morado-azules; y las células Gram negativas son decoloradas por el alcohol, por lo que se hacen visibles mediante la coloración de contraste, en este caso la fucsina o safranina (Figura 3).

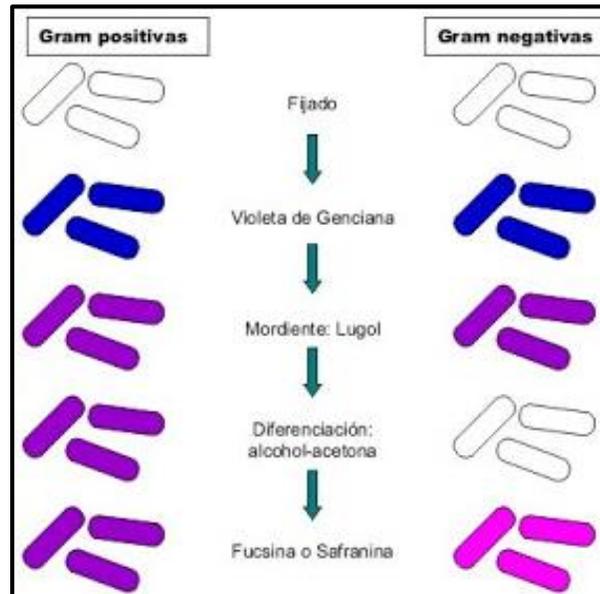


Figura 3. Técnica de Gram.

Fuente: <http://ayudantiasunab.bligoo.cl/microbiologia-tincion-gram>

5.2.1.1.2. Macroscópica

La mayoría de las bacterias se multiplican rápidamente y son visibles como colonias cuando se las siembra en medios de cultivo sólidos adecuados. Requieren una incubación de aproximadamente 24 horas en una atmósfera que favorezca su desarrollo, a temperatura óptima.

Las colonias pueden caracterizarse según su:

- Forma: circular (*Staphylococcus*), irregular o filamentosa (*Bacillus*).
- Borde: ondulado (característico de los bacilos largos como *Bacillus anthracis*), en sierra o dentados (*Yersinia pestis*) o lisos (por ejemplo *Escherichia coli*).
- Superficie: plana, convexa, mamelonada, umbilicada.

- Comportamiento frente a la luz: brillante (*Streptococcus*) u opaca (*Staphylococcus*).
- Pueden presentar olores particulares como el frutal de *P. aeruginosa* o el putrefacto de los anaerobios.
- Consistencia: mucoide (M), liso (S) o rugoso (R).

5.2.2. Hongos

Los hongos son organismos eucariontes uni o pluricelulares que se desarrollan en sitios húmedos y con poca luz. Las células de los segundos se agrupan en filamentos llamados hifas (Figura 4) que en conjunto recibe el nombre de micelio. El micelio da a los hongos una apariencia algodonosa. Esta es una característica utilizada en el campo para distinguir las enfermedades causadas por estos de aquellas causadas por bacterias (Urbina, 2011). Su nutrición es heterótrofa, es decir, que no pueden producir sus propios alimentos como lo hacen las plantas, sino que descomponen la materia orgánica por medio de enzimas, absorbiendo las sustancias nutritivas. Por otro lado, su identificación está primariamente basada en las diferencias morfológicas de las estructuras reproductivas y la forma en que las esporas o conidios se producen en células especializadas. La mejor ayuda la constituyen las Claves taxonómicas.

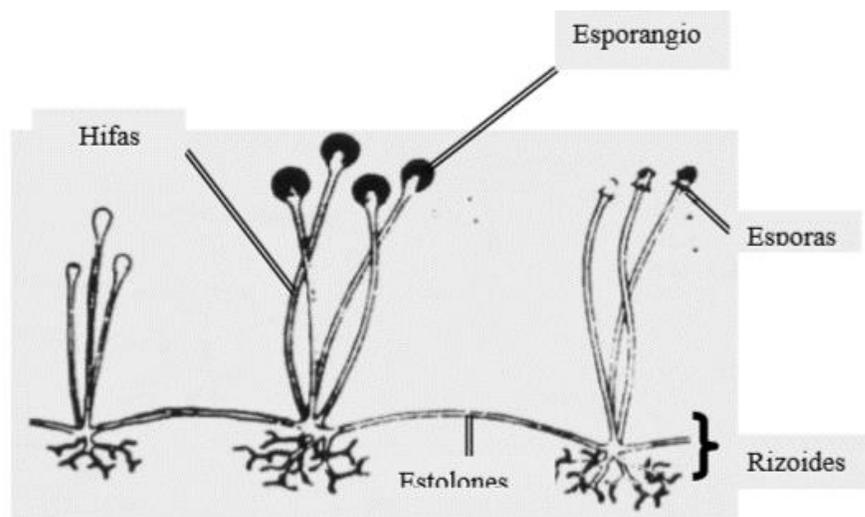


Figura 4. Partes de un hongo microscópico. Fuente: (Pérez, 2006)

5.2.2.1. Hongos fitopatógenos

Cada año, el 10% de la producción mundial de alimentos se pierde por la incidencia de las enfermedades y plagas que atacan los cultivos de interés agroalimentario: el 50% de ellas provocadas por especies de hongos fitopatógenos (Strange & Scott, 2005) citado por (Orberá et al., 2014).

Los hongos fitopatógenos son microorganismos que producen enfermedades en las plantas. Las enfermedades causadas por hongos producen en sus hospederos una amplia variedad de tipos diferentes de síntomas. Entre otros, los hongos fitopatógenos pueden producir manchas cloróticas y necróticas, cribados, canchales, tizones, podredumbres húmedas o secas, momias, agallas, abolladuras, costras, ahogamientos, marchitamientos y pústulas (Urbina, 2011). Para que suceda una enfermedad, es necesaria la completa interacción de tres componentes: patógeno, huésped y condiciones ambientales favorables (Agrios, 1995).

5.2.2.1.1. Hongos patógenos vasculares

Los hongos que causan la enfermedad denominada como “marchitez vascular” tapan los conductos internos de conducción de agua de las plantas y como consecuencia se observan síntomas de marchitez (Figura 5). Puede presentarse muerte del follaje, hojas o de la planta en general. Para detectar si hay marchitez vascular, se efectúan cortes diagonales en una rama afectada y se observa si hay una decoloración verde oscura a marrón en la parte interna del tallo, lo cual es un síntoma diagnóstico de la presencia de estos patógenos vasculares. Las ramas afectadas por estos hongos generalmente mueren. Algunas plantas mueren rápidamente mientras que en otras se observa la muerte de algunas ramas y posteriormente la de la planta (Arias & Jeréz, 2008).

- ***Fusarium sp.***

Este hongo penetra la epidermis de las raíces, la corteza y endodermos, finalmente entra a los vasos del xilema, colonizando el sistema vascular, en el cual el fitopatógeno produce compuestos complejos que interfieren con la capacidad de la planta al traslocar la toma de agua y nutrientes, ocasionando la degradación de los tejidos y la muerte.

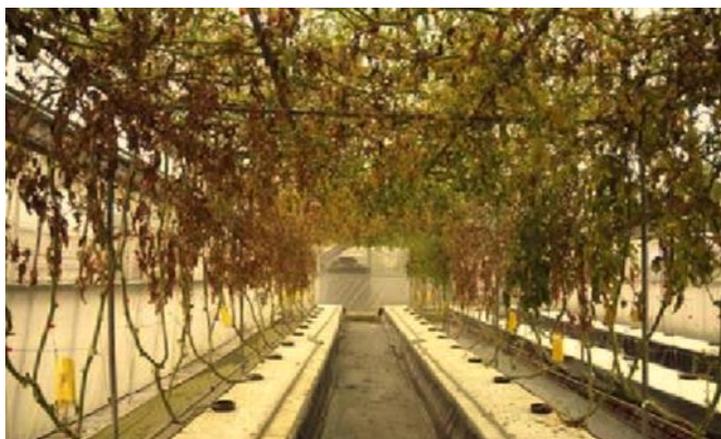


Figura 5. Marchitez causada por *Fusarium oxysporum* en cultivo de tomate.
Fuente: <http://www.forestryimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=9494>

5.2.2.1.2. Hongos causantes de enfermedades foliares

Las enfermedades foliares limitan el rendimiento del cultivo, porque se desarrollan a expensas de la planta, consumiendo energía. De manera general, estas afectan el cultivo, provocando un mal funcionamiento y destrucción de los tejidos fotosintéticos, ya que los patógenos ejercen su parasitismo aprovechándose de la energía producida por el cultivo. De esta manera colonizan, crece y se reproducen exclusivamente a expensas de la planta, generándoles pérdidas de carbohidratos y nutriente producidos o de reserva (Arias & Jeréz, 2008).

La mayoría de las enfermedades foliares producen clorosis, necrosis, afectando la fotosíntesis, disminuyendo la interceptación de radiación y aumentando la reflectancia. Así también, la mayoría de ellas generan senescencia y algunas

más graves, una intensa defoliación afectando la intercepción lumínica. Esta senescencia anticipada de las hojas puede inducir también una removilización de las reservas del tallo, lo cual aumenta la predisposición a las pudriciones de raíz y tallo con el consiguiente riesgo de vuelco de las plantas y/o quebrado durante la cosecha.

- ***Alternaria sp.***

En las hojas se presentan pequeñas manchas circulares de color café frecuentemente rodeadas de un halo amarillo (Figura 6). Las manchas tienen características de tener anillos concéntricos de color oscuro. Usualmente las manchas aparecen en las hojas más viejas y de estas suben al resto de la planta. A medida que la enfermedad progresa, el hongo puede atacar tallos. En los anillos concéntricos se producen esporas polvorrientas y oscuras.



Figura 6. Manchas foliares ocasionadas por *Alternaria sp.* en cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). Fuente: INIA Remehue

5.2.2.1.3. Hongos causantes de la pudrición de la base del tallo y raíces

Son enfermedades causadas por hongos habitantes del suelo, y que pueden causar pudrición temprana o “damping off” de semillas o plántulas, así como de las raíces y la parte baja de los tallos en plantas maduras. Los síntomas que comúnmente aparecen cuando el sistema radicular se encuentra enfermo, son

marchitez, enanismo o deficiencias nutricionales en la parte aérea de la planta. (Arias & Piñeros, 2008).

- ***Rhizoctonia sp.***

Ataca principalmente en los primeros días de la plantación. La planta se pone de color verde grisáceo y toma un aspecto de flacidez hasta que se marchita completamente. Generalmente al arrancar la planta se separa fácilmente el sistema radicular del cuello, donde se nota la pudrición.

5.3. Cultivo de microorganismos en el laboratorio

El cultivo de microorganismos consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada. En general, podemos distinguir cultivos líquidos y sólidos en función de las características del medio y cultivos discontinuos y continuos en función de la disponibilidad de nutrientes en el medio.

5.3.1. Requerimientos nutricionales de los microorganismos

Como todos los organismos vivos, los microorganismos requieren ciertos nutrientes básicos y factores físicos para el mantenimiento de su vida, estas necesidades varían según el tipo de microorganismo y es necesario conocerlas para cultivarlos en el laboratorio (Rojas, 2011).

Las necesidades nutricionales básicas pueden satisfacerse en el laboratorio, mediante el uso de medios de cultivos artificiales, los cuales se encuentran disponibles en una gran variedad y en general aportan a los microorganismos: una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, elementos no metálicos, elementos metálicos, vitaminas, agua y energía.

Por otro lado, las necesidades físicas involucran factores como: Temperatura, pH y gases, los cuales se encuentran en un rango óptimo específico para cada

microorganismo; por lo tanto, su variación puede acelerar o disminuir el crecimiento.

Los medios de cultivos son sustratos o soluciones de nutrientes que permiten el desarrollo de microorganismos. En las condiciones de laboratorio para realizar un cultivo, se debe sembrar sobre el medio de cultivo elegido las muestras en las que los microorganismos van a crecer y multiplicarse para dar colonias (Solano, 2006).

El profesional que desarrolla trabajos con microorganismos o con un microorganismo en particular, debe satisfacer sus necesidades nutricionales, con el objetivo de recuperarlo y hacerlo crecer adecuadamente. De manera general, estos medios pueden ser artificiales o químicamente definidos. Para estos últimos se conocen las cantidades exactas de compuestos químicos puros que los conforman ya sean de tipo orgánico o inorgánico. Los medios artificiales están compuestos de un número limitado de sustancias complejas, como extractos de plantas o de animales cuya composición química exacta no se conoce (Rojas, 2011).

Los medios de cultivo se pueden clasificar en definidos cuando su composición química se conoce totalmente y complejos cuando no es el caso porque están compuestos por mezclas de extractos de materiales complejos (extracto de levadura, extracto de carne, etc.).

Por otra parte, los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos si se añade algún agente solidificante que no sea consumible por los microorganismos (normalmente agar).

5.3.2. Aislamiento de microorganismos

En nuestros ecosistemas los microorganismos se encuentran como poblaciones mixtas. Sin embargo, para el estudio, caracterización e identificación necesitamos tenerlos como cultivos puros (proviene de una misma célula). La obtención de

los cultivos puros a partir de una población mixta se lleva a cabo en dos etapas (Álvarez, 2015).

- Aislamiento: La muestra debe diseminarse de manera tal que los diferentes microorganismos queden lo suficientemente separados sobre la superficie de un medio de cultivo sólido, de manera que luego de la incubación ellos formen colonias visibles aisladas.
- Trasplante: Luego de tener las colonias aisladas, estas deben transferirse a otras placas para ser cultivadas por separado.

Se considera que se ha obtenido un cultivo puro, cuando al realizar este proceso, todas las colonias presentan las mismas características. El medio de cultivo utilizado en el proceso de aislamiento dependerá, entre otros factores, de los requerimientos nutricionales de los microorganismos que se espera aislar y de la presencia de microorganismos que, por sus características y/o por la cantidad en que se encuentren en la muestra, dificulten la obtención de los microorganismos objeto del aislamiento (Álvarez, 2015).

5.3.2.1. Siembra

Sembrar o inocular (Figura 7) es introducir artificialmente una porción de muestra (inóculo) en un medio adecuado, con el fin de iniciar un cultivo microbiano, para su desarrollo y multiplicación. Una vez sembrado, el medio de cultivo se incuba a una temperatura adecuada para el crecimiento (Santambrosio & Ortega, 2009).



Figura 7. Siembra de inóculo en placa Petri con medio de cultivo.

Fuente: http://www.ehowenespanol.com/proposito-estriar-placa-agar-info_207916/

Las reglas fundamentales para efectuar la siembra exigen:

- Que se efectúen asépticamente.
- Que los medios de cultivo y el instrumental a utilizar estén esterilizados.
- Que se realicen solo los manipuleos indispensables.
- Que se trabaje fuera de toda corriente de aire. De ser posible utilizando un mechero o bien Flujo laminar.

Existen diferentes tipos de siembra de acuerdo al medio utilizado y los requerimientos del microorganismo a estudiar. En medios sólidos podemos utilizar los siguiente: (Santambrosio & Ortega, 2009).

- Siembra por inmersión: se coloca el inóculo en una placa o caja de Petri y sobre el mismo se vierte el medio de cultivo previamente fundido. Este método se utiliza para microorganismos aerobios.
- Siembra en doble capa: se procede de la misma manera que por inmersión. Una vez solidificado el medio se vierte una cantidad extra de medio necesaria para cubrir la capa anterior (generalmente 10 ml aprox.). Este método se utiliza para microorganismos anaerobios facultativos y microaerofílicos.
- Siembra en superficie: se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido, se deja solidificar y se coloca sobre la superficie el inóculo. Con ayuda de una espátula de Drigalsky se extiende el inóculo hasta su absorción total por el medio de cultivo. Este tipo de siembra se recomienda para microorganismos aerobios estrictos.
- Siembra en estría: se vierte sobre una placa de Petri el medio de cultivo fundido y se deja solidificar. Dicha técnica consiste en dibujar estrías perpendiculares sobre el medio solidificado y en los cuatro puntos cardinales de la placa lo más separado posible para identificar diferentes morfologías en los crecimientos de bacterias.

5.3.2.2. Purificación o aislamiento

El proceso de purificación o aislamiento se define como la separación de un determinado microorganismo del resto de microorganismos que le acompañan (Figura 8). El método más usual para este proceso es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido adecuado dispuesta en una placa Petri (Solano, 2006).



Figura 8. Cultivo impuro/ cultivo puro. Fuente: Mediosdecultivo.com

El éxito del aislamiento, recae en realizar el mayor número de estrías posibles. En las primeras estrías aparecerán colonias confluentes o una masa continua de microorganismos. En las estrías finales deberán aparecer colonias separadas unas de otras. El aislamiento requiere un reducido inóculo de partida. La sucesiva disminución del tamaño de la población sobre el asa, debe asegurar que finalmente algunas células queden suficientemente separadas sobre la superficie.

5.4. Identificación molecular de microorganismos

Los métodos basados en biología molecular, se basan en el uso de procedimientos y reactivos, en los cuales se puede detectar determinadas secuencias de ADN que son propias de un determinado agente microbiano (Alejos *et al.*, 2014).

Los datos moleculares han permitido estudiar con mayor precisión los patrones de diversidad genética y su distribución; el comportamiento; la selección natural; las interacciones biológicas; la composición, funcionamiento y dinámica de comunidades microbianas; las relaciones filogenéticas, entre otros.

5.4.1. Fundamento de las técnicas de identificación molecular

Las técnicas de identificación molecular en bacterias mediante el análisis del ARNr 16S u otros genes mencionados se basa en la amplificación genómica y en

la secuenciación de esos genes o sus fragmentos. El medio de cultivo o las condiciones de incubación no serán factores determinantes, pero si serán factores críticos la técnica de extracción del ADN cromosómico y la amplificación.

A continuación se describen las etapas metodológicas a considerar en la identificación molecular según (Rodicio & Mendoza, 2004), mostradas también en la Figura 9.

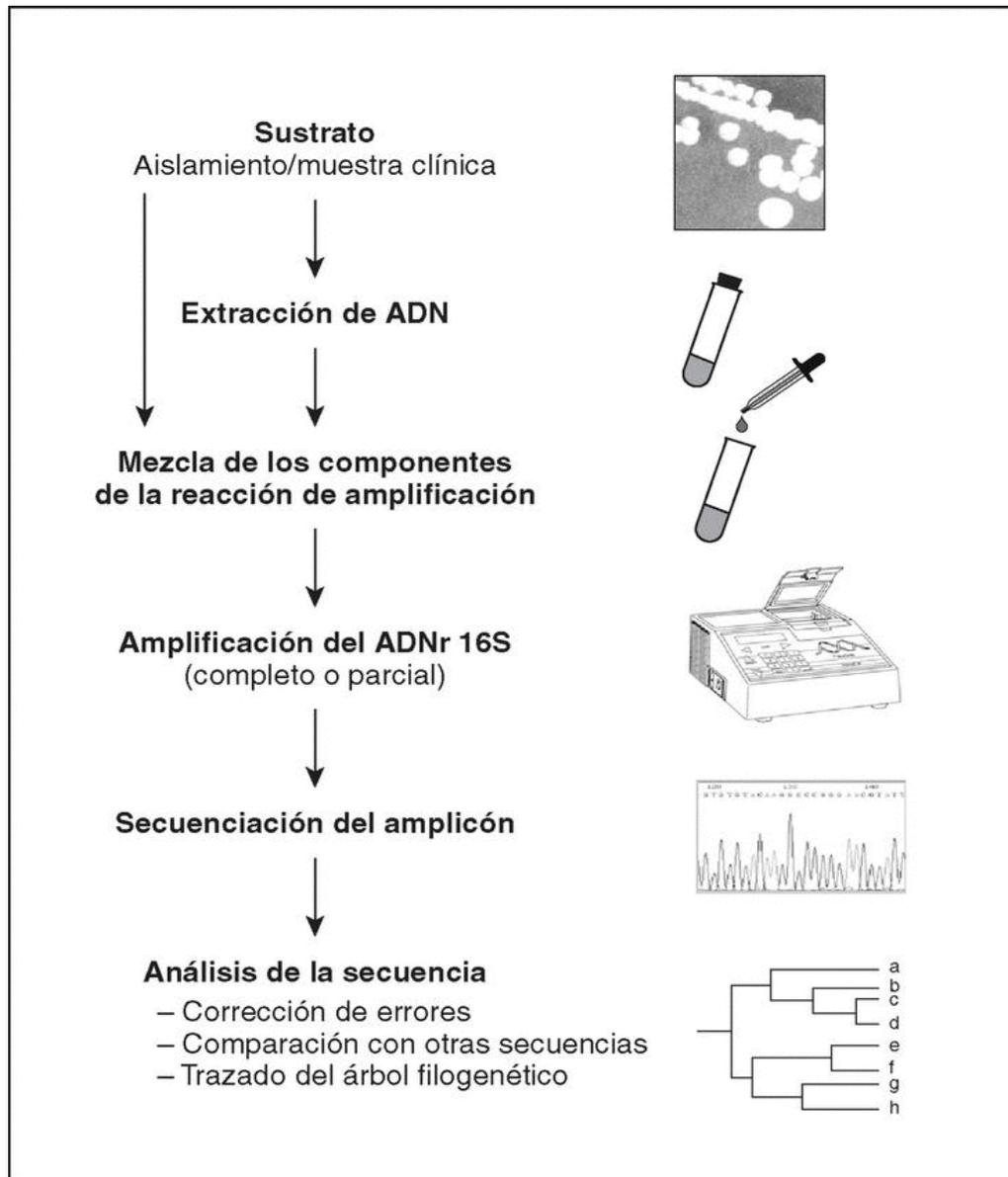


Figura 9. Etapas a seguir en el proceso de identificación bacteriana mediante secuenciación del ADNr 16S. Fuente: (Rodicio & Mendoza, 2004)

5.4.1.1. Extracción de ADN

El ADN genómico se extraerá a partir de las células totales mediante diferentes métodos estándar o sistemas comerciales con versatilidad sobre el tipo de muestra o de matrices, en el caso de tratarse de una muestra alimentaria o ambiental. Dependiendo del tipo microorganismo se pueden aplicar modificaciones que simplifiquen u optimicen la extracción cromosómica (Rodicio & Mendoza, 2004).

5.4.1.2. Amplificación de ADN

En un termociclador, este ADN se utilizará como molde para la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de una secuencia del ARNr 16S con un rango de tamaño entre 500-1.500 pb (o de otro tamaño si se analizan otros genes). Con cebadores universales o de amplio espectro complementarios a las regiones conservadas, se amplificaría teóricamente el gen del ARNr 16S en todas las bacterias. Ninguno de los cebadores utilizados en la actualidad se considera totalmente universal, por lo que no se puede realizar una recomendación específica de cebadores que garantice la amplificación de todos los procariotas (Rodicio & Mendoza, 2004).

5.4.1.3. Secuenciación de ADN

El gran avance de los métodos de secuenciación ha permitido el conocimiento de un volumen extraordinario de secuencias, obteniéndose con mayor rapidez y calidad. La secuenciación es un proceso análogo a la PCR, que utiliza el ADN como molde pero que los cebadores directo y reverso actúan en reacciones independientes. Estos cebadores pueden ser los mismos cebadores de amplificación u otros diseñados para esta etapa del ensayo. A diferencia de la PCR, no se genera un nuevo molde, sino que se reutiliza en los ciclos programados (25-35). Se añaden bases marcadas con fluorocromos o terminadores y bases no marcadas, que se irán incorporando aleatoriamente a la síntesis. Los terminadores finalizan la síntesis de la secuencia, por lo que al final

se obtiene una mezcla de productos de ADN de diferentes tamaños. Cada base (adenina, timina, guanina y citosina) se marca con un fluorocromo diferente que absorbe a diferente longitud de onda, detectándose posteriormente (Rodicio & Mendoza, 2004).

Los terminadores no incorporados se eliminan mediante la purificación del producto y el tamaño de cada uno se determina mediante electroforesis capilar. Según se va conociendo el tamaño y el terminador de cada fragmento (separados en gel o por elución) se determina la secuencia de bases representadas cada una por un color diferente y se editan de forma manual o automática. Las cadenas de ADN se secuencian independientemente, generándose la secuencia directa y la reversa (complementaria). Según el modelo de secuenciador, el tipo de capilar utilizado, y las variables en la secuenciación, es posible simplificar el proceso, reducir el tiempo de ensayo y el coste y aumentar el tamaño de la secuencia a analizar (500- 900 bases).

5.4.2. Bioinformática

La bioinformática es una disciplina que se encuentra en la intersección entre las ciencias de la vida y de la información. Trata de desarrollar sistemas que sirvan para entender el flujo de información desde los genes a las estructuras moleculares, su función bioquímica, conducta biológica y, finalmente, su influencia en las enfermedades. Si bien algunos restringen el rango de estudio de la bioinformática al manejo y análisis de bases de datos biológicas - principalmente de secuencias-, podría atribuírsele un sentido más amplio, como la fusión de las técnicas computacionales con el entendimiento y apreciación de datos biológicos, el almacenamiento, recuperación, manipulación y correlación de datos procedentes de distintas fuentes (Cañedo & Arencibia, 2004).

La Bioinformática no sólo se ha convertido en una ciencia esencial para la genómica básica y la investigación en biología molecular, también está teniendo un gran impacto en muchas áreas de la biotecnología y las ciencias biomédicas. Tiene aplicaciones, que están basadas por ejemplo, en los conocimientos de

diseño de fármacos, análisis forense de ADN y Biotecnología agrícola (Meneses, *et al.*, 2011).

5.4.2.1. Análisis de las secuencias y construcción de árboles filogenéticos

El análisis de la secuencia de ADN, es el descubrimiento de similitudes funcionales y estructurales, y las diferencias entre múltiples secuencias biológicas. Esto puede hacerse comparando las nuevas secuencias (desconocidas) con las bien estudiadas y anotadas (conocidas) (Meneses, *et al.*, 2011).

Este análisis incluye la alineación de secuencias, la búsqueda en la base de datos de secuencias, el descubrimiento de patrones, la reconstrucción de las relaciones evolutivas, y la formación y la comparación del genoma.

La comparación de las secuencias del gen ADNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre organismos procariotas, de forma similar la región ITS permite hacer lo mismo en eucariotas (Rodríguez C., 2013).

Esto ha traído una gran repercusión en la taxonomía microbiana, ya que ha dado lugar al sistema de clasificación actual que ha permitido la identificación rápida y precisa tanto de procariotas como de eucariotas. La identificación molecular que se basa en el análisis del gen ADNr 16S es comúnmente usada para la identificación de bacterias en donde otro tipo de técnica resulta imposible o simplemente requiere mucho tiempo. La amplificación del gen permite su posterior secuenciación y este proceso comienza preferentemente del ADN extraído de un cultivo puro bacteriano, aunque también puede conseguirse de una muestra proveniente de distintos tipos de fuente. Las moléculas del ADNr 16S e ITS están presentes en todas las bacterias y en todos los eucariotas respectivamente, y su análisis es por tanto, un instrumento de identificación universal, una de las características que las hace tan útil es que su estructura y función han permanecido sin mayores alteraciones durante un tiempo muy largo, de modo que cualquier cambio en la secuencia refleja sobre todo cambios

aleatorios que ocurren de una forma suficientemente lenta, de modo que puede aportar información acerca de todos los procariotas a través de la escala evolutiva (Rodicio & Mendoza, 2004).

Existen relaciones jerárquicas entre los microorganismos que surgen a través de la evolución, los árboles filogenéticos nos permiten esquematizar dichas relaciones. Estos árboles constan de nodos unidos entre sí por ramas, las longitudes de estas ramas pueden significar la distancia evolutiva que hay entre nodos. Los árboles agrupan los organismos, de manera que todo lo que hay alrededor de un nodo es considerado un grupo monofilético, es decir, que todo el grupo se originan de un único ancestro común y por tanto pueden poseer rasgos comunes, cuando se presenta que un grupo excluye a algunos de sus descendientes se denomina parafilético (Baudalf, 2003).

Actualmente hay diversos métodos que permiten la construcción de árboles filogenéticos, que han sido categorizados en uno de los siguientes grupos: Basados en distancias: Realizan un cálculo de la distancia evolutiva para todos los pares de unidades taxonómicas operacionales o secuencias de ADN, de manera que el árbol filogenético finalmente se construye utilizando las relaciones entre estas distancias, entre los métodos más conocidos están; Método de evolución mínima (ME), Método Neighbor-Joining (NJ) y UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Means), sin embargo UPGMA asume siempre una tasa de evolución constante por esta razón no es recomendable usarlo para inferir árboles filogenéticos en aquellos casos en que el conjunto de secuencias no cumple con esta hipótesis, ya que podría no reflejar necesariamente una historia evolutiva (Sandria, 2003).

5.5. Antagonismo microbiano para el control fitosanitario

El antagonismo microbiano está dado por la inhibición, deterioro o muerte de alguna especie de microorganismos por la acción de otra; o una relación entre dos poblaciones en la cual una de ellas causa efectos negativos a la otra. Para determinar el efecto antagónico entre dos especies microbianas se realizan

ensayos inmunológicos en donde se muestran en un medio sólido la actividad productora de metabolitos tóxicos de una cepa antagonista hacia la que es sensible (Pérez *et al.*, 2014).

En el mundo biológico existe una interacción continua entre los patógenos potenciales y sus antagonistas, de forma tal que estos últimos contribuyen a que en la mayoría de los casos no se desarrolle la enfermedad. En condiciones naturales los microorganismos están en un equilibrio dinámico en la superficie de las plantas (Fernández & Vega, 2001).

La utilización de microorganismos en el control biológico de enfermedades de las plantas constituye una alternativa eficiente y ecológica que contribuye al desarrollo de una agricultura sostenible, ya que disminuye los efectos inherentes al uso de plaguicidas y productos químicos (Whipps, 2001). Los controladores biológicos no solo actúan en la planta viva, también extienden sus efectos a la etapa pos cosecha y a los productos almacenados. A diferencia de los agroquímicos los agentes de biocontrol son biodegradables (Orberá *et al.*, 2014)

Existe un grupo importante de hongos y bacterias que presentan efectos antagonistas con otros microorganismos y esta acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos vegetales.

Se han descrito varios mecanismos de acción de los antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos. Algunos de estos son antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia.

Las características óptimas que debe poseer un antagonista microbiano útil en cultivos vegetales son las siguientes: ser genéticamente estable, eficaz a bajas concentraciones, hábil para sobrevivir condiciones adversas del medio ambiente, incluyendo refrigeración y almacenamiento controlado, resistente al ataque de hiperparásitos, efectivo para una amplia gama de microorganismos patógenos en una variedad de frutas y hortalizas, fácil de producir en medios de bajo costo, resistente a los fungicidas, compatible con procedimientos de procesos

comerciales, poder establecerse con rapidez para minimizar la destrucción realizada por la plaga, no ser patogénico en el hospedero y que no produzca metabolitos secundarios dañinos a la salud humana (Bautista, 2006).

5.5.1. Género *Bacillus* como biocontrolador de enfermedades

En fitopatología tiene gran importancia el antagonismo dado por bacterias saprófitas con especies de hongos. Entre las bacterias más estudiadas como antagonistas de fitopatógenos se encuentran las del género *Bacillus* (Fernández & Vega, 2001).

Estos microorganismos se caracterizan por ser bacterias Gram positivas con forma bacilar, aerobias estrictos o anaerobias facultativas que en condiciones estresantes forman una endospora central, que deforma la estructura de la célula. Esta forma esporulada es resistente a las altas temperaturas y a los desinfectantes químicos corrientes. Esta bacteria es capaz de generar un efecto benéfico en el crecimiento de las plantas por diversos mecanismos, en donde se encuentran la producción de sustancias antibióticas, producción de lipopéptidos que actúan como biosurfactantes, solubilización de fosfatos y reducción de enfermedades en las plantas (Kokalis *et al.*, 2006).

Las especies del género *Bacillus* poseen características especiales que los hacen buenos candidatos como agentes de control biológico. Su utilización para el biocontrol de las enfermedades de las plantas es de gran interés, debido a la capacidad que presentan estas bacterias para producir antibióticos y otras sustancias con capacidad antibacteriana y antifúngica que impiden el establecimiento de patógenos vegetales. El rápido crecimiento que muestran estas bacterias en cultivo líquido, la formación de endosporas resistentes al calor y la desecación, y la producción de metabolitos secundarios son características que permiten considerar a estos microorganismos como potenciales agentes de control biológico (Shoda, 2000).

Estas bacterias formadoras de endosporas actúan directamente en el enfrentamiento de organismos fitopatógenos, mediante la producción extracelular de antibióticos, toxinas, enzimas hidrolasas y lipopéptidos antimicrobianos. Los lipopéptidos de origen bacteriano ejercen una amplia acción antifúngica, antibacteriana y antiviral, y además constituyen moléculas efectoras que activan los mecanismos de resistencia inducida en plantas (Orberá *et al.*, 2014).

Dentro de las especies de *Bacillus* que han mostrado actividad antifúngica in vitro sobresalen *Bacillus thuringiensis* contra *Rhizoctonia solani*, *Pyricularia grisea*, *Fusarium oxysporum* y *F. solani* (Knaak *et al.*, 2007), *Bacillus amyloliquefaciens* contra *Colletotrichum* (Kim & Chung, 2004); *Bacillus subtilis* contra un amplio rango de hongos anamorfos, donde destacan *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium sp.*, *Rhizopus sp.* y *Macrophomina phaseolina* (Melentev *et al.*, 2006) y *Bacillus licheniformis* contra *Curvularia* y *Pyricularia grisea* (Tendulkar *et al.*, 2007).

5.5.1.1. Actividad antifúngica de *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es una bacteria Gram-positiva de forma bacilar, que forma una endospora central bajo condiciones de estrés, es estrictamente aeróbica; los mecanismos que median en su capacidad antagónica están dados principalmente por la producción de subtilina y otros antibióticos de la familia de las Iturinas que actúan sobre la pared celular de los hongos.

La especie de *B. subtilis* se puede utilizar a través de la producción extracelular de antibióticos, lipopéptidos antimicrobianos y enzimas hidrolíticas como las quitinasas y proteasas. Según Orberá *et al.* (2014), se ha evidenciado la actividad antifúngica de amplio espectro de *B. subtilis* en el control de hongos fitopatógenos, expresado mediante la creación de metabolitos causantes de alteraciones en la estructura y la ultra estructura fúngica. Otro mecanismo se relaciona con la estimulación de la resistencia sistémica inducida (RSI) de la planta. Maldonado y su equipo evaluaron la acción de *Bacillus subtilis* en la estimulación de la resistencia sistémica inducida (RSI) para proteger la calabacita

del virus del mosaico del cohombro, encontrando que las plantas tratadas con el microorganismo mostraron diferencias estadísticas significativas en la concentración de unidades virales, además se ha demostrado que la RSI por *Bacillus subtilis*, no solo es efectiva contra virus, sino también contra hongos y bacterias patógenas (Maldonado *et al.*, 2008).

De acuerdo a Fernández y Vega (2001) *Bacillus subtilis* es uno de los mejores representantes del género *Bacillus*, es un fuerte antagonista y fitoprotector en cultivos de aguacate, tomate, frijol y cebolla, brindando protección contra fitopatógenos como *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium moniliforme* y *Alternaria porri*. Esta amplia capacidad antagonista en parte se debe a los mecanismos usados por *B. subtilis* que le permite una alta efectividad frente a un amplio espectro de hongos filamentosos patógenos.

VI. DISEÑO METODOLÓGICO

6.1. Ubicación del estudio

El aislamiento y caracterización microbiana en la búsqueda de *Bacillus subtilis* a partir de bioinsumos comerciales y las pruebas de antagonismos frente a hongos fitopatógenos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de las Aguas del Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales (PIENSA) de la Universidad Nacional de Ingeniería, ubicado en el Recinto Universitario Simón Bolívar, en la Avenida Universitaria, Managua, Nicaragua.

Los microorganismos aislados seleccionados fueron enviados al Centro de Biología Molecular (CBM) de la Universidad Centroamericana (UCA), donde se contrataron los servicios de secuenciación de ADN genómico. Una vez recibidas las secuencias se continuó con las actividades de bioinformática en el PIENSA-UNI.

6.2. Métodos

6.2.1. Recolección de bioinsumos comerciales

Se recolectaron 4 bioinsumos comerciales producidos en dos zonas del país (occidente y norte), en presentaciones líquidas y sólidas. Estos se transportaron de los sitios donde se comercializan al laboratorio de microbiología de las aguas, en el PIENSA-UNI donde se conservaron en el refrigerador hasta su utilización el día siguiente.

6.2.2. Aislamiento de microorganismos

El aislamiento de microorganismos se realizó en medios de cultivo sólidos a partir de muestras individuales tomadas de cada bioinsumo recolectado. Para esto se inoculó (sembró) en superficie, por triplicado. Posteriormente se seleccionaron los diferentes tipos de colonias obtenidas y se sembraron por estrías para la obtención de cultivos puros.

6.2.2.1. Preparación de medios de cultivo

- **Medio Agar Nutritivo (AN):** Se agregaron 23 g de agar nutritivo comercial en un litro de agua destilada.
- **Agar Plate Count (PCA):** Se agregaron 23.5 g de agar plate count comercial en un litro de agua destilada.
- **Agar Papa Dextrosa (PDA):** Se agregaron 39 g de agar papa dextrosa comercial en un litro de agua destilada.

Se sometieron a calentamiento hasta comenzar a hervir en el Hot Plate CORNING PC-620D. Posteriormente se procedió a esterilizar por calor húmedo en el autoclave Danfoss Mod. 40/70 a 121°C durante 15 minutos a una presión de 100 kPa. La correcta esterilización se garantizó mediante el uso de cinta adhesiva para el control de autoclave. Finalmente se sirvieron en placas Petri dejándolos solidificar a temperatura ambiente (Figura 10A-D) (Solano, 2006).



Figura 10. Preparación de los medios de cultivo. A: Medios de cultivo comerciales en sus envases; B: Calentamiento del medio de cultivo en el Hot Plate; C: Esterilización en el autoclave a 121°C durante 15 minutos; D: Placas Petri con el medio de cultivo solidificado.

6.2.2.2. Inoculación de muestras de bioinsumos (Primera siembra)

Se tomaron muestras representativas de cada bioinsumo para ser inoculadas en tres medios de cultivos. La inoculación (primera siembra en este caso) se realizó por triplicado en placas Petri desechables con Agar Papa Dextrosa (PDA), Agar Plate Count (PCA) y Agar Nutritivo (AN). En los medios PCA y AN se pretendía observar el crecimiento bacteriano, mientras que en el medio de PDA el

crecimiento de hongos en general, tanto filamentosos como levaduriformes. La técnica utilizada fue la siembra en superficie por extensión o bañado (Figura 11), ya que se deseaba pescar todos los microorganismos posibles para posteriormente proceder a la selección y aislamiento (Cuervo, 2010).

Para los bioinsumos sólidos se prepararon filtrados, se tomó una muestra de 5 g y se mezcló con 5 mL de agua destilada estéril en un tubo de ensayo. En cambio para los bioinsumos líquidos solamente se tomó una muestra de 5 mL la cual también fue colocada en un tubo de ensayo.

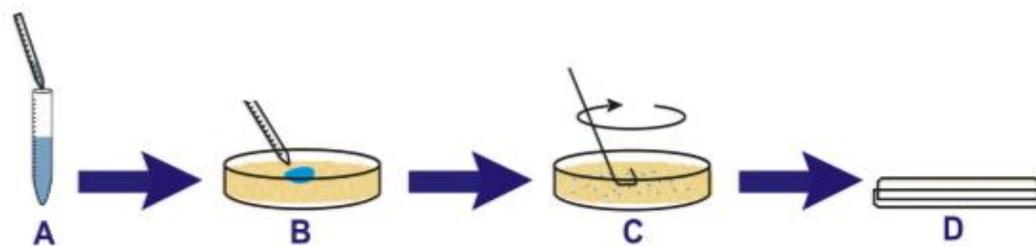


Figura 11. Proceso de inoculación (siembra) por extensión o bañado en superficie. Fuente: (Moreno & Albarracín, 2012).

Todos los tubos con las muestras se agitaron en el agitador vortex. Luego se tomó 0.1 mL con una micropipeta (Figura 11 A) y se depositó en gotas sobre el medio de cultivo en la placa Petri (Figura 11 B). El inóculo se distribuyó sobre toda la superficie del medio usando una varilla de Digralsky esterilizada previamente (Figura 11 C). Finalmente todas las placas se incubaron a 35°C por 24 horas para bacterias y de 7 a 14 días para hongos.

6.2.2.3. Selección y aislamiento de microorganismos

La selección y aislamiento se realizó a partir de las colonias obtenidas en la primera inoculación de las muestras. Al tener las placas con crecimiento microbiano en un cultivo mixto se seleccionaron las colonias de bacterias y hongos que poseían características que permitían diferenciarlas macroscópicamente (Figura 12 y 13 A). Estas se purificaron por repiques sucesivos hasta observar que todas las colonias en la misma placa eran

idénticas. Posteriormente se realizaron las pruebas de tinción de Gram a las bacterias y observación de esporas para hongos filamentosos (Cuervo, 2010).

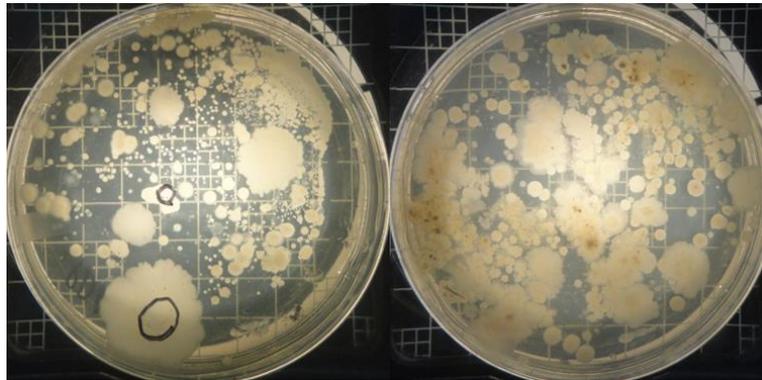


Figura 12. Placas Petri con cultivos mixtos producto de la primera siembra.

Para garantizar la calidad de los resultados, todos los procedimientos se realizaron siguiendo las normas de asepsia y limpieza en el laboratorio de microbiología, con la debida desinfección del área de trabajo y la esterilización de los medios y materiales utilizados por calor húmedo (autoclave) o calor seco (horno), respectivamente.

- **Bacterias**

Las placas Petri con la primera inoculación (siembra) se revisaron a las 24 horas de incubación para seleccionar las colonias bacterianas de características morfológicas (color, borde, contextura) distintas. El aislamiento de las colonias seleccionadas se realizó en medio agar nutritivo utilizando la técnica de agotamiento por estrías (Figura 13 B), por duplicado.

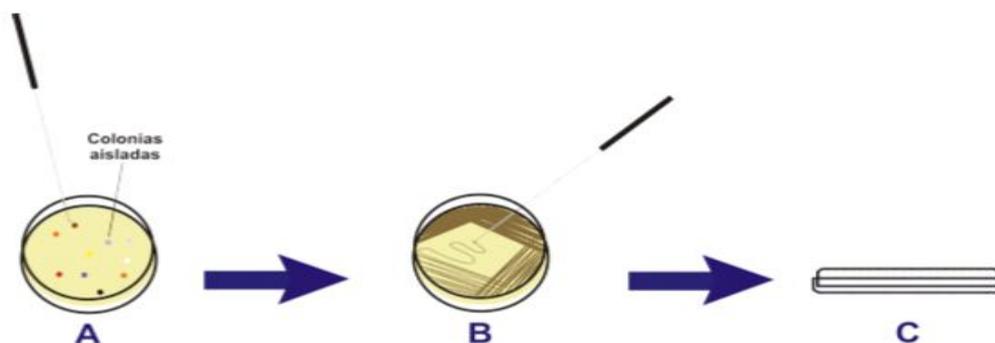


Figura 13. Re inoculación (Resiembra) por agotamiento en estrías de las colonias seleccionadas. Fuente: (Moreno & Albarracín, 2012).

Las placas se incubaron por 24 horas. Los repiques sucesivos o resiembras se realizaron tomando inóculo de las colonias que crecían aisladas en las últimas estrías (Cuervo, 2010).

- **Hongos**

Las placas Petri con la primera inoculación (siembra) en medio PDA se revisaron a los 5, 7 y 14 días de incubación, para observar si existía crecimiento de hongos filamentosos y/o levaduriformes. Se seleccionaron las colonias que poseían aspectos y colores distintos de micelio. Los hongos filamentosos se aislaron tomando filamentos o trocitos del hongo con el asa de siembra recta (Figura 14 A-B) y las levaduras utilizando el agotamiento por estrías (Figura 13), procurando en ambas tomar de las zonas donde no hubiera contaminación de algún otro microorganismo y sembrándolo por duplicado en medio fresco PDA (Solano, 2006).

Las placas se dejaron en incubación entre 5 y 7 días dependiendo del crecimiento que estos presentaran. Cuando crecían contaminantes se realizaban repiques sucesivos hasta obtener el hongo puro (Figura 14 C).

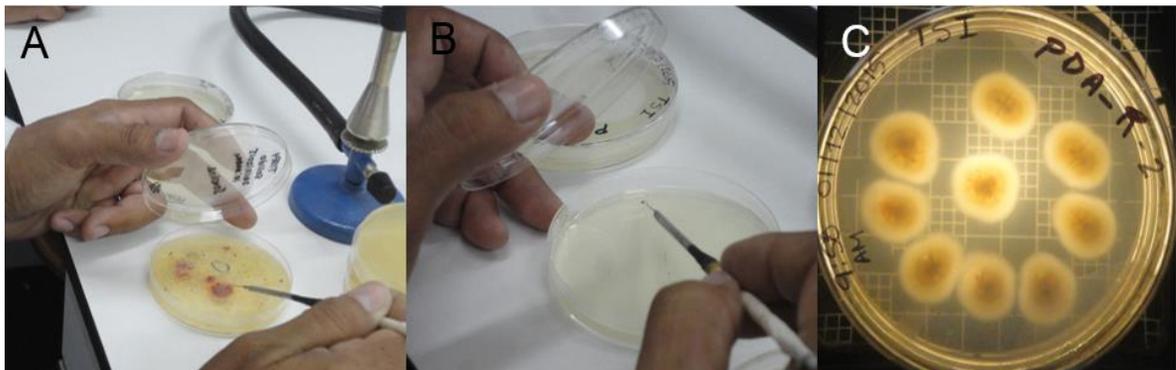


Figura 14: Aislamiento de hongos filamentosos. A) Micelio del hongo tomado con el asa de siembra recta; B) Depósito del hongo en medio PDA; C) Microorganismo aislado.

6.2.3. Identificación morfológica de los microorganismos de bioinsumos

Para la identificación morfológica de los microorganismos se realizaron observaciones al microscopio de luz OLYMPUS CHT. Se realizó tinción de Gram

a las bacterias, observación de esporas para los hongos filamentosos y tinción simple para observar la forma de las células de las levaduras.

- **Bacterias**

Se realizó la tinción de Gram a los aislados de bacterias a las 24 horas de incubación siguiendo el procedimiento descrito por Santambrosio y Ortega (2009). Inicialmente se preparó y fijó el frotis (Figura 15 A-B). Se tomó una pequeña parte de la colonia con el asa de siembra y se dispersó en una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos. Luego, usando el asa se extendió homogéneamente la muestra sobre el portaobjetos para formar una capa delgada y uniforme. Simultáneamente el portaobjetos se flameaba sobre la llama del mechero hasta conseguir la sequedad total de éste. Posteriormente se realizó la aplicación de colorantes y decolorantes (Figura 15 C) en el siguiente orden: Cristal violeta por 1 minuto, Yodo-Lugol por 1 minuto, Alcohol-acetona durante 20 segundos para decolorar la muestra y Safranina por 1 minuto. Luego de cada aplicación se lavaba suavemente con agua para eliminar el exceso. Finalmente se dejó secar y se observó en el microscopio de luz con objetivo de inmersión 100 x (Figura 15 D). Esta técnica nos permitió observar la morfología (cocos, bacilos, etc.), tamaño y agrupaciones que formaban las bacterias, así como su clasificación en Gram positivas o Gram negativas. Además, se logró comprobar la pureza de los aislados.

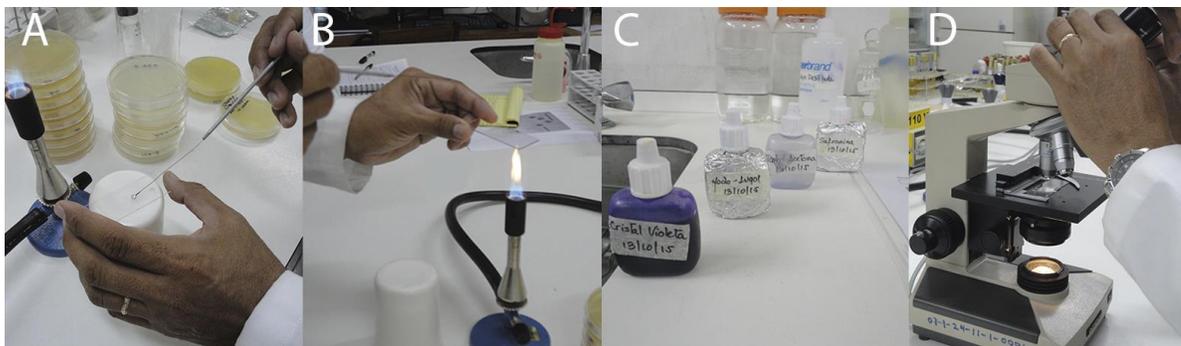


Figura 15. Tinción Gram en bacterias. A) Preparación del frotis en un portaobjetos; B) Fijación del frotis con calor; C) Recipientes de los colorantes, solución mordiente y decolorante utilizados en la tinción de Gram; D) Observación en el microscopio con objetivo 100x.

- **Hongos**

- **Filamentosos**

Se dejaron en esporulación a temperatura ambiente del laboratorio ($28^{\circ}\text{C} \pm 1$) en las placas Petri con medio PDA, entre 7 y 14 días. Para observar su morfología se realizó un montaje con cinta adhesiva transparente presionando esta suavemente sobre la superficie del hongo y colocándola sobre un portaobjetos. Las observaciones se hicieron en el microscopio de luz con los objetivos 40x y 100x.

- **Levaduriforme**

Se realizó tinción simple con cristal violeta. En una gota de agua destilada estéril sobre un portaobjetos se colocó una pequeña muestra de la colonia con el asa de siembra. Posteriormente se colocó una gota de cristal violeta y se cubrió con un cubreobjetos. Finalmente se observó en el microscopio de luz con los objetivos 40x y 100x (Moreno & Albarracín, 2012).

6.2.4. Conservación de los microorganismos aislados

Los microorganismos se conservaron usando el método de transferencia periódica que consiste en transferir el cultivo a un medio de cultivo nutritivo y fresco a intervalos que aseguren la viabilidad del mismo (Hernández & Loaiza, 2014). La transferencia se realizó en medio agar nutritivo para bacterias y agar papa dextrosa para hongos filamentosos y levaduriformes. Los intervalos entre cada transferencia fueron de un mes. Los subcultivos se almacenaron en un refrigerador a una temperatura de 10°C .

6.2.5. Identificación molecular de los microorganismos seleccionados

Se llevó a cabo a través de la secuenciación parcial del gen ADN ribosomal 16S para bacterias e ITS 1 (Internal Transcribed Space) para hongos, estos genes son una alternativa para buscar la información filogenética y taxonómica de microorganismos (Jiménez, 2007). La comparación de las secuencias del gen

ADNr 16S permite establecer relaciones filogenéticas entre organismos procariotas, de forma similar la región ITS permite hacer lo mismo en eucariotas (Rodríguez, 2013).

El servicio de secuenciación de ADN se contrató en el Centro de Biología Molecular (CBM) de la Universidad Centroamericana. Luego de recibir los electroferogramas con la secuencia de bases (Adenina, Guanina, Citosina, Timina), se procedió a trabajar en la bioinformática y análisis de las secuencias para la obtención de los árboles filogenéticos siguiendo los pasos que se describirán a continuación. Esto nos permitió identificar a nivel de especie la mayoría de los microorganismos seleccionados.

6.2.5.1. Corrección de las secuencias

Los electroferogramas (secuencias de bases ofrecidas por los secuenciadores) recibidos fueron corregidos visualmente usando el programa Bioedit v7.0.9 (Figura 16). Se observó la secuencia de bases, donde se editaron los errores producidos por el secuenciador. Posteriormente se guardaron en formato FASTA (Figura 17). La observación del electroferograma constituye el primer paso del análisis de las secuencias. Algunas veces se producen errores durante la secuenciación y se reflejan en el electroferograma y la secuencia; por ejemplo, asignación de dos T existiendo 3, ó posiciones ambiguas (N) (Bou *et al.*, 2011).

Es importante revisar los electroferogramas antes de continuar con los análisis de la muestra debido a que nos dan mucha información, incluyendo la calidad de la PCR y por ende la confiabilidad de los datos obtenidos (Márquez, Serrato, & Cerritos, 2013).

T T G C T ²²⁰ A T C A C T T A T ²³⁰ A G A T G G A C C C G ²⁴⁰ C G C C

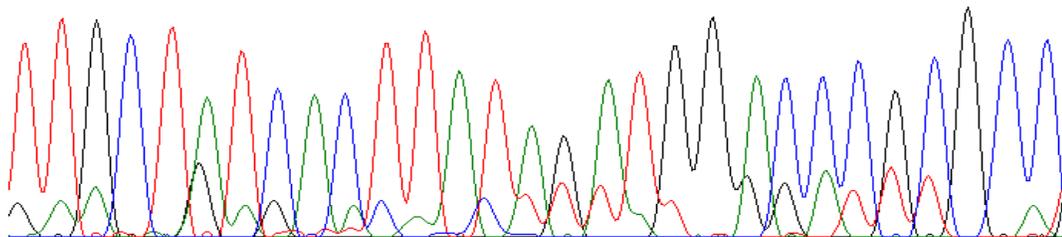


Figura 16. Electroferograma corregido con el uso de Bioedit v7.0.9.

```
>gi|530722907|gb|KF322037.1| Bacillus subtilis strain GPSSC 16S ribosomal RNA gene
AAGAGCATTGGCCCTTGCCTTAATAATGGCAAGTTCGAGCGGACAGATGTGGAGCTTGCTCCCTGATGT
TAGCGGCGGACGGGTAGTAACACGTGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGG
CTAATACCGGATGGTTGTTGAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGAT
GGACCCGCGGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC
CGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGT
TGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAACTACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCCTAAAGGGC
TCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGG
AACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACA
CCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGAT
TAGATACCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGTAAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCT
GCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGAGTACGGTTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACAT
CCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCCTCGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCA
GCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCA
GTTGGGCACCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCC
AATCCCAAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGT
AATCGGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCTGTACAACGACCGGCCAAAGATCGGCTA
CCCCAACCGGGGAAGG
```

Figura 17. Secuencia nucleotídica en formato FASTA. Fuente: NCBI.

6.2.5.2. Comparación de las secuencias

Las secuencias corregidas se compararon con las depositadas en la base de datos del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) para secuencias altamente similares, comparando cada secuencia parcial del gen 16S e ITS para bacterias y hongos, respectivamente. (Castillo-Reyes, *et al.*, 2015).

La introducción de la secuencia y su comparación con otras disponibles en la base de datos con la cual se trabaja proporciona un informe constituido por varias secciones. En el caso del programa BLAST del GenBank, en la primera sección aparece un gráfico que indica el nivel y el tamaño de los fragmentos alineados, seguido de un listado en orden decreciente de las secuencias de microorganismos con los que se muestra la identidad (% de coincidencia) (Figura 18). En la siguiente sección, aparece cada alineamiento de la secuencia problema o query frente a cada secuencia de otro microorganismo, indicando el número y porcentaje de bases idénticas (identity) (Bou *et al.*, 2011).

Se seleccionaron las cinco secuencias que presentaban mayor Identidad y frecuencia con la secuencia del microorganismo en estudio.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Bacillus subtilis strain GPSSC 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	850	850	99%	0.0	92%	KF322037.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus tequilensis strain PSBL12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	850	850	97%	0.0	93%	JX979116.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus subtilis strain WR-W2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	848	848	91%	0.0	94%	FJ222553.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus tequilensis strain ARC340 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	845	845	97%	0.0	92%	KJ381139.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus subtilis strain 30P3-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	843	843	91%	0.0	94%	JN366775.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus sp. hb30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	841	841	96%	0.0	93%	KF863830.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus sp. BAB-3444 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	841	841	96%	0.0	93%	KF917174.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus malacitensis strain ARC036 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	839	839	98%	0.0	92%	KJ381109.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus sp. RB8U4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	839	839	98%	0.0	92%	GU366216.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus subtilis strain 9407 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	837	837	98%	0.0	92%	KX281183.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus sp. J-30 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	837	837	97%	0.0	92%	KP966467.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus sp. J-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	837	837	96%	0.0	92%	KP966461.1
<input type="checkbox"/>	Bacillus tequilensis strain OTEB57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	837	837	96%	0.0	92%	KT265081.1

Figura 18. Listado de secuencias de microorganismos con mayor porcentaje de identidad respecto a la secuencia en estudio mostrado por BLAST. Fuente: NCBI.

6.2.5.3. Alineamiento de secuencias

Se realizó un alineamiento múltiple con las cinco secuencias elegidas para cada secuencia en estudio, utilizando la aplicación Clustal W Multiple alignment for version 1.4 incluida en el menú Accesory Application del programa Bioedit v7.0.9 (Figura 19). Se utilizaron los parámetros por defecto (Rodríguez C., 2013). Posteriormente se repitieron los pasos de comparación de la secuencia alineada en el BLAST y la selección de las cinco secuencias con mayor identidad para ser guardadas en formato FASTA.

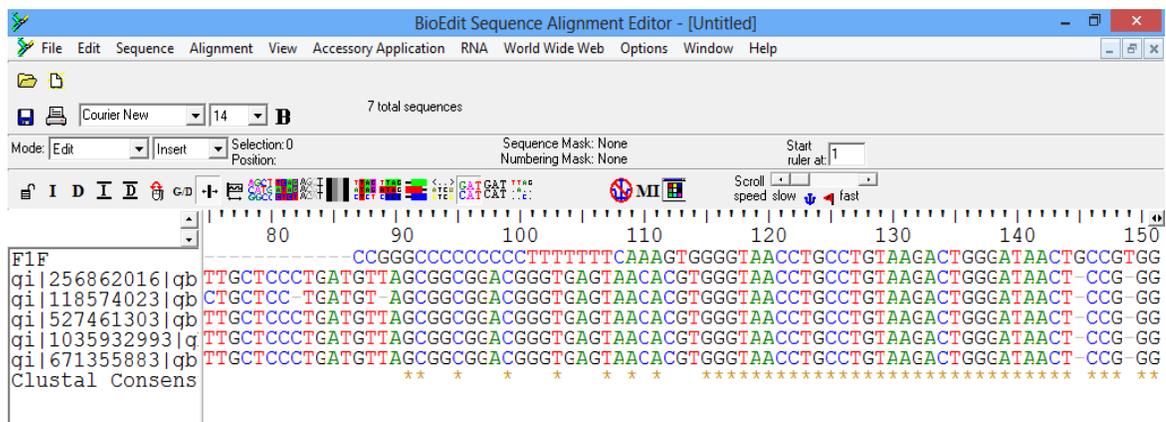


Figura 19. Ventana mostrada en el alineamiento múltiple usando Clustal W versión 1.4 incluido en el programa Bioedit v7.0.9.

6.2.5.4. Construcción de árboles filogenéticos

Se utilizó el programa MEGA 7.0.14 para la construcción de los árboles filogenéticos, usando el método Neighbor-Joining Tree como método de construcción del árbol, y evaluando la confiabilidad haciendo bootstrapping de 1000 repeticiones, teniendo en cuenta que cada rama se deberá repetir como mínimo en el 50% de las veces (Tamura *et al.*, 2011) citado por (Rodríguez C., 2013).

6.2.6. Pruebas de antagonismo

Se realizó una preselección de bacterias con potencial antagónico de los fitopatógenos (screen grueso). Posteriormente se determinó el efecto antagónico

de las bacterias seleccionadas mediante la técnica de confrontación dual (screen fino).

6.2.6.1. Preselección de cepas antagonistas (screen grueso)

La metodología utilizada para este ensayo fue la empleada por (Acosta *et al.*, (2007), con algunas modificaciones. Se sembraron dos cepas bacterianas distintas en placas Petri con PDA haciendo dos líneas paralelas, cada una a 1 cm de distancia del borde de la placa Petri (Figura 20). Seguidamente, se colocó un explante del hongo fitopatógeno en el centro de la placa y se incubó a temperatura ambiente 28°C hasta observar algún efecto en el crecimiento del fitopatógeno. Esto se realizó con las 23 aislados bacterianos de los bioinsumos y 3 aislados bacterianos de ciego de pollo suministradas por el Dr. Omar Navarro del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Agraria (UNA) frente a 3 de los hongos fitopatógenos, *Alternaria* y *Fusarium* aislados de los cultivos de papa (*Solanum tuberosum*) y maní (*Arachis hypogaea*). Se seleccionaron las bacterias que mostraron un efecto en la inhibición del crecimiento micelial de uno o varios hongos fitopatógenos.

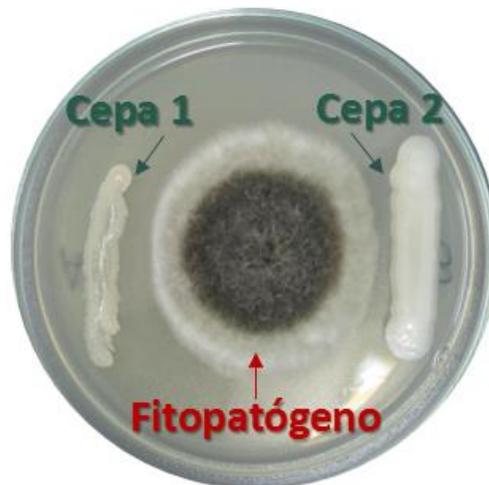


Figura 20. Colocación de los microorganismos a utilizarse en la preselección.

6.2.6.2. Evaluación del efecto antagónico

El efecto antagonista se determinó por medio de la técnica de confrontación dual entre los antagonistas y los fitopatógenos (Figura 21 A). En placa Petri con medio PDA, las bacterias seleccionadas se sembraron por estrías en toda la superficie del medio, se incubaron por 24 horas a 35°C. Posteriormente se colocó en el centro un disco de 0.5 cm de diámetro del fitopatógeno con 7 días de crecimiento previo y se incubó a 28°C, hasta que el testigo con el hongo (Figura 21 B) y sin bacteria llenara la placa Petri.

Se realizaron tres repeticiones por tratamiento. La variable medida fue el diámetro de crecimiento radial del hongo fitopatógeno en presencia del antagonista bacteriano. Como control negativo o testigo se utilizaron placas donde se encontraban únicamente los hongos evaluados; con las mediciones obtenidas se determinó el porcentaje de inhibición, utilizando la Ecuación 1 de Badía *et al.* (2011) y la tasa de crecimiento micelial en centímetros por día mediante la Ecuación 2 sugerida por Mead *et al.* (1993).

- **Ecuación 1**

$$\text{Porcentaje de inhibición} = \left(\frac{(D.C.C - D.C.P)}{D.C.C} \right) \times 100$$

Dónde:

D.C.C: Diámetro de la colonia control (testigo) (cm).

D.C.P: Diámetro de la colonia problema (hongo en presencia de los antagonistas) (cm).

- **Ecuación 2**

$$\text{Tasa de crecimiento} = \left(\frac{Cf - Ci}{Tf - Ti} \right)$$

Dónde:

Cf: Crecimiento final (cm).

Ci: Crecimiento inicial, día uno (cm).

Tf: tiempo final de crecimiento (cm).

Ti: tiempo inicial, día uno (cm).

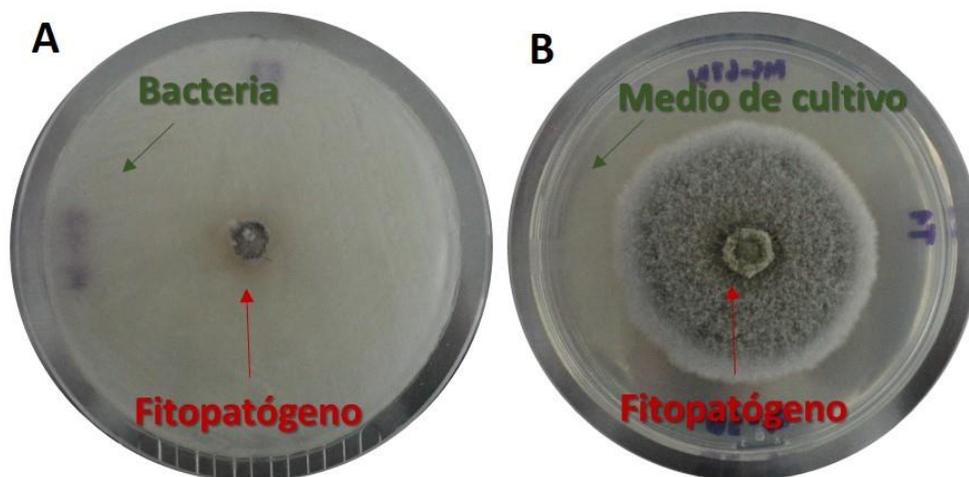


Figura 21. Colocación de los microorganismos en las pruebas de confrontación dual (screen fino). A) Tratamiento Bacteria vs Fitopatógono; B) Tratamiento testigo con el fitopatógono sin presencia de bacteria.

7.2.6.3. Hongos fitopatógenos utilizados en las pruebas

Se utilizaron cinco aislamientos nativos, uno de *Alternaria* y cuatro de *Fusarium*. *Alternaria* fue aislado de hojas de papa (*Solanum tuberosum*) provenientes de cultivos de fincas en Jinotega; dos de los aislamientos de *Fusarium* (M1-2-1 y M3-1-1) aislados de plantas de papa fueron suministrados por el Msc. Julio Gómez del Programa Institucional Agropecuario y Agroindustrial de la Universidad Nacional de Ingeniería, UNI; los otros dos aislamientos de *Fusarium* (F9 y F15) aislados de plantas de maní (*Arachis hypogaea*) fueron suministrados por el Ing. Luis Moreno del Laboratorio de fitopatógenos de la Facultad de Agroecología, de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, UNAN-León.

A todos los hongos se les realizó visión de esporas en el microscopio para comprobar que concordaran con las de estos géneros. Posteriormente fueron identificados vía molecular siguiendo el procedimiento descrito en el acápite 7.2.5 para definir con que especies se estaba tratando.

VII. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se tomaron muestras de 4 bioinsumos comerciales recolectados en dos zonas del país (occidente y norte), en presentaciones líquidas y sólidas. Dichas muestras se inocularon en medios de cultivos sólidos para el aislamiento de la diversidad microbiana cultivable, la identificación de microorganismos seleccionados en la búsqueda de la bacteria *Bacillus subtilis* con vistas a su posterior evaluación in vitro frente a hongos fitopatógenos mediante pruebas de antagonismo.

El desarrollo de esta tesis nos permitió obtener los siguientes resultados en correspondencia con los objetivos propuestos para el presente trabajo.

7.1. Aislamiento de microorganismos

Durante el último siglo se ha dependido del aislamiento y cultivo de los microorganismos para su identificación. Estos han sido caracterizados según su fenotipo (el conjunto de propiedades celulares observables). La necesidad de cultivar los microorganismos para identificarlos ha limitado la comprensión de la diversidad microbiana, ya que ahora se sabe que más del 90% de los microorganismos en los ambientes naturales no pueden ser cultivados usando las técnicas tradicionales. Esto debido a dificultades intrínsecas en el cultivo (microorganismos parásitos de otros), al desconocimiento de los requerimientos específicos de cultivo, y a la existencia de grupos de microorganismos que deben mantenerse en equilibrio para poder sobrevivir (Amann & Kühn, 1998).

Cuervo (2010) aisló microorganismos de dos biofertilizantes comerciales (uno de producción artesanal en medio líquido que especificaba contenía un coctel de microorganismos, el otro en medio sólido en polvo, que indicaba se componía de un *Bacillus sp.*) obteniendo solamente 3 aislados bacterianos que se identificaron mediante pruebas bioquímicas como: *Bacillus subtilis* en el del medio sólido, *Bacillus firmus* y *Bacillus sphaericus* en el del medio líquido.

En esta investigación se utilizaron métodos clásicos o tradicionales de cultivos, se logró aislar la microbiota cultivable presente en estas muestras, sin embargo, esta no representa a todos los microorganismos que se encuentran en ellas sino solamente a los que fueron capaces de crecer en los tres medios de cultivo enriquecidos utilizados (AN, PCA y PDA). Esto se debe a lo planteado anteriormente, que la mayoría de los microorganismos no pueden ser cultivados.

A partir de la inoculación por extensión o bañado (primera siembra), se realizó la selección de las colonias de microorganismos con características macroscópicas (color, consistencia) distintas, a las 24 horas de incubación en el caso de las bacterias y de 7 a 14 días para hongos, a una temperatura de 35° C. El aislamiento a partir de los cultivos mixtos obtenidos como los mostrados en la Figura 22 AI-AIII y en el Anexo 3, Imagen 1 y 2 (pág. viii), se realizó como se describió en el acápite de métodos. De esta forma se obtuvieron 30 aislados entre bacterias y hongos, de estos 23 fueron bacterianos, 6 de hongos filamentosos y 1 levaduriforme como los mostrados en la Figura 22 BI-BIII. Los resultados se resumen en el Cuadro 1, en donde se observa el número de cepas bacterianas y de hongos (filamentosos y levaduriformes) que lograron aislarse en cada muestra.

Cuadro 1. Cantidad de microorganismos aislados a partir de las muestras de los 4 bioinsumos, estado del producto (sólido o líquido), zona de procedencia y código de estos.

No.	Estado	Zona de procedencia	Código	No. bacterias	No. hongos	
					Filamentosos	Levaduriforme
1	Sólido	Norte	TS	5	3	-
2	Sólido	Norte	LS	6	1	-
3	Líquido	Norte	LL	3	2	-
4	Líquido	Occidente	DCL	9		1
Total				23	6	1

En el Cuadro 1 se puede observar que el mayor número de aislados se obtuvo en la muestra No. 4 con 10 microorganismos en total, mientras que el menor número de estos se encontró en la muestra No. 3, solamente con 5. Esto podría deberse a que el bioinsumo No. 4 proveniente del occidente posee un medio donde se pueden desarrollar con facilidad un mayor número de microorganismos.

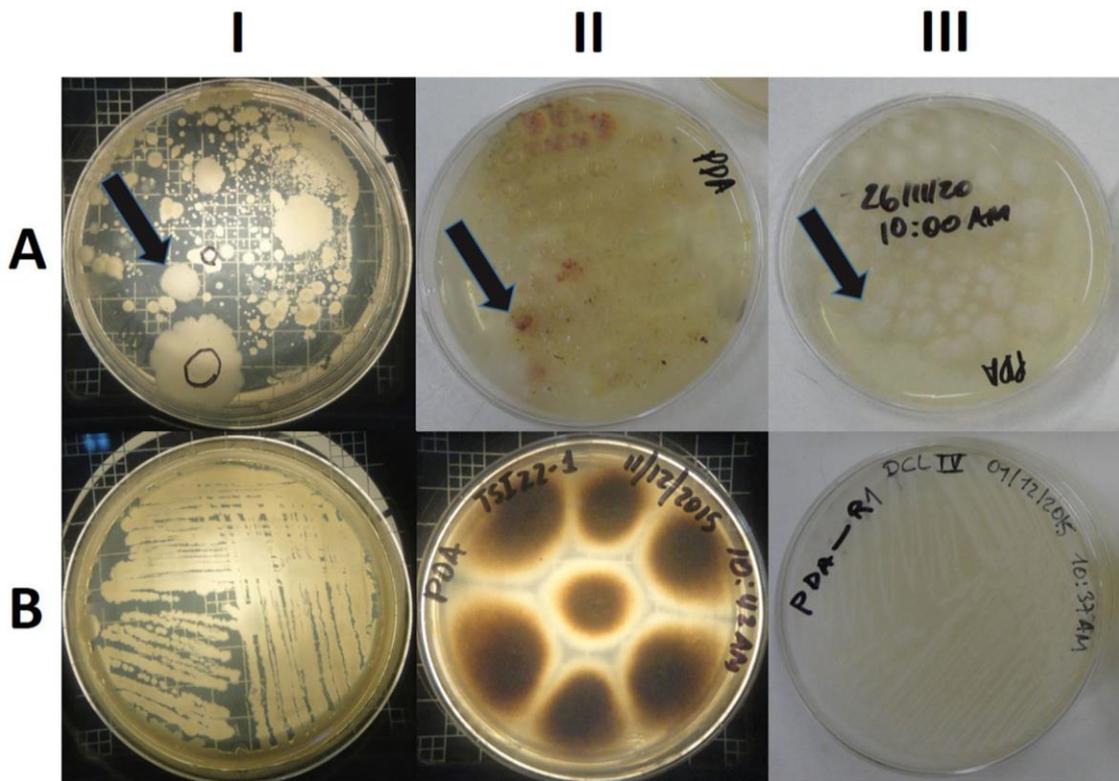


Figura 22. Aislamiento de microorganismos cultivables presentes en las muestras de los bioinsumos. AI-AIII: Placas Petri con cultivo mixto inicial. Las flechas señalan colonias seleccionadas para aislarse de una bacteria, un hongo filamentosos y uno levaduriforme, que se muestran aislados en BI, BII y BIII respectivamente.

Estos resultados difieren de lo reportado por Cuervo (2010) que aisló microorganismos de dos biofertilizantes comerciales obteniendo solamente 3 aislados bacterianos. Esto podría estar relacionado al bajo nivel tecnológico con el que se producen los bioinsumos utilizados actualmente en Nicaragua que no poseen cepas selectas según se indica en el documento “Estado de la Agricultura Orgánica en Nicaragua: Propuesta para su Fomento y Desarrollo” (2005). Por el

contrario, están compuestas por una cantidad de microorganismos de los cuales no se conoce su identidad y su función dentro del producto (si son o no benéficos). No obstante, esto nos permitió obtener un mayor número de microorganismos aumentando la posibilidad de encontrar alguna especie nativa de *Bacillus subtilis*.

7.2. Identificación morfológica de los microorganismos

La identificación morfológica de los microorganismos se realizó mediante observaciones en el microscopio de luz para verificar si se trataba de bacterias, hongos filamentosos u hongos levaduriformes, de acuerdo con la morfología observada. Para conocer la morfología microscópica de las bacterias se observó la forma y tamaño de la célula (para diferenciarlas de las levaduras), además de su coloración en la tinción de Gram. En el caso de los hongos se distinguían en filamentosos o levaduriformes, primero por las características macroscópicas de las colonias, como la apariencia, algodonosa en los primeros y mucosa o cremosa (parecida a la de las bacteria) en los segundos. Posteriormente se realizó la observación de esporas para hongos filamentosos y tinción simple para observar las células de los hongos levaduriformes.

7.2.1. Identificación Gram de bacterias

Badía *et al.*, (2011) realizaron observaciones microscópicas con tinción de Gram para comprobar la pureza y determinar las características micro morfológicas y tintoriales de bacterias aisladas de muestras de suelo de la rizósfera del cultivo del arroz, con el fin de ubicar dentro del género *Bacillus* los bacilos Gram positivos que presentaran endosporas. Con estas características obtuvieron 13 aislamientos bacterianos.

A los aislados bacterianos puros obtenidos en este trabajo, después de incubarlos por 24 horas en medio AN (Agar Nutritivo) a 35° C se les sometió a pruebas de tinción de Gram. Se observó la forma y tamaño de las células al microscopio de luz con objetivo 100x con aceite de inmersión, así como su

clasificación en Gram positivas o Gram Negativas por el color con el que se tiñeran. De acuerdo a la forma de la célula y el resultado de la tinción, se obtuvieron 22 de forma bacilar de distintos tamaños: 12 *Gram positivos* (entre paréntesis se muestra la ubicación en la Figura 23 del Gram correspondiente a cada bacteria): DCL1-2 (AI b), DCL2-1 (CI b), DCL2-411 (DI b), DCL3-3 (EI b), DCL4-31 (GI b), LS5-11 (FII b), LS5-21 (GII b), LS6-11 (HII b), LS6-211 (AIII b), TS10-111 (CIII b), TS11-3 (DIII b) y TS13-1111; 3 *Gram variables*: DCL3-4 (FI b), LS5-1 (EII b) y TS11-31 (EIII b); 7 *Gram negativos*: DCL1-11 (BI b), DCL12-21 (HI b), DCL12-1111 (AII b), LL8-221 (CII b), LL9-21 (DII b), LS7-211 (BIII b) y TS13-2111 (GIII b); y 1 de forma cocal Gram positivo: LL8-111 (BII b).

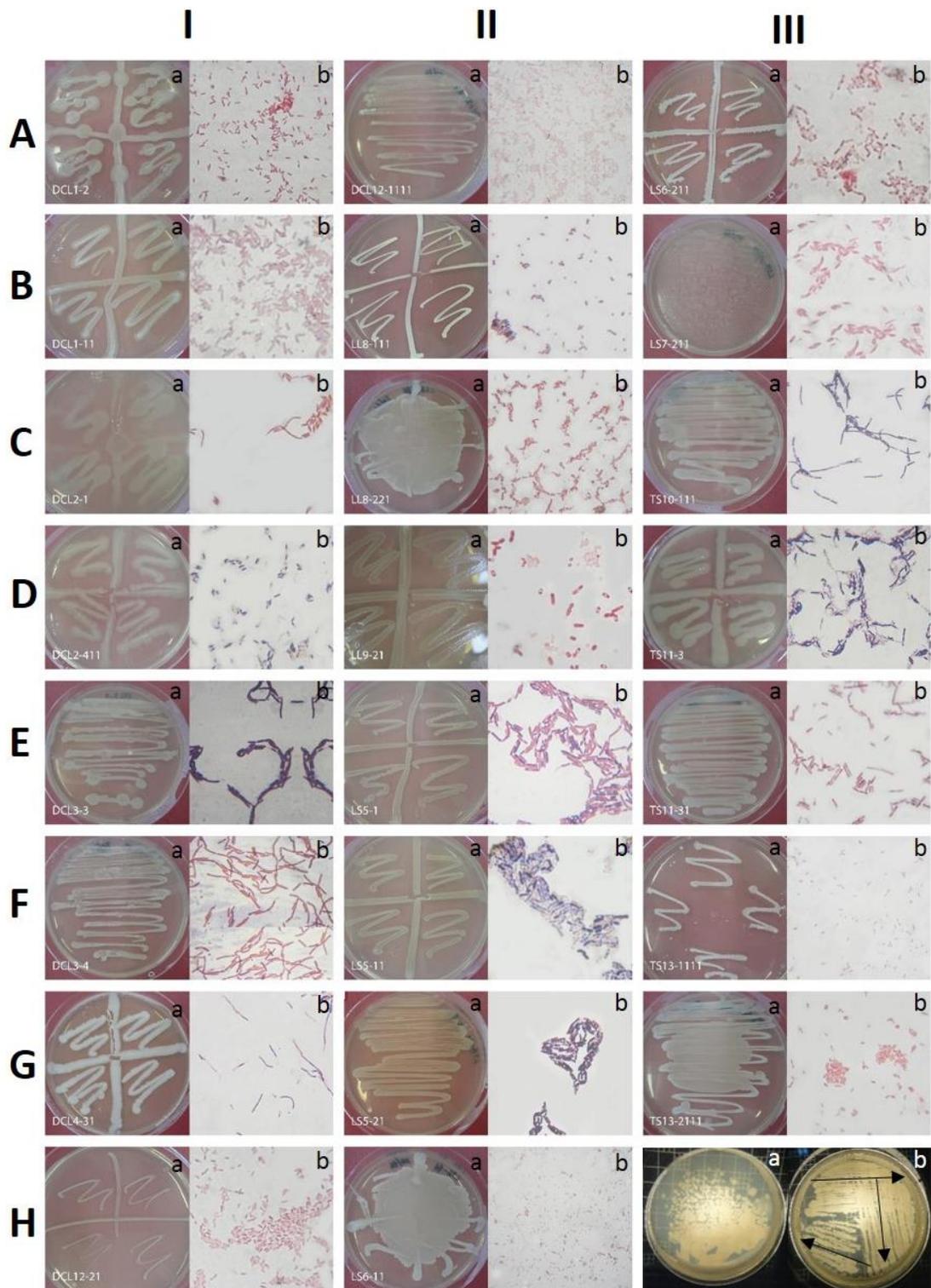


Figura 23. Morfología en placa y tinción de Gram de los aislados bacterianos. AI-HI, AII: Muestra 4; BII-DII: Muestra 3; EII-HII, AIII, BIII: Muestra 2; CIII-GIII: Muestra 1; HIII a: Cultivo mixto obtenido en la primera inoculación y HIII b: agotamiento por estrías.

En la Figura 23 se puede observar que de las 23 bacterias aisladas se obtuvieron 12 bacterias de forma bacilar que resultaron ser Gram positivas (DCL1-2, DCL2-1, DCL2-411, DCL3-3, DCL4-31, LS5-11, LS5-21, LS6-11, LS6-211, TS10-111, TS11-3, TS13-1111), características del género *Bacillus*. Esto concuerda con los resultados de Badía *et al.* (2011) donde obtuvieron 13 aislados con estas características. De acuerdo con Tejera *et al.* (2011) la presencia de endosporas bacterianas que constituyen una estructura de resistencia que puede permanecer viable durante una gran cantidad de tiempo hasta que las condiciones se tornen favorables para el desarrollo de la forma vegetativa, justificaría la gran cantidad de especies del género *Bacillus* que se encuentren en una gran variedad de hábitats. Travers *et al.* (1987) refuerzan esta afirmación explicando que las especies de *Bacillus* son ubicuas en la naturaleza, encontrándose en mayor proporción en los suelos como microorganismos saprófitos, resultando de gran utilidad usar muestras de suelo como fuente de inóculo. Para el caso de los bioinsumos utilizados, uno de sus componentes son suelos tomados de distintas zonas, lo cual explicaría la cantidad de aislados bacilares Gram positivos obtenidos de las muestras.

Los aislados bacterianos obtenidos se conservaron en medio de cultivo fresco Agar Nutritivo en placas Petri a 4° C, con repiques periódicos mensuales para su posterior identificación vía molecular y pruebas de antagonismo frente a fitopatógenos.

7.2.2. Identificación de hongos filamentosos de los bioinsumos según su tipo de spora

Arias y Piñeros, (2008) aislaron hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de dos zonas en Colombia, identificando el género y posible especie mediante el uso de claves taxonómicas teniendo en cuenta las características macro y microscópicas, dentro de estas últimas la observación de esporas. Los géneros de mayor incidencia que obtuvieron corresponden a *Penicillium* y *Aspergillus*.

Los aislados puros de hongos filamentosos obtenidos en este trabajo, luego de crecer en medio PDA (Agar Papa Dextrosa), se dejaron en esporulación entre 7 y 14 días a temperatura ambiente del laboratorio ($28^{\circ} \text{C} \pm 1$). Se observaron sus características morfológicas al microscopio de luz con objetivo 40x poniendo atención al tipo de esporas que presentaran y a las características macroscópicas como el color y apariencia que presentaban las colonias (Figura 24), con el fin de compararlos con referencias. En el Cuadro 2 se describen las características de los 6 aislados de hongos filamentosos obtenidos.

Cuadro 2. Características macro y microscópicas de los hongos filamentosos aislados de muestras de bioinsumos.

Código	Color anverso de placa con PDA	Color al reverso de placa con PDA	Apariencia micelio	Forma de la espora	Posible Género
TSI-2222	Marrón rojizo	Marrón oscuro	Algodonosa	Esférica	Pendiente identificación
TSII-211	Blanco verdoso	Crema	Aterciopelada-pulvurolenta	Esférica	Pendiente identificación
TSIII-2111	Blanco verdoso	Crema	Aterciopelada-pulvurolenta	Esférica	Pendiente identificación
LLV-2111	Verde-Blanco-Negro	Verde-Beige	Granulosa-Pulvurolenta	Esférica	Pendiente identificación
LSVI-12	Blanco-Verde	Verde oscuro	Aterciopelada	Esférica	<i>Penicillium sp.</i>
LLVII-12	Blanco-crema	Blanco	Algodonosa	Esférica	Pendiente identificación

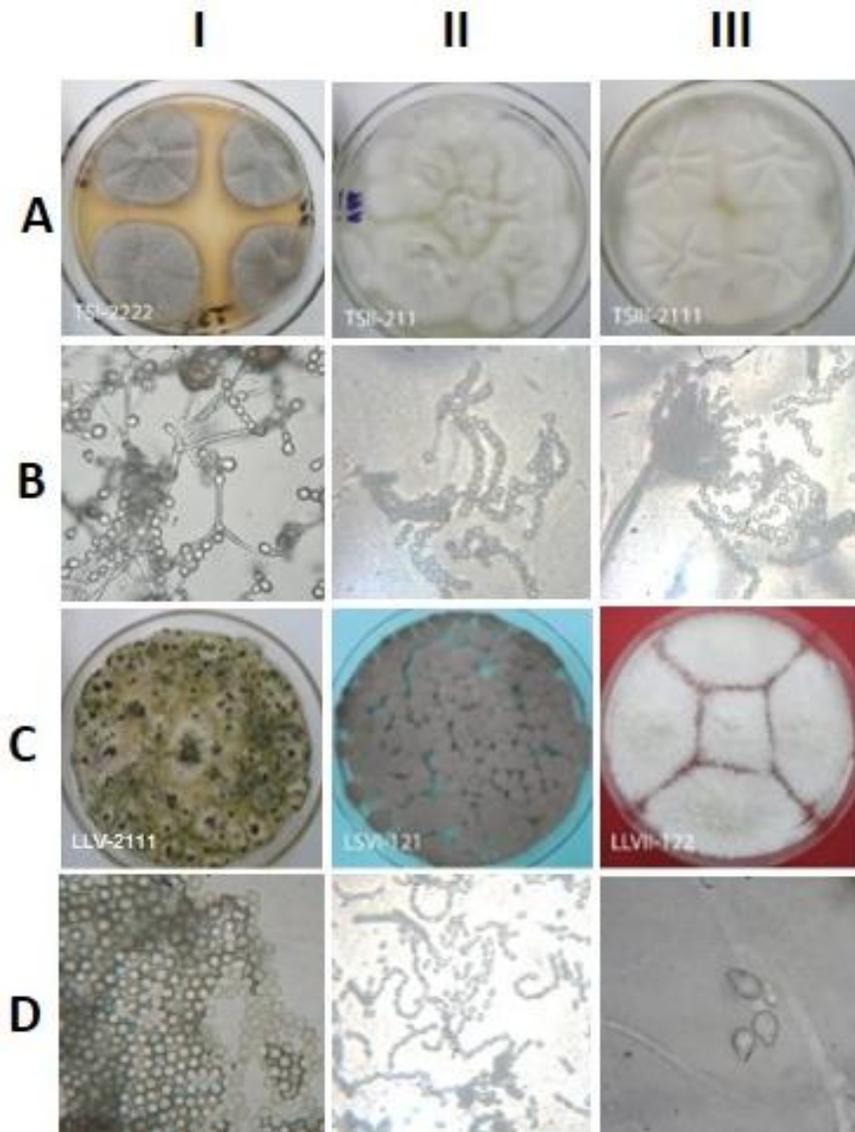


Figura 24 . Hongos filamentosos aislados de muestras de bioinsumos. En las filas A y C se muestra la morfología en placa de cada hongo filamentosos, mientras que en B y D, debajo de cada hongo, se muestran las esporas observadas en cada uno.

Los resultados de la observación de las características macroscópicas y microscópicas y su comparación con lo descrito en la literatura (Arias & Jerez, 2008; Arias & Piñeros, 2008) nos condujeron a una aproximación del posible género con el que se estaba tratando solamente para el aislado LSVI-121. Por su morfología en placa (Figura 24 CII) con colonias inicialmente de color blanco que se tornan verdes cuando envejece el cultivo y sus esporas esféricas (Figura 24 DII) se sugiere que pertenezca al género *Penicillium sp.* Sin embargo, para los demás no se lograron dar aproximaciones debido a que las características

observadas no coincidieron con las encontradas en la literatura consultada hasta el momento. Esto podría deberse a la gran diversidad de género y especies existentes de hongos filamentosos. Por consiguiente, se recomienda hacer uso de otras pruebas morfológicas y/o moleculares para su debida identificación. Los 6 aislados obtenidos se conservaron en medio Agar Papa Dextrosa a 4° C, con repiques mensuales para su posterior uso en investigaciones.

7.2.3. Identificación de levaduras

La forma de las levaduras no es un indicio para la identificación de especies, ni la variedad morfológica en un mismo cultivo es una prueba de la contaminación del mismo. No obstante las características morfológicas y sexuales permiten generalmente identificar el género de estas (Carrillo & Audisio, 2007). Uribe (2007) caracterizó fisiológicamente levaduras aisladas de la filósfera de mora, donde en primera instancia las caracterizaron morfológicamente de acuerdo al color, forma y textura de las colonias macroscópicamente hablando y microscópicamente observando la forma y tamaño de las células, así como presencia o no de pseudo micelio. De esta manera encontró un mayor número de levaduras de color blanco y crema, mientras que en las características microscópicas predominó la forma redonda de las células logrando identificar una posible levadura *Aerobasidium pullulans* de acuerdo a estas características.

Para el aislamiento de levaduras, se siguió un procedimiento similar al seguido previamente para bacterias (véase la sección de métodos). La única levadura que se encontró se aisló de la muestra No 4 correspondiente al bioinsumo de occidente (DCL) en estado líquido (Cuadro 1). Macroscópicamente se observaron colonias de color blanco brillante (Figura 25 AI) que al envejecer presentaban estructuras que asemejaban hifas. Microscópicamente las células eran elipsoides y se observó presencia de pseudohifas luego de siete días de crecimiento (Figura 25 AII y AIII respectivamente).

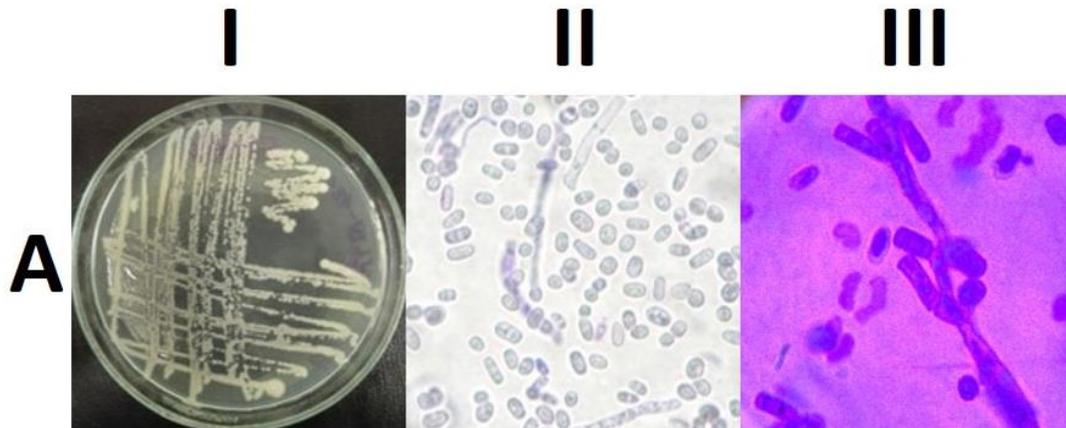


Figura 25. Morfología en placa (AI) y observación de tinción simple al microscopio de luz con objetivo 40x de DCLIV-11 posible *Aerobasidium pullulans* (AII). En AIII puede observarse la presencia de una pseudohifa.

Estas características como el color de placa y formación de pseudohifas (Figura 25) nos llevan a sugerir se trate de la especie *Aerobasidium pullulans* en correspondencia a lo descrito en la literatura (Barnet *et al.*, 2000 citado por Páramo, 2012; Zalar *et al.*, 2008). Sin embargo, se recomienda el uso de pruebas bioquímicas y/o moleculares para corroborar la identificación de este hongo levaduriforme de gran importancia biotecnológica. Este aislado se conservó en medio Agar Papa Dextrosa a una temperatura de 4° C.

7.2.4. Identificación de hongos fitopatógenos según su tipo de spora

Para la identificación de hongos fitopatógenos es necesario la observación de estructuras somáticas y reproductivas (Urbina, 2011). De acuerdo con (Kikot, 2012) la clasificación morfológica en el género *Fusarium* se basa en las características macro y microscópicas del cultivo. El tipo de micelio aéreo que suele ser abundante, pigmentación y tasa de crecimiento de la colonia son características básicas de identificación. El color que desarrollan depende de la especie y puede ser blanco, crema, rojo, púrpura, etc. Además del tipo de macroconidias (esporas) por su forma de grano de arroz, media luna o de canoa. Por otro lado, según (Carrillo, 2003) la clasificación morfológica del género *Alternaria* se basa en características macroscópicas como el micelio aéreo gris

verdoso con reverso negro parduzco y microscópicas, sus esporas que tienen septos transversales y longitudinales, de color pardo.

Antes de realizar las pruebas de antagonismo se procedió a verificar el género de los fitopatógenos suministrados como *Fusarium* y el aislado de *Alternaria* (véase la sección de métodos), mediante observación de las características en placa y al microscopio de luz y comparación con la literatura (Carrillo, 2003; Arias & Jerez, 2008; Kikot, 2012). Las formas de las esporas observadas se muestran en la Figura 25, así como su morfología en medio Agar Papa Dextrosa (PDA).

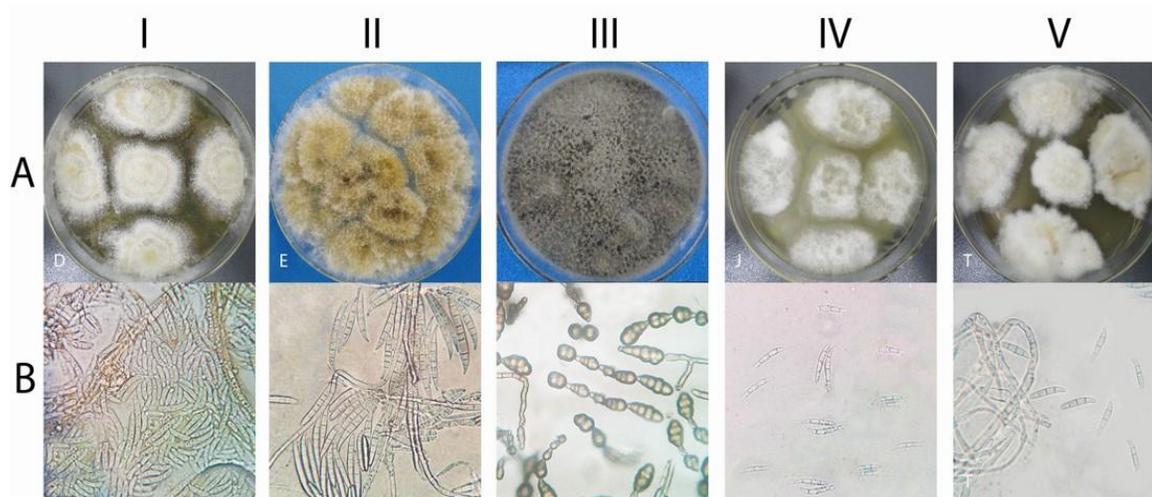


Figura 26. Hongos fitopatógenos a utilizarse en pruebas de antagonismo. En la fila A se muestra la morfología en placa de AI, AIV: *Fusarium* M1-2-1 (D) y M3-1-1 (J) aislados de papa; AII, AV: *Fusarium* F15 (E) y F9 (T) aislados de maní; AIII: *Alternaria* M5-62N (I) aislado de papa. En la fila B, debajo de cada uno sus respectivas esporas.

Las esporas de los fitopatógenos observadas concuerdan con las que se muestran en la literatura consultada, correspondiente a los géneros *Alternaria* la cepa M5-62N (I) y a *Fusarium* las cepas M1-2-1 (D), M3-1-1 (J), F15 (E) y F9 (T). En el caso de *Alternaria* el micelio era de color gris verdoso, tornándose más oscuro al envejecer el cultivo y sus esporas de color pardo con septos transversales, estas características se pueden observar en la Figura 26 AIII y BIII. Mientras que *Fusarium* mostraba micelio abundante blanco, tornándose amarillento o crema en el hongo ya esporulado; sus esporas con forma de media luna o canoa característica que permite diferenciar este género con facilidad como puede observarse en la Figura 26 BI, BII, BIV y BV.

Los géneros de los hongos fitopatógenos identificados morfológicamente concordaron con los referidos en la información de suministro (véase la sección de métodos): 4 *Fusarium* y 1 *Alternaria*. Estas cepas se conservaron en medio de cultivo PDA a 4° C para su posterior utilización en las pruebas de antagonismo e identificación vía molecular, la que nos permitiría conocerlas a nivel de especie.

7.3. Identificación molecular de los microorganismos seleccionados

Se seleccionaron 20 microorganismos para ser identificados molecularmente: 15 bacterias y 5 hongos fitopatógenos que se habían identificado según su tipo de spora y que se utilizarían en las pruebas de antagonismo. Dentro de las 15 bacterias seleccionadas: 12 pertenecían a las aisladas de los bioinsumos: 9 bacilos Gram positivos que podrían tratarse de *Bacillus subtilis*, 2 bacilos Gram negativos y 1 coco Gram positivo seleccionados para conocer la diversidad de géneros y especies que convivían en estos bioinsumos; las 3 bacterias restantes seleccionadas fueron suministradas por el Dr. Omar Navarro del Laboratorio de Microbiología, de la Facultad de Ciencia Animal de la Universidad Nacional Agraria (UNA); estas habían sido aisladas de ciego de pollo (intestino) e identificadas a través de pruebas bioquímicas dentro del género *Bacillus* y que nos servirían como controles positivos. En esta selección de bacterias también se tomó en cuenta el potencial inhibitorio mostrado por estas en el screen grueso (se explica más adelante en el tema de pruebas de antagonismo) que se estaba realizando simultáneamente.

Los resultados del análisis de las secuencias alineadas y corregidas del gen ADNr 16S para bacterias y de la región ITS1 para hongos permitió obtener los árboles filogenéticos que se muestran en las Figuras 27 y 28, respectivamente. El árbol consenso de bacterias y hongos identificados se muestra en el Anexo 1 (página i) donde puede observarse la separación entre los procariotas y los eucariotas.

7.3.1. Identificación molecular de bacterias

El gen ribosomal 16S es frecuentemente empleado para estudios filogenéticos debido a que es una secuencia altamente conservada entre las diferentes especies de bacterias; el gen se encuentra ubicado en la subunidad pequeña del ribosoma (30S), asociado a esto, el gen ribosomal 16S es una región hiper variable lo que prevé especificidad de especie, lo que resulta muy útil para la identificación de especies bacterianas (Castillo-Reyes *et al.*, 2015). Badía *et al.*, (2011) identificaron mediante secuenciación del gen ADNr 16S bacterias aisladas de la rizósfera del cultivo del arroz obteniendo dos cepas de *Bacillus subtilis*, una de *B. cereus* y una de *Bacillus sp.* En otra investigación Castillo-Reyes *et al.*, (2015) identificaron bacterias aisladas de la rizosfera de plantas del desierto con efecto antagonico frente a *Rhizoctonia solani*, usando el gen 16s ribosomal obteniendo 7 cepas identificadas a nivel de especie, 5 de ellas como *Bacillus subtilis*, *B. atrophaeus* y *B. pumilus*.

De los 15 aislados de bacterias seleccionados, 10 se lograron identificar a nivel de especie: LS5-11 (B) como *Bacillus megaterium*, DCL4-31 (F) y LS6-11 (G) *Bacillus subtilis*, DCL2-411 (H) *Bacillus flexus*, DCL12-21 (L) *Agrobacterium tumefaciens*, LL8-111 (M) *Staphylococcus succinus*, TS13-1111 (N) *Bacillus pumilus*, X5-9E2 (O), X2-10(2)2 (R) y X5-9CD2 (S) como *Bacillus cereus*; 4 a nivel de género: DCL1-2 (A) como *Lysinibacillus sp.*, TS11-3 (B), LS6-211 (P) *Bacillus sp.* y DCL12-11 (Q) *Rhizobium sp.* (Cuadro 3). Una de las bacterias no se logró secuenciar debido a que presentó contaminación al momento de la extracción de ADN. Los resultados obtenidos con las secuencias analizadas fueron utilizados para elaborar el árbol filogenético que se presenta en la Figura 27. Las secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA, se muestran en el Anexo 2. (págs.ii-vii).

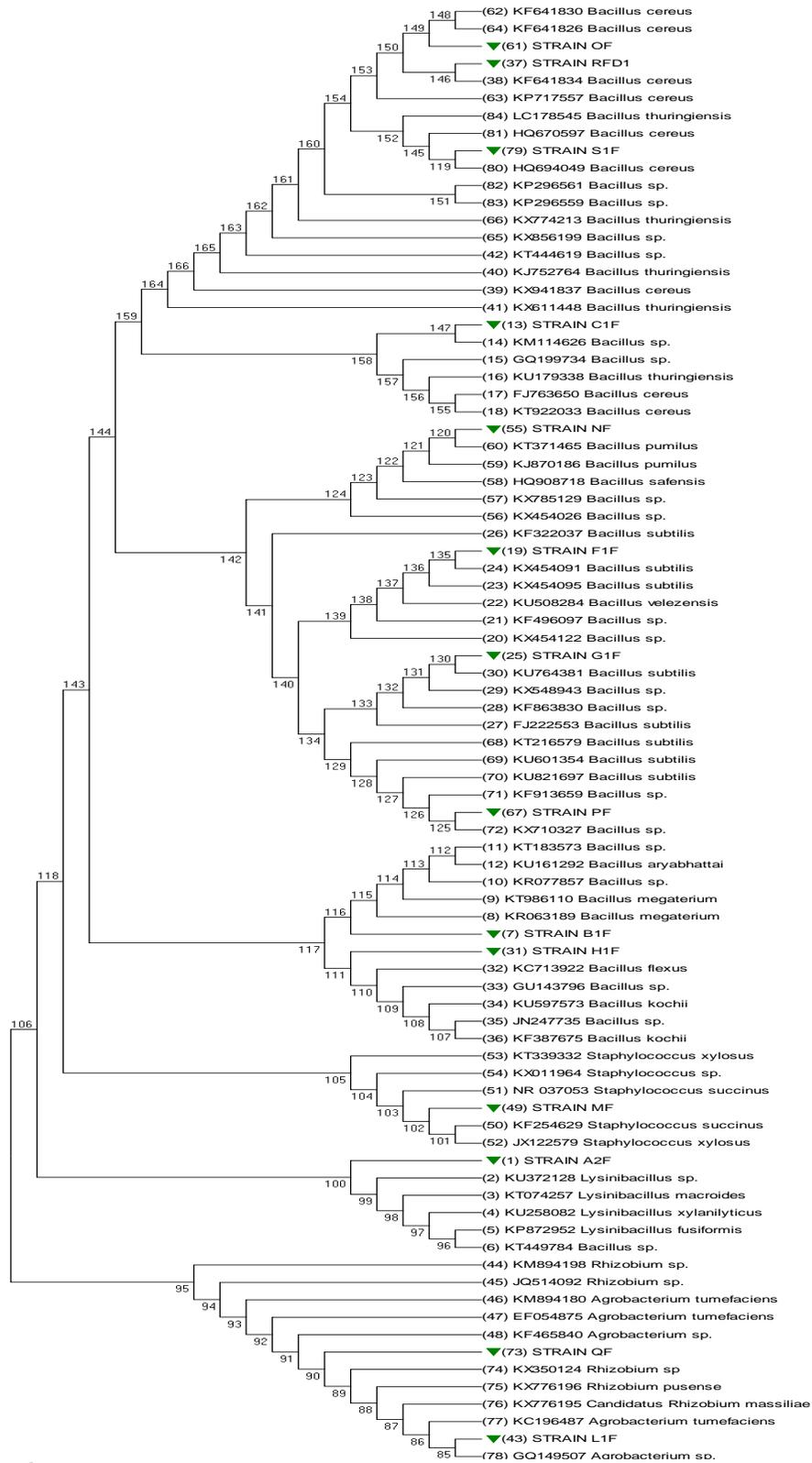


Figura 27. Árbol filogenético de aislados bacterianos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 7.0.14, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.

Cuadro 3. Identificación de bacterias mediante secuenciación genética. En el cuadro se muestra el código de la secuencia y el código del microorganismo, además de la muestra de donde se aisló, puntuación e identidad máxima con el vecino cercano y la identidad final de la bacteria.

Bacterias						
Código secuencia	Código microorganismo	Muestra	Vecino cercano (Número acceso)	Máx punt.	Ident. máx. (%)	Identidad final
A	DCL1-2	Bioinsumos	<i>Lysinibacillus sp.</i> (KU372128)	1358	100	<i>Lysinibacillus sp.</i>
B	LS5-11	Bioinsumos	<i>Bacillus megaterium</i> (KR063189)	1105	99	<i>Bacillus megaterium</i>
C	TS11-3	Bioinsumos	<i>Bacillus sp.</i> (KM114626)	1478	99	<i>Bacillus sp.</i>
F	DCL4-31	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i> (KX454091)	1022	99	<i>Bacillus subtilis</i>
G	LS6-11	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i> (KU764381)	1057	99	<i>Bacillus subtilis</i>
H	DCL2-411	Bioinsumos	<i>Bacillus flexus</i> (KC713922)	1114	100	<i>Bacillus flexus</i>
L	DCL12-21	Bioinsumos	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (KM894180)	2490	99	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
M	LL8-111	Bioinsumos	<i>Staphylococcus succinus</i> (KF254629)	2601	100	<i>Staphylococcus succinus</i>
N	TS13-1111	Bioinsumos	<i>Bacillus pumilus</i> (KT371465)	2362	98	<i>Bacillus pumilus</i>
O	X5-9E2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i> (KF641830)	1083	99	<i>Bacillus cereus</i>
P	LS6-211	Bioinsumos	<i>Bacillus sp.</i> (KX710327)	1014	99	<i>Bacillus sp.</i>
Q	DCL12-11	Bioinsumos	<i>Rhizobium sp.</i> (KX350124)	1051	100	<i>Rhizobium sp.</i>
R	X2-10(2)2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i> (KF641834)	1555	98	<i>Bacillus cereus</i>
S	X5-9CD2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i> (HQ694049)	1194	98	<i>Bacillus cereus</i>

El Cuadro 3 resume los resultados obtenidos en el análisis de las secuencias y la identificación final de las bacterias. Este se obtuvo a partir del análisis del árbol filogenético de la Figura 27 obtenido en el programa MEGA 7.0.14 utilizando el método Neighbor-Joining y la información de las secuencias del GenBank que presentaban mayor homología. En él se enlistan las especies identificadas, citadas anteriormente, de 11 bacterias aisladas de las muestras de bioinsumos y 3 de ciego de pollo (intestino). Cada especie bacteriana (cepa) confirma su

identidad en su mayoría en 99% con las secuencias contenidas en el Genbank. El max score se refiere a la puntuación de alineación más alta o cantidad de bases (Adenina, Citosina, Timina y Guanina) de la secuencia consulta que coinciden en la misma posición con las bases de las secuencias contenidas en el GenBank. Esto va a depender del largo de la secuencia obtenido.

De un total de 14 bacterias identificadas vía molecular, 10 pertenecen al género *Bacillus*, y de ellas 2 cepas corresponden a *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G). El género *Bacillus* es un grupo heterogéneo y puede ser re-clasificado en varios grupos en base a características bioquímicas, metabólicas, y en homología fenotípica y genotípica de secuencias de ADNr 16S (Castillo-Reyes *et al.*, 2015). Esto concuerda con lo que refiere Raghavendra (2005), que las especies de este género son microorganismos ampliamente distribuidos en el ambiente que suelen encontrarse en el suelo, agua dulce y salada, materia vegetal en descomposición, desiertos y la Antártida. Así mismo, *B. subtilis* se ha aislado en alimentos, incluidas las especias, cacao, legumbres, semillas, y pan. Se encuentra principalmente en suelos agrícolas, raíces de las plantas y en el tracto gastrointestinal de los animales. En diferentes aislamientos se ha evidenciado la presencia de cepas con actividad biocontroladora sobre patógenos de plantas, además poseen un alto poder de adaptación a diversos ambientes mediante la formación de endosporas; estructuras resistentes a la falta de nutrientes y situaciones adversas.

Aparte de *B. subtilis*, que era la especie que se pretendía encontrar por su potencial en el control biológico, se encontraron otras del género *Bacillus* como *B. megaterium* reportado con capacidad de solubilizar fosfatos (Tejera *et al.*, 2011), *B. flexus* usado en tratamiento de aguas residuales alcalinas (Wang & Zhao, 2013), *B. pumilus* conocido por su capacidad de producir fitohormonas (Pérez, 2012) y *B. cereus* reportado como antagonista de *Phytophthora megasperma* por Handelsman *et al.* (1990) pero también como patógeno humano. Además, se encontraron otros géneros: *Lysinibacillus*, *Agrobacterium*, *Staphylococcus* y *Rhizobium*. Este último de gran importancia en la agricultura,

conocido por los nódulos que forma en simbiosis con plantas para la fijación del nitrógeno.

De manera general el proceso de identificación permitió obtener una amplia gama de especies que van desde *Bacillus subtilis* y *Rhizobium sp.* que poseen potencial en la agricultura, hasta géneros y especies con potencial biotecnológico en otras áreas como *Bacillus megaterium*, *Bacillus flexus*, *Agrobacterium tumefaciens*.

7.3.2. Identificación molecular de hongos fitopatógenos

La identificación preliminar de fitopatógenos basada en estudios taxonómicos de los hongos y su patología sobre el hospedero (Aoki *et al.*, 2005), requiere tiempo y experiencia considerables, sin embargo, los métodos moleculares como PCR agilizan la identificación analizando regiones específicas dentro de genes. Las secuencias de espaciadores transcritos internos (ITS) es una de las más utilizadas en la identificación, como código de barras estándar para hongos (Fernández-Orduño *et al.*, 2010) citado por (Lafuente-Rincón *et al.*, 2016). Vásquez-López *et al.*, (2012) aislaron e identificaron molecularmente los agentes patógenos que causaban necrosis de flores, pudrición y caída de frutos del papayo en Guerrero, México obteniendo a *Fusarium equiseti*, *F. chlamydosporum*, *Cladosporium cladosporioides* y *Alternaria alternata* como los causantes.

Los hongos fitopatógenos identificados según su tipo de espora: *Alternaria* la cepa M5-62N (I) y como *Fusarium* las cepas M1-2-1 (D), M3-1-1 (J), F15 (E) y F9 (T) se enviaron a secuenciar para identificarlos a nivel de especie. En Nicaragua de acuerdo a la IV versión de la Lista de Plagas reportadas publicada por el Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA) en 2016, estos géneros afectan a la mayoría de los cultivos de interés (maíz, frijol, sorgo, soya, arroz, café, cacao, caña de azúcar, cítricos, melón, sandía, plátano, entre otros) causando pudrición o marchitez vascular en el caso de *Fusarium* y manchas foliares en el caso de *Alternaria*.

Para verificar los resultados de la identificación morfológica de acuerdo al tipo de espora de los hongos fitopatógenos, se identificaron molecularmente a través de la secuenciación de la región ITS1 (Internal Transcribed Space) del ADNr. De los resultados del análisis de las secuencias se obtuvo el siguiente árbol filogenético.

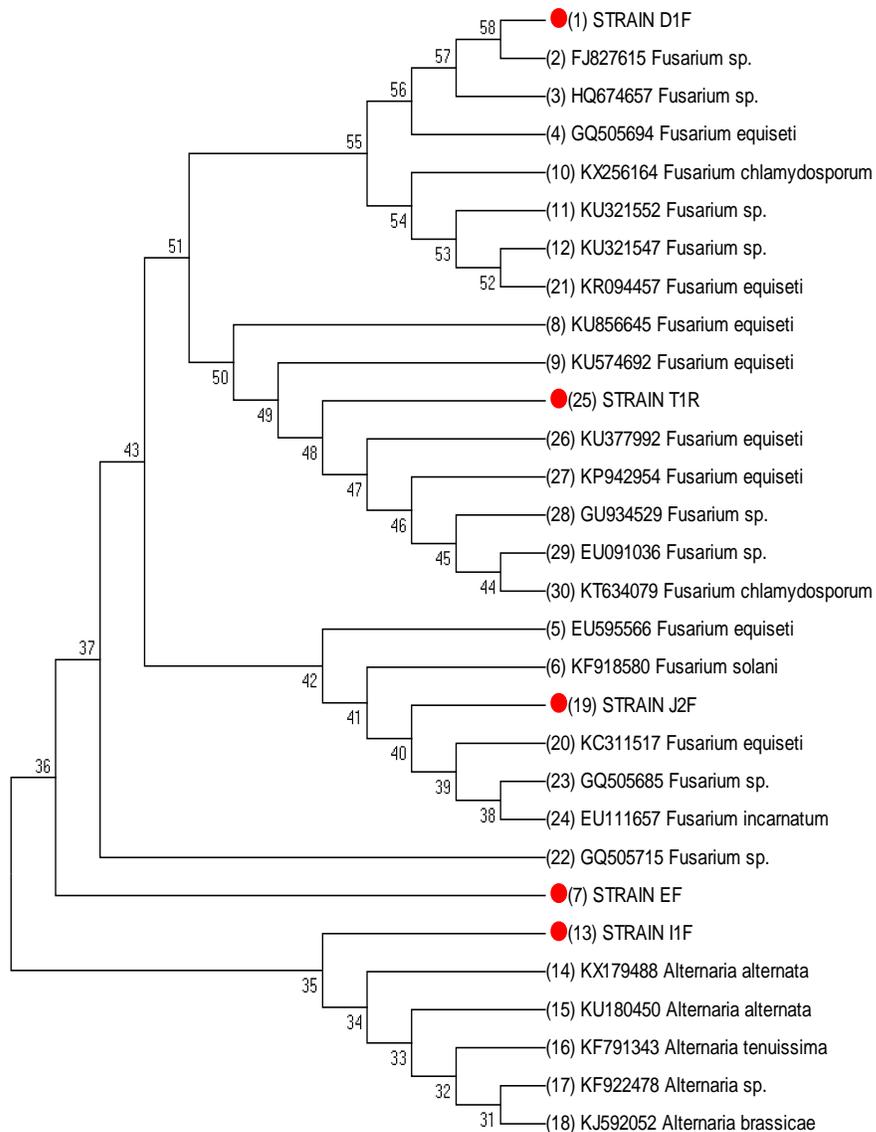


Figura 28. Árbol filogenético de hongos fitopatógenos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 7.0.14, el código de acceso al Gen Bank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.

El siguiente cuadro resume los resultados obtenidos en el análisis de las secuencias por medio del árbol filogenético de la Figura 28 y la identificación de los hongos fitopatógenos.

Cuadro 4. Identificación vía molecular de hongos fitopatógenos. El cuadro muestra el código de la secuencia y el código del microorganismo, el cultivo a partir del cual se aisló, departamento de procedencia, puntuación e identidad máxima con el vecino más cercano y la identidad final del hongo.

Hongos fitopatógenos							
Código secuencia	Código microorganismo	Cultivo	Procedencia	Vecino cercano (Número acceso)	Máx. punt.	Ident. Máx. (%)	Identidad final
D	M1-2-1	Papa	Jinotega	<i>Fusarium sp.</i> (FJ827615)	974	99	<i>Fusarium sp.</i>
E	F15	Maní	León	<i>Fusarium sp.</i> (KU377496)	900	99	<i>Fusarium sp.</i>
I	M5-62N	Papa	Jinotega	<i>Alternaria alternata</i> (KX179488)	837	99	<i>Alternaria alternata</i>
J	M3-1-1	Papa	Jinotega	<i>Fusarium equiseti</i> (KC311517)	1956	99	<i>Fusarium equiseti</i>
T	F9	Maní	León	<i>Fusarium equiseti</i> (KU377992)	876	100	<i>Fusarium equiseti</i>

Los géneros *Alternaria* y *Fusarium* que se sugirieron a través de la observación de esporas concuerdan con los obtenidos en la identificación vía molecular con porcentajes de identidad entre el 99 y 100% con secuencias contenidas en el GenBank. Del total de 5 hongos fitopatógenos identificados vía molecular, 3 lograron ser identificados a nivel de especie M5-62N (I) como *Alternaria alternata*, M3-1-1 (J) y F9 (T) como *Fusarium equiseti*. Las cepas M1-2-1 (D) y F15 (E) se identificaron como *Fusarium sp.* Esto se debe a que *Fusarium* es un género fúngico amplio y diverso de diferentes complejos de especies y su taxonomía ha sido por mucho tiempo una tarea compleja. Esto es debido principalmente a la aplicación de diferentes sistemas taxonómicos, la gran diversidad de especies y la inherente variabilidad morfológica de algunas de estas (Acevedo, 2013).

La especie *Alternaria alternata* ha sido aislada, identificada mediante análisis molecular y reportada como causante de tizones foliares de hojas de plantas de Avena (*Avena sativa L*) en México, (García-León *et al.*, 2013); Vásquez-López *et*

al., (2012) la reportaron como agente patógeno que causa necrosis de flores y pudrición y caída de frutos del papayo (*Carica papaya L.*), en este mismo país. Mientras que en Nicaragua ha sido reportada afectando los cultivos de algodón, frijol, sorgo y soya (IPSA, 2016). Por otro lado, la especie *Fusarium equiseti* ha sido reportada como fitopatógeno en México donde se aisló de flores y frutos del papayo, identificándose morfológicamente y molecularmente (Vásquez-López *et al.*, 2012). En Nicaragua esta especie se reportó como hongo patogénico que reduce la germinación y provoca pudriciones de raíces, tallos y semillas en el documento de Catálogo de hongos en semillas de frijol (*Phaseolus vulgaris L.*) en Nicaragua (2013), donde se muestra que se aisló un grupo de hongos que mostraron 99-100% de identidad a un complejo de especies de *Fusarium spp* (dentro de estas *F. chlamydosporum*, *equiseti* e *incarnatum*). *F. chlamydosporum* (Woollwv), *F. equiseti* (Corda) Sacc. Sensu Gordon and *F. incarnatum* (R.) Sacc.

Las especies *Alternaria alternata* y *Fusarium equiseti* han sido reportadas como fitopatógenos en Nicaragua en la Lista de Plagas reportadas publicada por el IPSA en el 2016, pero no afectando los cultivos de maní (*Arachis hypogaea*) y papa (*Solanum tuberosum*) de donde estas cepas fueron aisladas. Esto podría deberse a reducido uso de técnicas moleculares para la identificación de fitopatógenos en nuestro país, y a la dificultad de identificar morfológicamente (que es la forma de identificación comúnmente usada) a nivel de especie estos géneros.

De manera general se lograron identificar las especies *F. equiseti* y *A. alternata*, la primera afectando los cultivos de papa y maní, mientras que la segunda afectando cultivos de papa. Dos de los aislados se identificaron como *Fusarium sp.* lo que pone en evidencia la gran diversidad de especies de este género, por lo cual se recomienda el uso de otras regiones de ITS para una completa identificación.

7.4. Pruebas de antagonismo

Para identificar las bacterias con potencial antagónico se realizó una preselección (screen grueso) contra 3 de los fitopatógenos M1-2-1 (D), F15 (E) y M5-62N (I) donde se seleccionaron 6 bacterias como antagonistas. Posteriormente se evaluó el efecto antagónico mediante la técnica de confrontación dual que es extensamente usada como una de las pruebas preliminares in vitro para seleccionar agentes de control biológico (Hoyos *et al.*, 2008; Calvo-Araya *et al.*, 2012).

7.4.1. Preselección de cepas antagonistas (screen grueso)

Castillo-Reyes *et al.*, (2015) realizaron una preselección de bacterias antagonistas de *Rhizoctonia solani* seleccionando 14 de 80 cepas aisladas. En la caracterización morfológica, todas las cepas presentaron forma de bacilo, tinción de Gram positiva y formación de endospora en la parte central.

Según lo descrito anteriormente en el acápite de métodos, se realizó una preselección o screen grueso para evaluar la mayor cantidad de aislados en el menor tiempo posible y con el menor costo en materiales. Al décimo día de montado el experimento se seleccionaron como cepas con posible efecto inhibitorio, aquellas que presentaron una manifestación diferente en el crecimiento micelial del patógeno con respecto al testigo, como describen Sosa, *et al.* (2005). En los casos de los hongos *Alternaria alternata* M5-62N (I) y *Fusarium sp.* F15 (E), cumplido este tiempo el testigo había cubierto la placa completa, no siendo así en *Fusarium sp.* M1-2-1 (D) que presentó un crecimiento mas lento.

De un total de 26 bacterias evaluadas en la preselección (23 aisladas de bioinsumos y 3 de ciego de pollo que sirvieron como controles positivos del género *Bacillus*) se seleccionaron 6 cepas con posible efecto inhibitorio frente al menos alguno de los 3 fitopatógenos evaluados: *Alternaria alternata* (I), *Fusarium sp.* (D) aislado de papa y *Fusarium sp.* (E) aislado de maní. En el Cuadro 5 se

muestran las 6 cepas antagonistas seleccionadas y su efecto frente a los fitopatógenos.

Cuadro 5. Resultados de las cepas seleccionadas en el screen grueso. En el cuadro se muestra el código de la secuencia y código de aislamiento de las bacterias, así como el tipo de muestra de donde se aisló su identificación final.

Código secuencia	Bacterias			Fitopatógenos		
	Código aislamiento	Tipo Muestra	Identificación final	<i>Alternaria alternata</i> M5-62N (I)	<i>Fusarium</i> sp. M1-2-1 (D)	<i>Fusarium</i> sp. F9 (E)
F	DCL4-31	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+
G	LS6-11	Bioinsumos	<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+
P	LS6-211	Bioinsumos	<i>Bacillus</i> sp.	+	+	+
Q	DCL12-11	Bioinsumos	<i>Rhizobium</i> sp.	-	+	-
R	X2-10(2)2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-
S	X5-9CD2	Ciego de pollo	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-

+ Se observó grado de inhibición;

- No se observó ningún grado de inhibición.

En el Cuadro 5, se muestra el producto de donde se aislaron las diferentes cepas antagonistas y el efecto de cada uno de ellos sobre los fitopatógenos mencionados. Los mejores resultados en este experimento preliminar los obtuvieron las cepas que posteriormente fueron identificadas por vía molecular como *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G) que presentaron los mayores grados de inhibición respecto a las otras cepas seleccionadas como puede observarse en la Figura 29 AI-AIII y BI-BIII. No obstante, las cepas *Bacillus* sp. LS6-211 (P), *Rhizobium* sp. DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y X5-9CD2 (S) también inhibieron en algún grado a alguno de los fitopatógenos. Posteriormente, se procedió a evaluar el efecto antagónico de las 6 cepas seleccionadas.

A diferencia de lo reportado por Castillo-Reyes *et al.*, (2015) de las cepas seleccionadas en este estudio solamente 5 pertenecen al género *Bacillus* que son bacterias Gram positivas (véase Anexo 3: Imagen 3-5, 7-8, págs.ix y x), la sexta cepa antagonista corresponde a *Rhizobium* sp, bacteria Gram negativa (véase Anexo 3: Imagen 6, pág. x). Esta bacteria ha sido reportada como promotora del crecimiento de las plantas y la productividad (efecto primario), pero

ahora también muestra un efecto en la reducción de algunas enfermedades (efecto secundario) (Yasir *et al.*, 2009; Akhtar & Siddiqui, 2008; Guo *et al.*, 2004;)

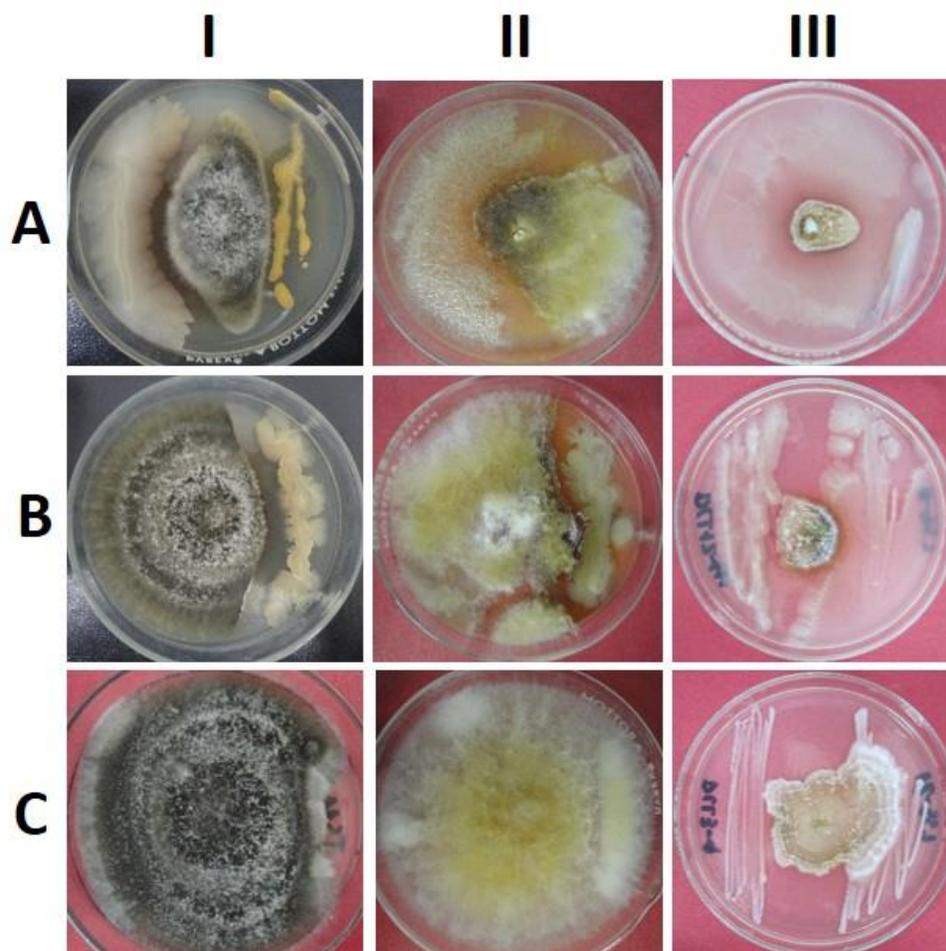


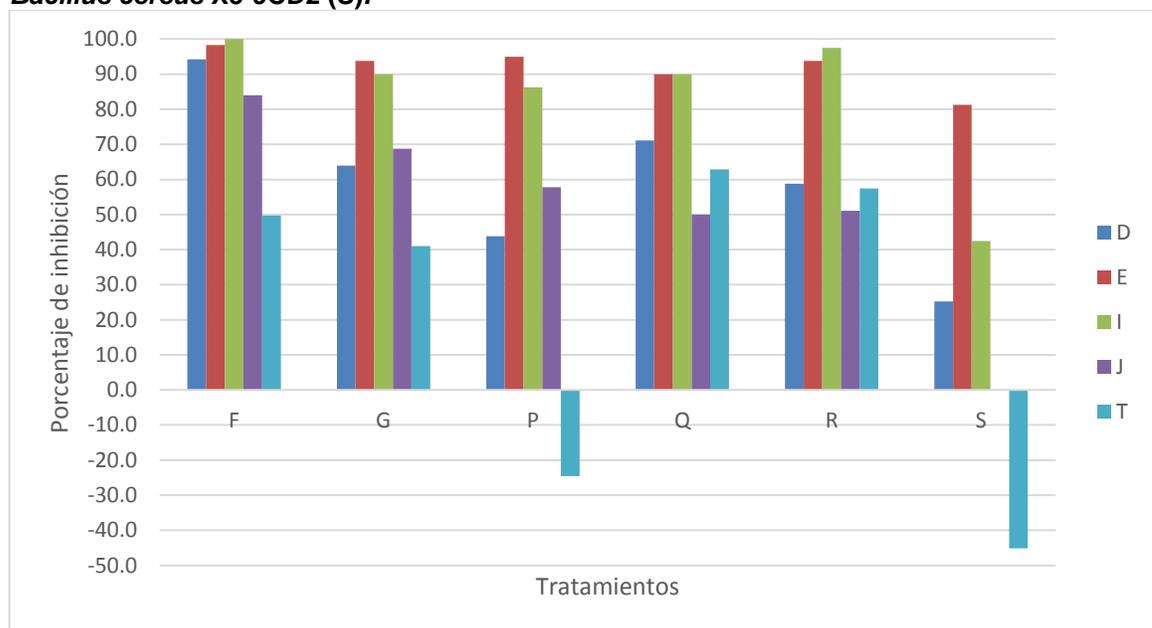
Figura 29. Muestra de la preselección de bacterias con efecto antagónico. AI-AIII: A la izquierda de la placa Petri *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) frente a los fitopatógenos *Alternaria alternata* M5-62N (I), *Fusarium sp.* F15 (E) y *Fusarium sp.* M1-2-1 (D); BI-BIII: A la derecha de la placa *Bacillus subtilis* LS6-11 (G) frente a hongos fitopatógenos; CI-CIII: Aislados que no mostraron ningún grado de inhibición, el hongo pasó por encima de ellos.

7.4.2. Evaluación del efecto antagónico

Badía, *et al.*, (2011) evaluaron el efecto antagónico aislados de *Bacillus* frente a *A. alternata*, *Fusarium sp.*, *Pyricularia grisea* y *Curvularia sp.*, obteniendo 13 cepas con potencialidades en el control biológico de hongos fitopatógenos. De manera general, los mejores resultados correspondieron a 2 aislados identificados como *Bacillus subtilis* y 1 como *Bacillus sp.* los cuales inhibieron el crecimiento de los cuatro hongos en mayores porcentajes que se encontraban entre el 85 y el 92%.

Se evaluó el efecto antagónico de las 6 cepas seleccionadas en el screen grueso: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), *Bacillus sp.* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S), frente a los 5 fitopatógenos *Fusarium sp.* M1-2-1 (D), (véase Anexo 3: Imagen 9, pág. xi); *Fusarium sp.* F15 (E), (véase Anexo 3: Imagen 10, pág. xi); *Alternaria alternata* M5-62N (I), (véase Anexo 3: Imagen 11, pág. xii); *Fusarium equiseti* M3-1-1 (J), (véase Anexo 3: Imagen 12, pág. xii); *Fusarium equiseti* F9 (T), (véase Anexo 3: Imagen 13, pág. xiii). Cada cepa bacteriana evaluada correspondía a un tratamiento (*Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) vs Fitopatógeno, *Bacillus subtilis* LS6-11 (G) vs Fitopatógeno, *Bacillus sp.* LS6-211 (P) vs Fitopatógeno, *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q) vs Fitopatógeno, *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) vs Fitopatógeno y *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) vs Fitopatógeno), teniendo en total 6 tratamientos más un testigo (hongo fitopatógenos sin presencia de bacterias) (Figura 30 BIII), y 5 experimentos que correspondían a cada uno de los fitopatógenos confrontados mencionados anteriormente. Mediante la aplicación de este método se obtuvo que las 6 cepas de bacterias evaluadas presentaron diferentes capacidades para inhibir a distintos fitopatógenos y en algunos casos no se observó efecto inhibitorio. Los resultados del porcentaje de inhibición frente a los patógenos y la tasa de crecimiento micelial de estos se hicieron en base al promedio de las tres repeticiones por tratamiento, estos resultados se muestran en el Gráfico 1 y el Cuadro 6.

Gráfico 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos: *Fusarium sp.* M 1-2-1 (D), *Fusarium sp.* F15 (E), *Alternaria alternata* M5-62N (I), *Fusarium equiseti* M 3-1-1 (J) y *Fusarium equiseti* F9 (T), frente a las Bacterias previamente seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), *Bacillus sp* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S).



Cuadro 6. Tasa de crecimiento de fitopatógenos: *Fusarium sp.* M 1-2-1 (D), *Fusarium sp.* F15 (E), *Alternaria alternata* M5-62N (I), *Fusarium equiseti* M 3-1-1 (J) y *Fusarium equiseti* F9 (T), en presencia de bacterias seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), *Bacillus sp* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S). En la parte inferior del cuadro se muestra el crecimiento de los testigos (sin presencia de bacterias).

Bacterias	Tasa de crecimiento de fitopatógenos (cm/día)				
	D	E	I	J	T
F	0.02	0.01	0.00	0.05	0.10
G	0.13	0.03	0.04	0.10	0.12
P	0.13	0.02	0.06	0.14	0.24
Q	0.09	0.04	0.04	0.16	0.07
R	0.11	0.03	0.01	0.16	0.08
S	0.20	0.08	0.24	0.33	0.28
Tasa de crecimiento de los fitopatógenos sin presencia de bacterias (Testigo)					
	Día 13	Día 10	Día 10	Día 13	Día 14
Testigo	0.33	0.43	0.43	0.33	0.19

Al analizar los resultados mostrados en el Gráfico 1 (en el Anexo 4, pág xiv, se muestra la tabla completa con los resultados obtenidos frente a las distintas cepas) se puede observar que en el caso de *Fusarium sp.* M1-2-1 (D) aislado de papa, el mejor efecto antagónico lo ejerce el aislado *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) con 94,23% de inhibición del crecimiento pero de manera general se obtuvo un valor promedio de 59.5% (Figura 30 AI); para el hongo *Fusarium sp.* F15 (E) aislado de maní, se obtuvo un porcentaje de inhibición promedio de 92%, destacándose los que se verifican en los aislados *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) y *Bacillus sp.* LS6-211 (P) con 98.33 y 95.00% respectivamente (Figura 30 AII); *Alternaria alternata* M5-62N (I) fue inhibido totalmente por *Bacillus subtilis* cepa F (100,00%), y un promedio de 84% por parte de los 6 aislados (Figura 30 AIII); *Fusarium equiseti* M3-1-1 (J) aislado de papa, fue inhibido en promedio en un 51.9 %, destacándose *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) con 83.96% (Figura 30 BI); finalmente en el caso de *Fusarium equiseti* F9 (T) aislado de maní, la mejor inhibición la ejerció Q (*Rhizobium sp.*) con un porcentaje 62.90%, obteniéndose promedio de 23.5% de inhibición en las 6 bacterias (Figura 30 BII).

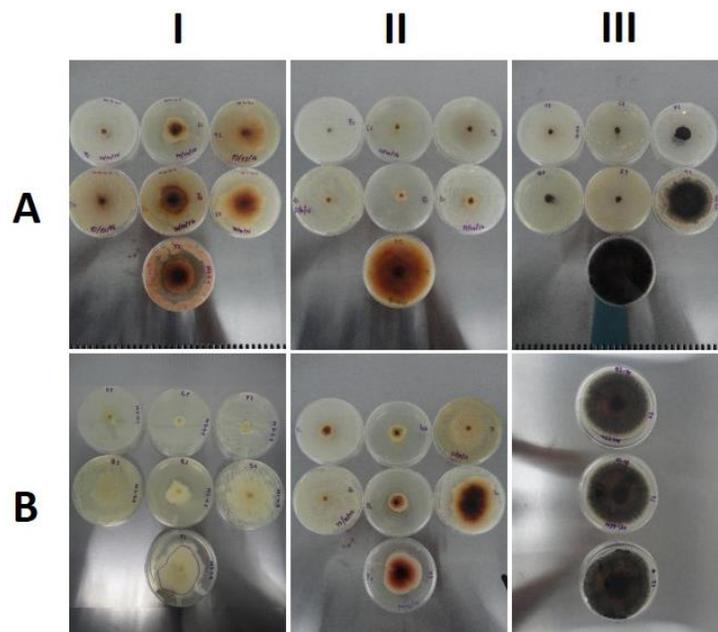


Figura 30. Efecto antagónico in vitro de *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), *Bacillus sp* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) frente a AI: *Fusarium sp.* M 1-2-1 (D); AII: *Fusarium sp.* F15 (E); AIII: *Alternaria alternata* M5-62N (I). Abajo en cada fotografía testigo sin presencia de bacterias. BI: *Fusarium equiseti* M 3-1-1 (J); BII: *Fusarium equiseti* F9 (T). En BIII se observa las tres repeticiones del tratamiento testigo de *A. alternata* M5-62N (I).

De manera general, los mejores resultados corresponden al aislado DCL4-31 (F) identificado como *Bacillus subtilis*, como puede observarse en la Figura 31, el cual inhibe el crecimiento de cuatro de los hongos en mayores porcentajes, los cuales se encuentran entre el 83 y el 100%. A pesar de que la cepa LS6-11 (G) también se identificó como *B. subtilis*, no obtuvo los mismos resultados. Esto concuerda con lo que refiere Choi *et al.*, (1999): que cepas de una misma especie, pueden exhibir diferentes capacidades para producir toxinas e inhibir el crecimiento de diferentes microorganismos.

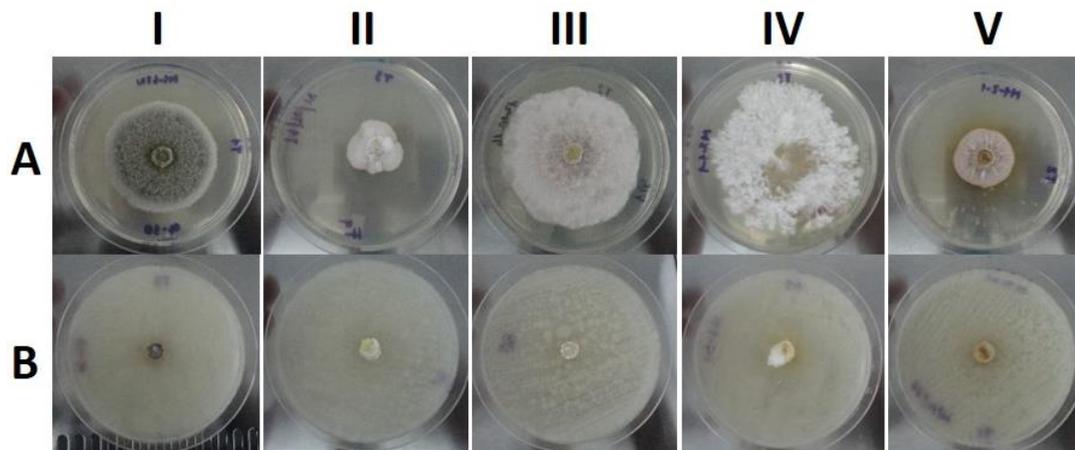


Figura 31. Efecto antagónico de la cepa DCL4-31 F identificada como *B. subtilis* frente a los diferentes fitopatógenos. En la fila A, de AI-AV tratamientos testigos de los fitopatógenos; en la fila B, de BI-BV tratamientos de F contra fitopatógenos. De izquierda a derecha de I a V: A. *alternata* M5-62N (I), *Fusarium equiseti* F9 (T), ambos con 6 días de crecimiento; *Fusarium sp.* F15 (E) con 7 días; *Fusarium equiseti* M3-1-1 (J) y *Fusarium sp.* M1-2-1 (D) con 9 días.

Las cepas LS6-211 P y X5-9CD2 S, *Bacillus sp.* y *Bacillus cereus* respectivamente, frente al fitopatógeno T (*Fusarium equiseti*) obtuvieron porcentajes negativos de inhibición -24.52 y -45.16%, debido a que el hongo creció más rápido en presencia de estas bacterias en comparación a su crecimiento como testigo. Esto se puede evidenciar con el aumento de la tasa de crecimiento presentado en el Cuadro 7, de 0.24 y 0.28 cm/día, siendo mayor que en el testigo que crecía 0.19 cm/día.

El efecto protector de los miembros del género *Bacillus* utilizados en el control de enfermedades fúngicas, puede deberse a la presencia de diferentes mecanismos para antagonizar de forma directa el crecimiento de patógenos (Zahir *et al.*,

2004). Varios autores han informado la actividad antagónica del género *Bacillus* contra diferentes hongos fitopatógenos (BERG *et al.*, 2005, WU *et al.*, 2005), lo que se atribuye a la producción de antibióticos (ZHAO *et al.*, 2008) como bacilomicina, fungimicina, micosubtilina y zwittermicina, compuestos que han demostrado ser efectivos en suprimir el crecimiento de patógenos *in vitro* o *in situ* (Pal & Gardener, 2006; Cazorla & Romero, 2007); enzimas (IDRISS *et al.*, 2002). Además pueden atacar por competencia por nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y inducción de resistencia (Strobel & Rodríguez, 2005; Chatterjee *et al.*, 2007; Carreras *et al.*, 2008), disminuyendo el efecto dañino de los fitopatógenos. Este efecto inhibitor de las especies de *Bacillus* sobre hongos que causan enfermedades en las plantas puede estar asociado a la producción de enzimas que actúan en la degradación de la pared celular como las quitinasas (Aktuganov *et al.*, 2007; Rodas *et al.*, 2009).

B. subtilis es de los microorganismos más estudiados y reportado como promotor de crecimiento y antagónico a una gran variedad de fitopatógenos como *Phytophthora cactorum*, *Sclerotium cepivorum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Alternaria carthami*, *Phytophthora capsici*, *Fusarium solani*, entre otros, en distintos cultivos y evaluados *in vitro*, en invernadero y campo (Chowdhury, 1997; Yuen *et al.*, 1985; Guillen *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos evidencian una vez más lo reportado por Sosa, *et al.* (2005) sobre el elevado potencial que presentan las bacterias del género *Bacillus* para el control biológico en condiciones *in vitro*, ya que está demostrado por numerosos autores que los microorganismos pertenecientes a este género se caracterizan por tener la capacidad de producir sustancias, tales como, metabolitos, antibióticos, enzimas líticas, entre otras que aisladas, purificadas y producidas a gran escala son una valiosa alternativa del control químico, que tanto se ha encarecido a nivel Internacional y del cual existe una tendencia cada vez más generalizada a disminuir su uso, debido precisamente a los daños que ha causado al hombre y al medio ambiente.

Los resultados de estos ensayos indican que es posible considerar que las cepas evaluadas podrían utilizarse como una alternativa en el control biológico de estos hongos fitopatógenos, mediante la aplicación individual o en mezcla de cepas para obtener una mayor eficiencia en el control de estos.

CONCLUSIONES

La realización del presente trabajo y el análisis de los resultados alcanzados, permiten plantear las siguientes conclusiones considerando los objetivos que se propusieron al inicio del mismo:

1. A partir de las muestras tomadas de los cuatro bioinsumos recolectados se logró obtener 30 aislados, entre ellos 23 bacterias, 6 hongos filamentosos y 1 hongo levaduriforme, mediante la utilización tres medios de cultivos enriquecidos (PDA, AN y PCA).
2. Morfológicamente en los aislados bacterianos se identificaron 22 bacilos: 12 Gram positivos que se ubicaron dentro del género *Bacillus sp.*, 7 Gram negativos y 3 Gram variables, además de 1 coco Gram positivo.
3. De los hongos aislados se observaron diferentes características macro (Color y forma en placa) y microscópicas (forma y color de la conidia), sin embargo, estas observaciones solo nos permitieron sugerir el género del aislado LSVI-12 como *Penicillium sp.* El hongo levaduriforme se identificó como un posible *Aerobasidium pullulans* por sus características en placa y al microscopio de luz.
4. Con respecto a los hongos fitopatógenos, se corroboró el género mediante observación de esporas al microscopio de luz obteniéndose: 1 *Alternaria* y 2 *Fusarium* aislados de papa (*Solanum tuberosum*), y 2 *Fusarium* aislados de maní (*Arachis hypogaea*).
5. Mediante técnicas moleculares, se identificaron 14 bacterias (11 aisladas de los bioinsumos y 3 aisladas de ciego de pollo) destacándose el género *Bacillus*. Dentro de estas a nivel de especie se identificaron 2 aislados de *B. subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G), 3 de *B. cereus* X5-9E2 (O), X2-10(2)2 (R) y X5-9CD2 (S); *B. megaterium* LS5-11 (B), *B. flexus* DCL2-411 (H) y *B. pumilus* TS13-1111 (N) cada uno con un aislado. Además, un aislado de *Agrobacterium tumefaciens* DCL12-21 (L) y un *Staphylococcus succinus* LL8-111 (M). A nivel de género se obtuvieron *Lysinibacillus sp.* DCL1-2 (A), *Bacillus sp.* TS11-3 (C) y LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q).

6. De la misma forma se identificaron 5 hongos fitopatógenos, 3 a nivel de especie: *Alternaria alternata* M5-62N (I) y *Fusarium equiseti* M3-1-1 (J) y F9 (T), y 2 a nivel de género: *Fusarium sp.* M1-2-1 (D) y F15 (E).
7. *A. alternata* y *F. equiseti* han sido reportados en nuestro país como patógenos de diferentes cultivos, sin embargo no se han reportado hasta donde se conoce en Nicaragua, afectando al maní y a la papa, cultivos a partir del cual se aislaron los patógenos aquí identificados.
8. Como producto de la preselección (Screen grueso) de cepas bacterianas antagonistas se obtuvo 6 cepas con potencial antagónico de 26 evaluadas, estas fueron identificadas como: *B. subtilis* DCL4-31 (F) y LS6-11 (G), *Bacillus sp.* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *B. cereus* X2-10(2)2 (R) y X5-9CD2 (S).
9. Las pruebas de antagonismo de las cepas bacterianas con potencial frente a los fitopatógenos antes identificados por vía molecular, permiten afirmar que el mejor aislado antagonista de los fitopatógenos fue *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F) con un rango de 50-100% de inhibición (en promedio 85.2%). Los demás aislados presentaron distintas capacidades de inhibir a los fitopatógenos.
10. Hasta donde conocemos *Rhizobium sp* ha sido ampliamente reportado como estimulante cuando se aplica a cultivos de leguminosas (frijol, arveja, garbanzo, lentejas, entre otras), pero este trabajo permite observar que la misma también inhibe en cierta proporción, con un rango entre 50-90% de inhibición (72.8% en promedio) a determinados patógenos (*A. alternata*, *Fusarium sp.* y *F. equiseti*), aspecto que resulta de mucho interés para investigaciones futuras.

RECOMENDACIONES

Al presentar los resultados de esta investigación, se abren nuevas puertas y nuevas interrogantes continúan por resolver, por ello se sugieren considerar las siguientes recomendaciones:

- Identificar molecularmente las cepas de bacterias, hongos filamentosos y levaduriforme aisladas de los bioinsumos que no se secuenciaron en este trabajo, por no ser de interés en la búsqueda de *Bacillus subtilis*, para obtener conclusiones definitivas acerca de las especies y tipos de microorganismos presentes en los bioinsumos actualmente elaborados de manera artesanal en Nicaragua.
- Evaluar en condiciones semi controladas (invernadero) y no controladas (campo abierto) la cepa que presentó los mejores resultados en las pruebas de antagonismo identificada como *Bacillus subtilis* DCL4-31(F), con el fin de corroborar su efecto biocontrolador en cultivos de interés agrícola. Esto debido a que los controladores biológicos deben utilizarse después de su respectiva validación en campo (*in vivo*) aportando a una de las políticas actuales en Nicaragua, que es la búsqueda de soluciones efectivas más inocuas y económicas para sustituir los plaguicidas y agroquímicos.
- Determinar la producción de sustancias promotoras de crecimiento vegetal así como la capacidad de solubilizar fosfatos de los aislados del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. megaterium*, entre otros) ya que estas características han sido reportadas por diversos autores, con el fin aprovechar al máximo sus capacidades.
- Especial interés deberá prestarse a la cepa identificada como *Rhizobium* sp, estudiando su actividad como antagonista de patógenos ya que esto podría incrementar su aplicación no solo desde el punto de vista de la bioestimulación sino debido a su efecto antagónico de patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, Y. (2013). *Taxonomía molecular de aislamientos de Fusarium obtenidos a partir de muestras clínicas*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Colombia.
- Acosta, T., Avellaneda, A., Cuervo, J., & Sánchez, L. (2007). Evaluación de microbiota de tomillo (*thymus Vulgaris*), como aporte al manejo agroecológico de aromáticas en invernaderos de la universidad nacional En: Universidad Nacional de Colombia. *Perspectivas del agronegocio de hierbas aromáticas culinarias y medicinales, Ed. 1*, 135-138.
- Agrios, G. (1995). *Fitopatología* (Segunda ed.). México D.F.: Editorial Limusa. Cap. 9. Pág. 192-195.
- Alejos, L., Aragón, M., & Cornejo, A. (2014). Extracción y purificación de ADN. En A. Cornejo, A. Serrato, B. Rendón, & M. Rocha, *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: Aspectos teóricos y prácticos* (págs. 1-26). México, D.F.
- Álvarez, E. (2015). *Doc slide*. Obtenido de Doc slide: <http://myslide.es/documents/aislamiento-de-microorganismos-del-medio-ambiente.html>
- Amann, R., & Kühn, M. (1998). In situ methods for assessment of microorganisms and their activities. *Current Opinion in Microbiology*, 1, 352-358.
- Aoki, T., O'Donnell, K., & Scandiani, M. (2005). Sudden death syndrome of soybean in South America is caused by four species of *Fusarium*: *Fusarium brasiliense* sp. Nov., *F. cuneirostrum* sp. Nov., *F. tucumaniae*, and *F. virguliforme*. *Mycoscience*(46), 162-183.
- Arias, E., & Piñeros, P. (2008). *Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde*. Trabajo de Grado para optar al título de Microbiólogas Industriales, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Arias, J., & Jeréz, A. (2008). *Elaboración de un atlas para la descripción macroscópicas y microscópica de hongos fitopatógenos de interés en especies de flores de corte cultivadas en la sabana de Bogotá*. Trabajo de Grado para optar al título de Microbiólogas Industriales, Pontificia Universidad Javeriana.

- Ayudantías Unab.* (s.f.). Obtenido de <http://ayudantiasunab.bligoo.cl/microbiologia-tincion-gram>
- Badía, M., Hernández, B., Murrel, J., Mahillon, J., & Pérez, M. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas de bacillus asociadas al cultivo de arroz (*Oryza sativa* L). *Revista Brasileña de Agroecología*, 90 - 99.
- Barnet, J., Payne, R., & Yarrow, D. (2000). *YEAST: Characteristics and identificación* (Third ed.). Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Barquero I., C. S. (2007). *Informe de vigilancia tecnológica. Bioinsumos*. Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (COLCIENCIAS). Bogotá, Colombia: Cargraphics.
- Bashan, Y. H.-C. (1996). Interacciones entre plantas y microorganismos beneficios I. *Azospirillum*. *TERRA*, 14(2), 159-194.
- Baudalf, S. (2003). Phylogeny for the faint of heart: a tutorial. *Trends in Genetics*, 19(6), 345-351.
- Bautista, S. (2006). El control biológico en la reducción de enfermedades postcosecha en productos hortofrutícolas: uso de microorganismos antagónicos. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 8(001).
- Becerra, V., & Paredes, M. (2000). Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agric. Téc. [online]*, 60(3), 270-281. Obtenido de <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072000000300007>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C. S.-N., & Valdezate, S. (2011). Metodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enferm Infec Microbiol Clín*, 29(8), 601-608.
- Bravo, L. (2014). *Microorganismos*. Trabajo de Fin de Master de Profesor de ESO y Bachillerato, Formación Profesional y Enseñanzas de Idiomas, Universidad de Valladolid.
- Cañedo, R., & Arencibia, R. (2004). Bioinformática: en busca de los secretos moleculares de la vida. *ACIMED*, 12(6).
- Carrillo, L. (2003). Alternaria. En *Los Hongos de los Alimentos y forrajes* (págs. 70-86). Universidad Nacional de Salta, Argentina.

- Carrillo, L., & Audisio, M. (2007). Levaduras. En L. Carrillo, & M. Audisio, *Manual de microbiología de los alimentos* (págs. 40-46). UNJU.
- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F., Gallegos-Morales, G., Flores-Olivas, A., Rodríguez-Herrera, R., & Aguilar, C. (15 de Mayo de 2015). Efectividad in vitro de Bacillus y polifenoles de plantas nativas de México sobre Rhizoctonia-Solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 549-562.
- Corrales, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Joya, A., & Márquez, 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 Biomédicas*, 10(17), 64-82.
- Cuervo, J. (2010). *Aislamiento y caracterización de Bacillus spp como fijadores biológicos de nitrógeno y solubilizadores de fosfatos en dos muestras de biofertilizantes comerciales*. Trabajo de Grado para optar al título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- eHow en Español. (s.f.). Obtenido de http://www.ehowenespanol.com/proposito-estriar-placa-agar-info_207916/
- Fernández, O., & Vega, L. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*(62), 96-100.
- Fernández-Ortuño, D., Loza-Reyes, E. A., & Fraaije, B. (2010). The CYP51C gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the Fusarium species complex and a novel target for species-specific PCR. *International Journal of Food Microbiology*(144), 301-309.
- Froni, L. (2005). Los microorganismos: Estructuras y funciones. Introducción a la Microbiología. En *Microbiología: básica, ambiental y agrícola* (págs. 13-15). Montevideo, Uruguay: Departamento de Publicaciones de la Facultad de Agronomía, Universidad de la República Oriental de Uruguay.
- Hernández, D., & Loaiza, S. (2014). *Selección de un método para la conservación y preservación de Actinomicetos aislados del suelo del jardín botánico de la Universidad Tecnológica de Pereira*. Anteproyecto de Trabajo de Grado para optar al título de tecnóloga Química, Universidad Tecnológica de Pereira.

- IICA; MAGFOR; Cooperación Austriaca;. (2009). *Estado de la Agricultura Orgánica en Nicaragua: Propuesta para su Desarrollo y Fomento*. Managua, Nicaragua: IICA, 2009.
- IICA, & MAG. (1992). *Componente de fortalecimiento de la dirección general de protección y sanidad agropecuaria. Sub-componente de sanidad vegetal* (Vol. V). (B. V. IICA, Ed.) Managua, Nicaragua.
- INIA. (s.f.). *INIA Remehue*. Obtenido de <http://manualinia.papachile.cl/?page=manejo&ctn=214>
- IPSA. (2016). *Lista de plagas reportadas en Nicaragua IV versión*. Instituto de Protección y Sanidad Agropecuaria (IPSA), Dirección sanidad vegetal y semillas, Managua.
- Jiménez, D. (2007). *Caracterización molecular de cepas nativas Colombianas de Azotobacter spp. mediante el análisis de restricción del DNA ribosomal 16S*. Trabajo de Grado para optar al título de Microbiólogo Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Kikot, G. (2012). *Caracterización bioquímica, fenotípica y molecular de aislamientos de Fusarium graminearum provenientes de la region pampeana en relación a la patogenicidad*. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas.
- Kim, P., & Chung, K. (2004). Production of an Antifungal protein for control of Colletotrichum lagenarium by Bacillus amyloliquefaciens MET0908. *FEMS Microbiology Letters*(234), 177-183.
- Knaak, N., Rohr, A., & Fiuza, L. (2007). In vitro effect of Bacillus thuringiensis strains and cry proteins in Phitopathogenic fungi of Paddy Rice-Field. *Brazilian Journal of Microbiology*(38), 526-530.
- Kokalis, N., Kloepper, J., & Reddy, M. (2006). Plant growth-promoting rhizobacteria as transplant amendments and their effects on indegenous rhizosphere microorganism. *Applied Soil Ecology*(31), 91-100.
- Lafuente-Rincón, D., Barboza-Corona, J., Salcedo-Hernández, R., Abraham-Juárez, R., J., V.-L. J., Quistián-Martínez, D., & N., D. I.-S. (2016). Identificación molecular de hongos fitopatógenos de fresa por PCR (ITS y EF-1 α) y susceptibilidad a bacteriocinas de Bacillus thuringiensis. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1(1), 417-422.

- Lastres, L., & Soza, F. (febrero de 2009). En *Manual de Sanidad Vegetal. Programa para la Agricultura Sostenible en Laderas de América Central. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria* (págs. 30-53). Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras.
- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L., & Sánchez, L. (2011). *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Publicación científica en Ciencias Biomédicas*, 9(15), 177-187.
- Leong, S., Latiffah, Z., & Baharuddin, S. (2009). Molecular Characterization of *Fusarium Oxysporum* F. Sp. Cubense of Banana. *American Journal of Applied Sciences*, 6(7), 1301-1307.
- Maldonado, E., Ochoa, L., & Tlapal, B. (2008). Efecto del ácido acetil salicílico y *Bacillus subtilis* en la infección causada por Cucumber mosaic virus en calabacita. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 14(1), 55-59.
- Márquez, L., Serrato, A., & Cerritos, R. (2013). Secuenciación de fragmentos de ADN. En *Herramientas moleculares aplicadas en ecología* (págs. 231-249).
- Melentev, A., Helisto, P., Kuzmina, L., Galimzyanova, N., Aktuganov, & Korpela, T. (2006). Use of antagonistic Bacilli for biocontrol fungi degrading fresh wood. *Applied Biochemistry Microbiology*(42), 70-75.
- Meneses, C., Rozo, L., & Franco, J. (2011). Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia et Technica*, XVI(49), 116-121.
- Moreno, J., & Albarracín, V. (2012). Aislamiento, cultivo e identificación de microorganismos ambientales a partir de muestras naturales. *Reduca (Biología)*, 79-93.
- NCBI. (s.f.). *National Center for Biotechnology Information*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/530722907/?report=fasta>
- Orberá, T., Serrat, M., & Ortega, E. (2014). Potencialidades de la cepa SR/B-16 de *Bacillus subtilis* para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de interés agrícola. *Biotecnología Aplicada 2014*, 31, 7-12.
- Páramo, L. (2012). *Caracterización de comunidades microbianas con potencial biotecnológico para la prevención del deterioro estructural*. Tesis doctoral, Instituto Politécnico Nacional, Centro de Biotecnología Genómica, Reynosa, Tamaulipas.

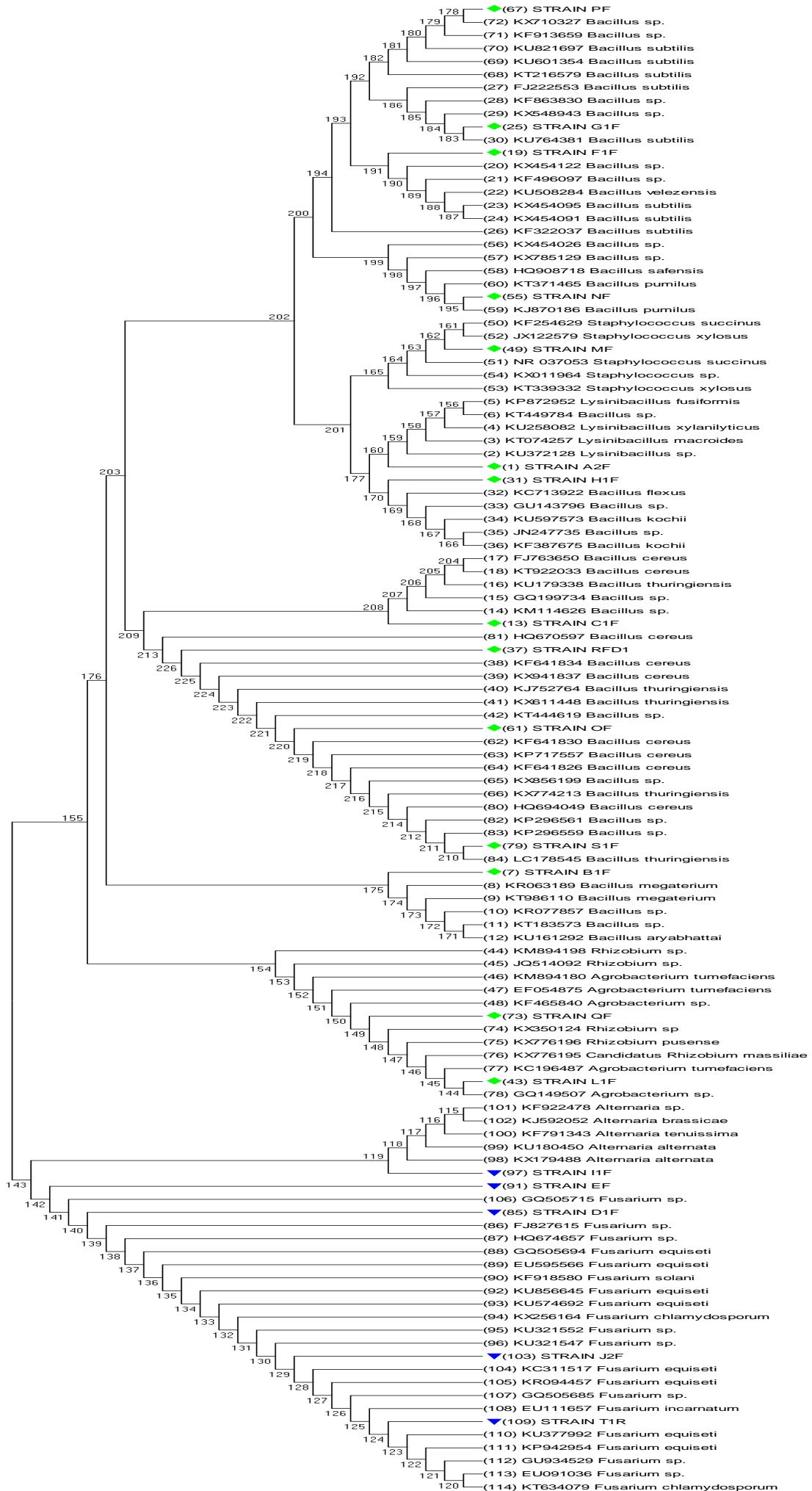
- Pérez, R. (2006). Unidad II Técnicas de Aplicación en Microbiología. En *GUÍA DE ESTUDIO PARA LA ASIGNATURA DE MICROBIOLOGÍA GENERAL* (Primera ed., págs. 23-43).
- Pérez, R. (2012). *Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal en pepino (Cucumis sativus L.)*. Tesis de maestría, Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Montecillo, Texcoco. México.
- Pérez, R., Gonzalez, T., & Muñoz, J. (2014). Antagonismo microbiano asociado a cepas bacterianas provenientes de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) y maíz (*Zea Mays*). *Revista Iberoamericana de Ciencias*, 1(3), 53-60.
- Pérez, M., & Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. En U. d. Medicina., *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (2da Edición corregida ed., págs. 23-42).
- Raghavendra J., B. B. (2006). Identification and Characterization of Novel Genetic Markers Associated with Biological Control Activities in *Bacillus subtilis*. *APS Journal*, 96(2), 145-154.
- Ramos, A., García, C., Saéz, J., & Valdezate, S. (2010). *Atlas de pruebas bioquímicas para identificar bacterias*. Obtenido de www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia37.pdf
- Rodicio, M., & Mendoza, M. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 22(4), 238-245.
- Rodríguez, C. (2013). *Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento vegetal en Tomate (Solanum lycopersicum) variedad Santa Clara, aislados de residuos Ligno Celulósicos de Higuierilla (Ricinus communis)*. Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de: Especialista en Microbiología Industrial, Universidad Católica de Manizalez.
- Rojas, A. (2011). Práctica 3. Preparación de medios de cultivo, medios selectivos y diferenciales. En *Conceptos y práctica de microbiología general* (págs. 32-38). Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.
- Sandria, J. (2003). *Aplicaciones de la Inteligencia Artificial al análisis de Biosecuencias*. Tesis de Maestría para obtener el grado de Maestro en Inteligencia Artificial, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.

- Santambrosio, E., & Ortega, M. (2009). *Siembra y recuento de microorganismos*. Cátedra de Biotecnología, Universidad Tecnológica Nacional.
- Shen, Y.-M. (s.f.). *Forestry images*. Obtenido de <http://www.forestryimages.org/browse/subthumb.cfm?sub=9494>
- Shoda, M. (2000). Bacterial Control of Plant Diseases. *Journal of Bioscience and Bioingenieria*(89), 515-521.
- Solano, C. (2006). *Microbiología General (Guión de Prácticas)*. Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales. UPNA/CSIC.
- Sosa, A., Pazos, V., & Torres, D. (2005). Aislamiento y selección de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencialidades para el control biológico en semilleros de tabaco*. *Centro Agrícola*, 32(3), 25-29.
- Steinkellner, S., Mammerler, R., & Vierheilig, H. (2008). Germination of *Fusarium oxysporum* in root exudates from tomato plants challenged with different *Fusarium oxysporum* strains. *Eur. J Plant Pathol*, 122, 395-401.
- Strange, N., & Scott, P. (2005). Plant disease: A threat to global food security. *Annu Rev Phytopathol*, 43:83-116.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- Tendulkar, S., Saikumari, Y., Patel, V., Raghotama, S., Balaram, T., & Chatto, B. (2007). Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* and its effect on *Phytopathogen Magnaporthe grisea*. *Journal applied microbiology*(103), 2331-2339.
- Travers, R., Martin, P., & Reichelder, C. (1987). Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Applied and environmental Microbiology*, 55, 1263-1266.
- Urbina, M. (2011). *Enfermedades causadas por hongos*. Universidad Católica Agropecuaria del Trópico Seco Pbro. "Francisco Luis Espinoza Pineda", Estelí.
- Uribe, L. (2007). *Caracterización fisiológica de levaduras aisladas de la filósfera de Mora*. Trabajo de Grado para optar al título de Microbióloga Industrial, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

- Wang, X., & Zhao, H. (2013). Isolation and Characterization of a *Bacillus flexus* Strain Used in Alkaline Wastewater Treatment. *Advanced Materials Research*, 750-752, 1381-1384.
- Whipps, J. (2001). Microbial Interaction and Biocontrol in the Rhizosphere. *Journal of Experimental Botany*(52), 487-511.
- Zalar, P., Gostincar, C., De Hoog, G., Ursic, V., Sudhadham, M., & Gunde-Cimerman, N. (2008). Redefinition of *Aerobasidium pullulans* and its varieties. *Stud Mycol.*(61), 21-38.

ANEXOS

Anexo 1: Árbol filogenético de bacterias y hongos utilizando el método Neighbor-Joining con un Bootstrap de 1000 réplicas. El árbol fue realizado en el programa MEGA 5.0, el código de acceso al GenBank se especifica al inicio del nombre del microorganismo.



Anexo 2: Secuencias corregidas y alineadas en formato FASTA de microorganismos identificados vía molecular.

>STRAIN A2F

```
GGAGCTTGCTCCTTTGACGTTAGCGGCCGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAA
CCTACCCTATAGTTTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGAATAATCTTTTT
GCTTCATGGTAAAAGACTGAAAGACGGTTTCGGCTGTCGCTATAGGATGGGCCCGCGGCG
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCACAATGGGCGAAAAGCCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTTTT
CGGATCGTAAAACCTCTGTTGTAAGGGAAGAACAAGTACAGTAGTAACCTGGCTGTACCTTG
ACGGTACCTTATTAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
TGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTCTTTAAGTCTG
ATGTAAAAGCCACGGCTCAACC-GTGGAGGGTCATTGAAAAGTGGGGG-ACTTGAGTGC
AGAAGAGGAAAAGTGAATTCCAAGTGTAGCGGTGAAAATGCGTAGAGATTTGGAGGAACAC
CAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGC
AAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
```

Secuencia 1. Cepa DCL1-2 (A) (*Lysinibacillus* sp.)

>STRAIN B1F

```
ATACATGCA-GTCGGGCGAACTGATTAGAAGCT
TGCTTCTATGACGTTAGCGGCGGACGGG-TGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGA
CTGGGATAACTTCGGGAAACCGAAGCTAATACCGGATAGGATCTTCTCCTTCATGGGAGA
TGATTGAAAGATGGTTTCGGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGTGCATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCAC
ACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAA
TGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGTTCGTA AAC
TCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACGAGAGTAACCTGTTGTACCTTGACGGTACCTAACC
AGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTAT
CCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCA
CGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGAAACT
```

Secuencia 2. Cepa LS5-11 (B) (*Bacillus megaterium*)

>STRAIN C1F

```
TGCTATAAAA-TGCAGTC--GAGCGAATGG-ATTGAGAAGCTT-GCTCTC
AAGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGT-AGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGA
TAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAAATTTTTGAACTGCATGGTTTCGAAATTG
AAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGG
ACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACC
AAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCCGGTTCGTA AAAACTCTGTT
GTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAA
GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGA
ATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCT
CAACCGTGGAGGGG-CATTGAAAAGTGGGAGACTTGAGTGCAAGAGGAAAAGTGGAAATT
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTT
CTGGTCTGTAACGTGACTGAGGCGCGAAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGAGGGTTTCCG
```

Secuencia 3. Cepa TS11-3 (C) (*Bacillus* sp.)

>STRAIN F1F

```
GTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA
CCTGCCTGTAAGACTGGGATAACT-CCG-GGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTT
GAACCGCATGGTTCAGACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGG
CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCCGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTT
TTGCGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGGCGTTCAAATAGGGCGGCACC
TTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCT-AACTACGTGCCAGCAG-CCGCGGTAATAC
GTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGAAAAAT
```

Secuencia 4. Cepa DCL4-31 (F) (*Bacillus subtilis*)

>STRAIN G1F

TGGGGCCTTGCCCTAATA-CTGGCAAGTTCGAGCCG-ACA
GAATGGGAG---CTTGCTCCCTG-ATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAA
CCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATGTTGTTTGA
ACCGCATGGTTCAAACATAAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGC
CATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAG
GGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGG
GAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGAAGTTTT
CGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTTGAATAGGGCGGTACCTT
GACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAG-CCGCGGTAATACGTA
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGG-CGTAAAGGGCTCGCAGGCG-GTTTCTTAAG
TCTGATGTG-AAAGCCCCCGGCTCAACCCGGGGAG

Secuencia 5. Cepa LS6-11 (G) (*Bacillus subtilis*)

>STRAIN H1F

ATGCA-GTCGAGCGAATCTGAGGGAGCT
TGCTCCCAAAGATTAGCGGCGGACGGGTGAGTAA-CACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGAC
TGGGATAACTCCGGGAAACCGGGCTAATACCGGATAATATCTATTTATACATATAATTA
GATTGAAAGATGGTTCTGCTATCACTTACAGATGGGCCCGCGGCATTAGCTAGTTGGT
GAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACAC
TGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATG
GACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAACTC
TGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCG
AAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCC
GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACG
GCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAGTGGGAACTT

Secuencia 6. Cepa DCL2-411 (H) (*Bacillus flexus*)

>STRAIN L1F

CGCCCCTTTTGGGAAGTGGCAGACGGGTG
AGTAACTGCGTGGG---AACATACCCTTCTCGGGAATAGCTCCGGGAAACTGGAATTA
ATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTTATCGGGGAAGGATTGGCCCGCGTTGGATT
AGCTAGTTGGTGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
ATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGG
TTGTAAGCTCTTTCACCGATGAAGATAATGACGGTAGTCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAA
CTTCTGTCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGTTTCGGAATTACTGGGCG
TAAAGCGCACGTAGGCGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGAGCTCAACTGCGGAA
CTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAA-GAGGTAAGTGGAATT-CCGAGTGTA
AGG-TGAAATTCGTAGATATTCGGAGGAACACCAAGTGCCGAAGGCGGCTTACTGGTCCAT
TACTGACGCTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCCGTAACGATGAATGTTAGCCGTCGGGCAGT-ACTGTTCCGGTGGCGCAGCTAACG
CATTAAACATTCCGCC-TGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAATAA-CTCAA-GGAATTGAC
GGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCAAGCAACGCGCAGAACCTTAC
CAGCTCTTGACATTCGGGGTATGGGCATTGGAGACGATGCCTTCAGTTAGGCTGGCCCC
AGAACAGGTGCTGCATGGCTGTGCTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGC
AACGAGCGCAACCTCGCCCTTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCACTCTAAGGGGACTGC
CGGTGATAAGCCGAGAGGAAGGTGGGGTACGTCAGTCAAGTCCCTCATGGCCCTACGGGCTG
GGCTACACACGTGCTACAATGGTGGTGACAGTGGGCGAGCGAGACAGCGATGTCGAGCTAA
TCTCCAAAAGCCATCTCAGTTCCGATTGCACTCTGCAACTCGAGTGCATGAAGTTGGAAT
CGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG
CCCGTACACCATGGGAAGTTGGGTTTACCCGAAGGTAGTGCCTAACCGCAAGGAGGCA
GCTAACCGGTAGGGTCAGCGACTGGGG-GAAGTC

Secuencia 7. Cepa DCL12-21 (L) (*Agrobacterium tumefaciens*)

>STRAIN MF

GAAAT

CGAGCGAACGGATAAGGAGCTTGCTCCTTTGAAGTTAGCGGCGGACGGG-TGAGTAACAC
GTGGGTAACCTACCTATAAGACTGGAATAACTTCGGGAAACCGGAGCTAATGCCGGATAA
CATATAGAACCGCATGGTTCTATAGTGAAAGATGGTTTTGCTATCACTTATAGATGGACC
CGCGCCGTATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCGACGATACGTAGCCGAC
CTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAG
CAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGGAGCAACGCCCGCTGAGTGATGA
AGGTTTTCGGATCGTAAACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGCGTAAGTAAGTGTGCG
CATCTTGACGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT
ACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGTTTTCTT
AAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGAAACTTG
AGTGCAGAAGAGGAAAAGTGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGG
AACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGG
GGATCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGT
AGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTAC
GACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTG
GTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAAATCTTGACATCCTTTGAAAACCTAG
AGATAGACCCTTCCCCTTCGGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGCTGATGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTAAGCTTAGTTGCCAT
CATTAAAGTTGGGCACTCTAGGTTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAATCATCATGCCCTTATGATTTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAATACAAA
GGGCAGCTAAACCGCGAGGTCATGCAAATCCCATAAAGTTGTTCTCAGTTCGGATTGTAG
TCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCATGCTACGGT
GAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAAACCCG
AAGCCGGTGGAGTAACCATTTTATGGAGCTAGCCGTCGAAGT

Secuencia 8. Cepa LL8-111 (M) (*Staphylococcus succinus*)

>STRAIN NF

CGCCCGGGTGAGTA

ACAC-GTAGGGT-AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATAC
CGGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACA
GATGGACCCGCGGCGCATTATCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCG
TAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGATACACGGCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGT
AGTGATGAAGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAGAGTA
ACTGCTCGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGGTCGCAGGC
-GGTTTCTTAAGTCTG-ATGTGAAAGCCCCCGGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAC
TGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCCTAG
AGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAG
CGAAAGCGTGGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTTGGGTAGTCCACGCCGTAAACGAT
GAGTGCTAAGTGTAGGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTC
CGCCTGGGGAGTACGGTTCGAGGACTGAAACTCAAAGGAAATTGACGGGGGCCCGCACAA
GCGGTGGGAGCAATGTGGTTTTAATTCGAGCAAACCGCAAGAACCTTTACCCAGGTCTT
GACATCCTCTGACAACCCCTAGAGAGATAGGGCTTTCCCTTCGGGGACAGAGTGACAGGT
GGTGCATGGTTGTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AACCCTGATCTTAGTTGCCAGACTTCAGTTGGCACTCTAAGGTGACTGCCGCTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAC
GTGCTACAATGGACAGAACAAGGGCTGCAAGACCGCAAGGTTTAGCCAATCCCATAAAT
CTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA
TCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACA
CCACGAGAGTTTGAACACCCGAAGTC

Secuencia 9. Cepa TS13-1111 (N) (*Bacillus pumilus*)

>STRAIN OF

AGTCGAGCGAATGGATTAAG

AGCTTGTCTTATGAAGTTAGCGGGACGGCTGTGTAACACGTGGGTAACCTGCCATA
AGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGT
TCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTGCATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGC
CACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCG
CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAA
AACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCG
TTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCCAGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAA
CCCACGGCTCAACC-GTGGAGGGTCATTGG

Secuencia 10. Cepa X5-9E2 (O) (*Bacillus cereus*)

>STRAIN PF

TTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT

AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTTT
GAACCGCATGGTTCAAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGG
CGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAG
AGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA
GGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGTT
TTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTATCGTTCAATAGGGCGGTACC
TTGACGGTACCTAACCAAAAAGCCACGGCTAACTACGTG-CCAGCAGCCGCGGTAATACC
TAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGCCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCC-CCGGCTCAA----CCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGG

Secuencia 11. Cepa LS6-211 (P) (*Bacillus sp.*)

>STRAIN QF

GTGG---CAGACG

GGTGAGTAACGCGTGGGAAACATACCCTTCTGCGGAATAGCTCCGGGAAACTGGAATTA
ATACCGCATACGCCCTACGGGGGAAAGATTTATCGGGGAAGGATTGGCCCCGCGTTGGATT
AGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCATAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAAT
ATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGAGTGATGAAGGCCTTAGGG
TTGTAAGCTCTTTCACCGATGAAGATAATGACGGTAGTCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAA
CTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGG-CTAGCGTTGTTCCGGAATTACTGGGC
GTAAGCGCACGTAGCGGGATATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGCAGCTCAACTGCGGA
ACTGCCTTTGATACTGGGTATCTTGAGTATGGAAGAGGTAAGTGAATTCGAGTGATAGA
GGTGAATTCGTAGATATTC

Secuencia 12. Cepa DCL12-11 (Q) (*Rhizobium sp.*)

>STRAIN RFD1

GGGGGGGGGGGGGAGGAGGGGTTTTTTCTTTCTTATTGGGAGCAAGTAAGGGGGGCTAC
A--GTCGAGCGA-TGGATTAAGAGCTTGCTCTTATGAAGTTAGCGGCGGACGTTTTTGT
ACACGTGGGTAACCTGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGG
ATAACATTTTGAACCGCATGGTTTCAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGAT
GGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAG
CCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACCGGGA
GGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGT
GATGAAGGCTTTCGGGTCGTA AAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATA
AGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGTGG
TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCATTGGAAACTGGGA
GACTTGAGTGAGGAGGAAAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATA
TGG-AGGAACCCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGT-AACTGACACTGGAGGCGCG
AAA---GCGTGGGAGCAAAACAGGATTAG--ATACCT--GGTAGTCCCC-GCCGTAAAC
GAAGAAGTGGC--AAGGGTAAAAGGGTTTTCC-GCCCTTT---TGCTGAAGTTAACGCAT
TAAGCCACTCCG--CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCCACAAGCGGGG

Secuencia 13. CepaX2-10(2)2 (R) (*Bacillus cereus*)

>STRAIN S1F

GGGGGGGGGGGTTTTTTTTTTTTTTTTTTGCCGGATATCGGGAAATCTACCGGGGGGGG
GGTTTTTTTTTTTGCTTTCACTTTTT
TCGGGGGGGGGGGGTACCCTCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGATGAGGGTCTACCGCC
CCTATGACAGCTTAGGAGCAATACGTAAAAACTTCCAGGCGAACGAGGGGATTAATATAA
ATTTGCTCTTATGAAATTAGCGCCCGA---CCCCGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG-
-CCCATAGACTGGGATAA-----CTCCGGAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTT
TGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGCGGCTTCGGCTGTCACCTTATGGATGGACCCGCG
TCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGA
GAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
AGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGC
TTTCGGGTCGTA AAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCAC
CTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCTAGCATTATCC-GGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCCGGTGGTTTTCTTAA
GTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCC-TGGAGGG-TCAT-TGGAAACTGGGAGACTT
GTGTACAGAAGAGGAAAGTGAATCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAA
GAACACCAGTGGCGAAGGCGACTTTCTGGTCTGTAACCTGACACTGAGGCGCGGCCCC--
-----CCCCCGGGTTTGCACCCCCCCCCAGTTGTACGCTTCGACAAGAGCCGAATGAAT
ACAGTGGA

Secuencia 14. Cepa X5-9CD2 (S) (*Bacillus cereus*)

>STRAIN D1F

GGGGACATTACCGAGTTTACAACCTCCCAAACCCCTGTGAACATACCTATAC
GTTGCCTCGGCGGATCAGCCCGCGCCCCGTAAAAGGGACGGCCCGCCCGAGGACCCCTA
AACTCTGTTTTAGTGGAACCTTCTGAGTAAAACAACAATAAATCAAACTTTCAACAA
CGGATCTCTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAGTAATGTGAAT
TGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGC
GGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTGTGGGACTCGCG
GTAACCCGCGTTCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGCGTAGTAATCA
TACACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCGTAAAACCCCAACTTCTGAATGTTG
ACCTCGGATCAGGTAGGAATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAGGCGGGAGGAAAAA
AAACCAACCGC

Secuencia 15. Cepa M1-2-1 (D) (*Fusarium sp.*)

>STRAIN EF

GGTTTTTTTTTTTTGGGGGGTGGGGCCGCGACGAATACCCCTTTTTAAGGAGTATGAT
TACTACCCTATGGAAGCTCGACGTCCCCCTCCAATCAATTTGGGGAACGCGGGTTACCGC
GAGTCCAACCCCATCTTGAGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAAATGCGATAAG
TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCGCCA
GTATTCTGGCGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCAGCTTGGTGT
GGGACTCGCGTAACCCGCGTTCCCAAATCGATTGGCGGTACGTCGAGCTTCCATAGC
GTAGTAATCATAACCTCGTTACTGGTAATCGTCGCGGCCACGCGTAAAACCCCAACTT
CTGAATGTTGACCTCGGATCAGGTATGAATACCTGATGAACTCTCCCAATCAGTCGGAG
GAAAAA

Secuencia 16. Cepa F15 (E) (*Fusarium sp.*)

>STRAIN I1F

TTGGTGGGTTCCGCC
ACCACTAGGACAAACATAAACCTTTTTGTAATTGCAATCAGCGTCAGTAACAAATTAATAA
TTACAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGC
GATAAGTAGTGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGC
CCTTTGGTATTCCAAAGGGCATGCCTGTTTCGAGCGTCATTTGTACCCTCAAGCTTTGCTT
GGTGTGGGCGTCTTGTCTCTAGCTTTGCTGGAGACTCGCCTTAAAGTAATTGGCAGCCG
GCCTACTGGTTTTCGGAGCGCAGCACAAGTCGCACTCTCTATCAGCAAAGGTCTAGCATCC
ATTAAGCCTTTTTTCAACTTTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAA-CTTAA
GCATATCAATAAGCCGAAGGAA

Secuencia 17. Cepa M5-62N (I) (*Altenaria alternata*)

Anexo 3: Fotografías de cultivo mixto inicial, morfología en placa, tinción de Gram y pruebas de antagonismo a bacterias seleccionadas.



Imagen 1. Cultivo mixto obtenido en la primera inoculación (primera siembra) de la muestra No 1 correspondiente al bioinsumo TS, donde se puede observar la diversidad de morfología de las colonias obtenidas.

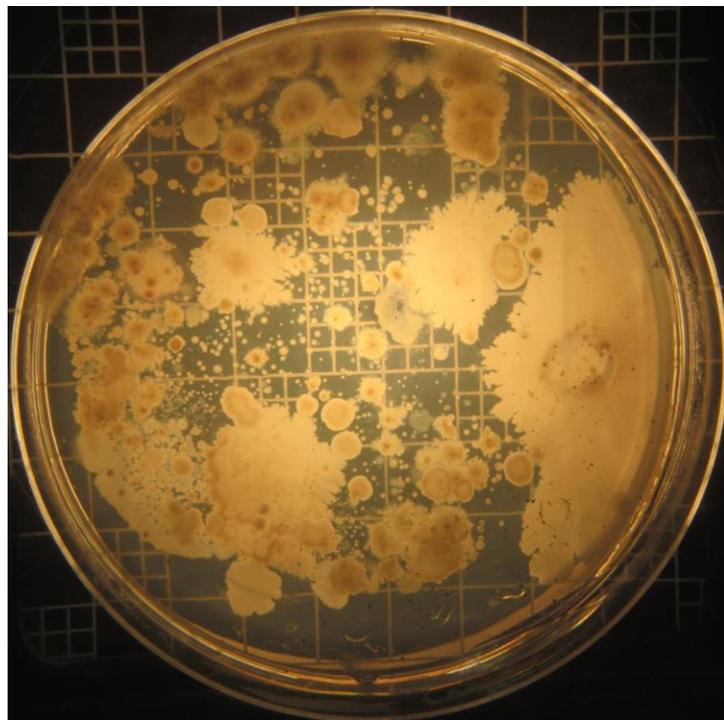


Imagen 2. Cultivo mixto obtenido en la primera inoculación (primera siembra) de la muestra No 4 correspondiente al bioinsumo DCL, donde se puede observar la diversidad de morfología de las colonias obtenidas.

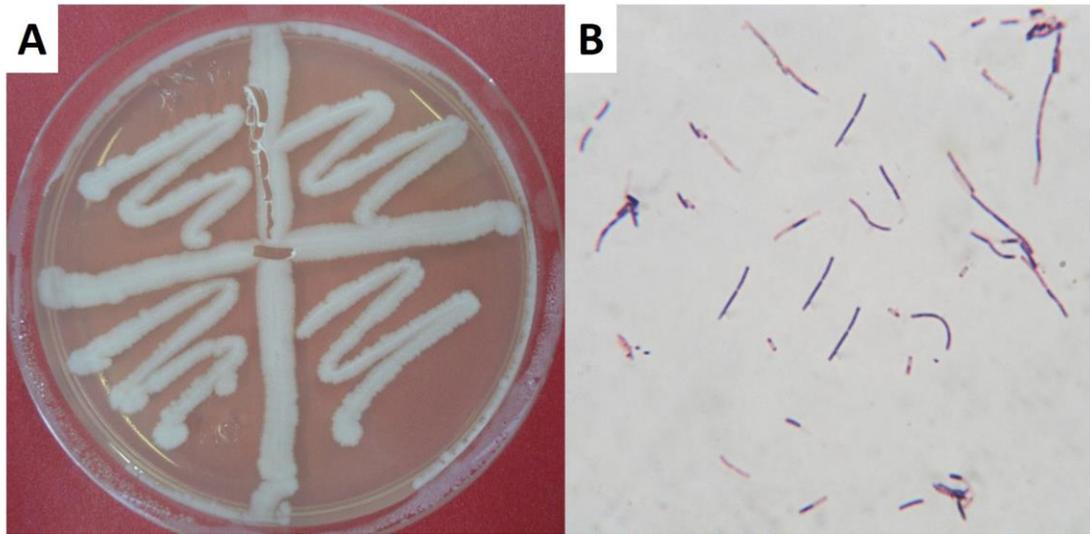


Imagen 3. Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F).

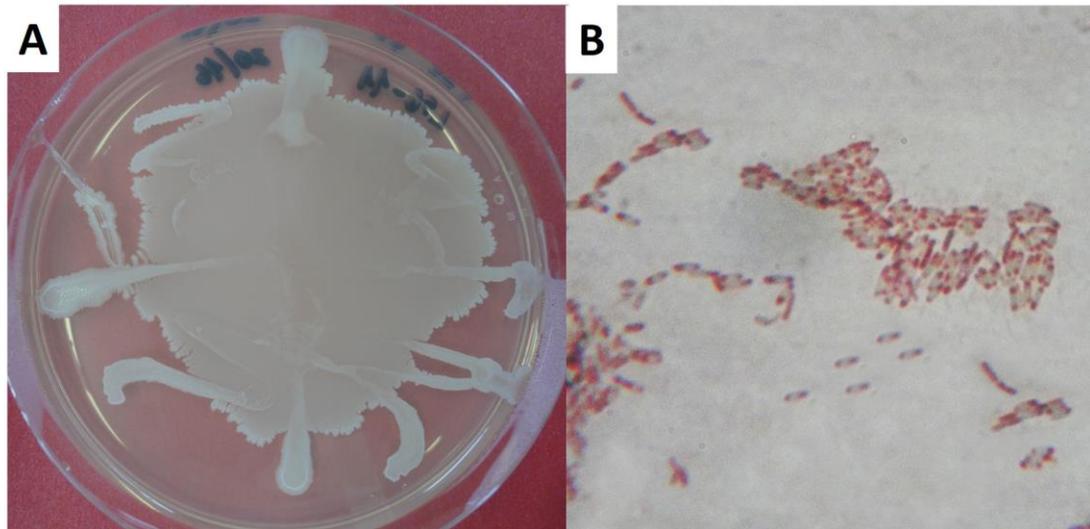


Imagen 4. Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Bacillus subtilis* LS6-11 (G).

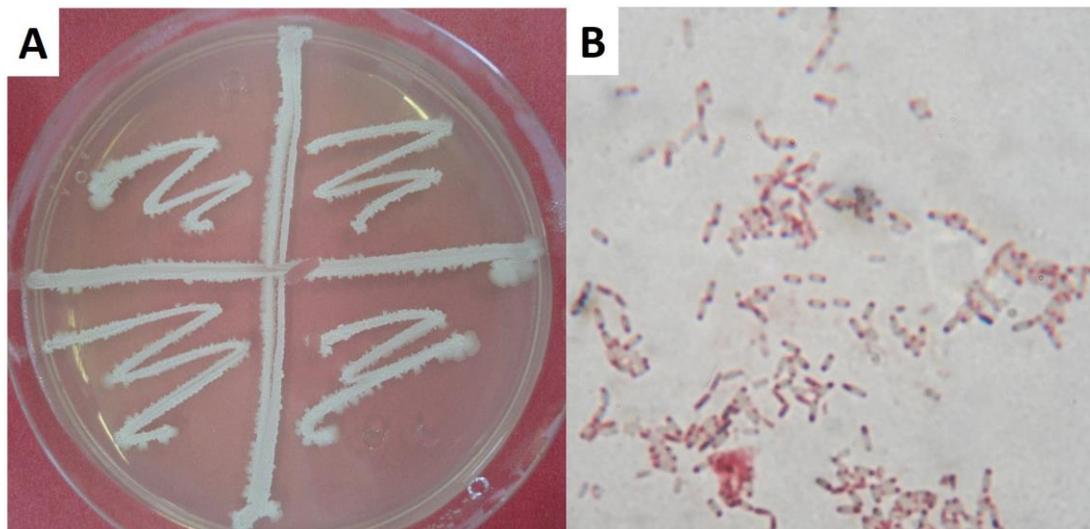


Imagen 5.. Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Bacillus* sp. LS6-211 (P).

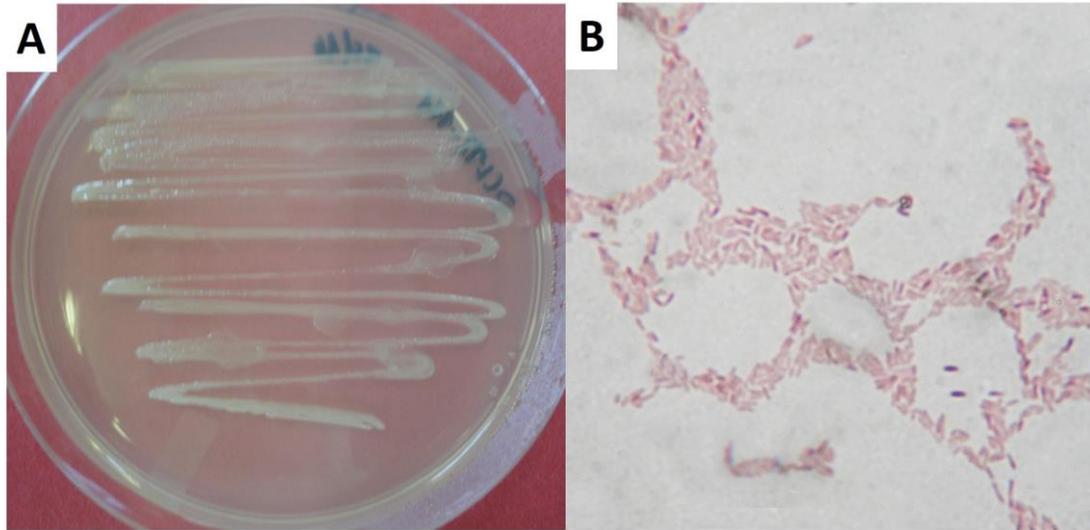


Imagen 6. Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Rhizobium* sp. DCL12-11 (Q).

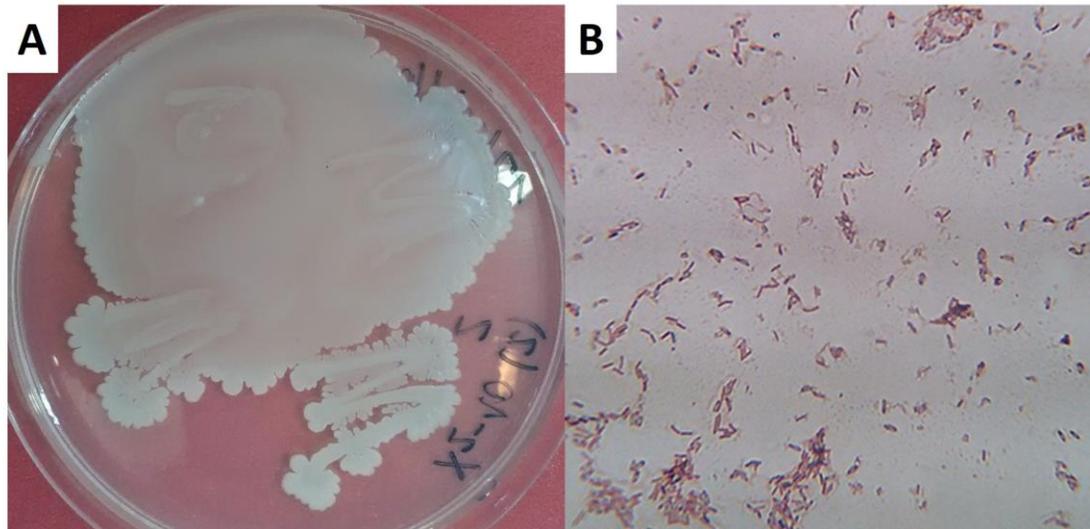


Imagen 7. Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R).

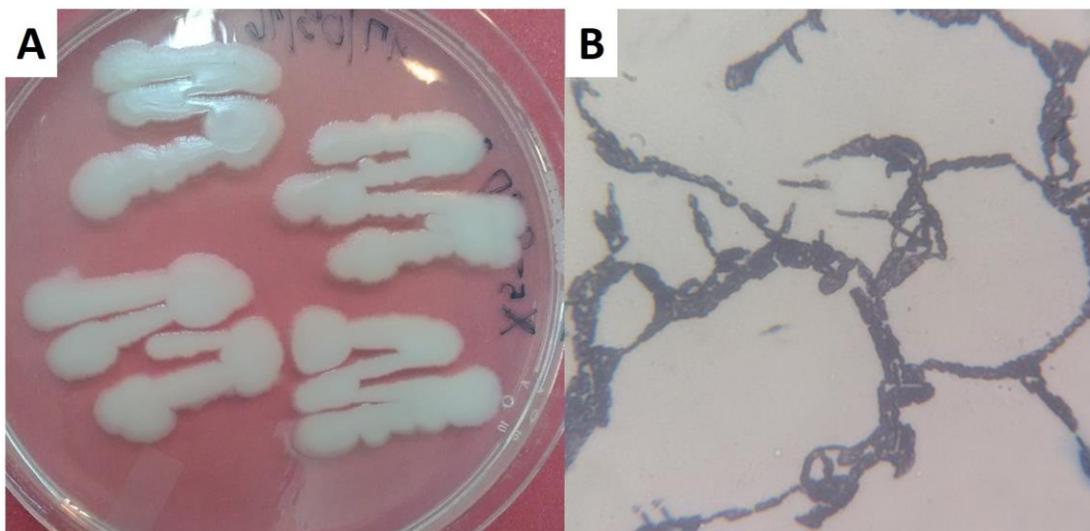


Imagen 8. Morfología en placa (A) y tinción Gram para *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S).

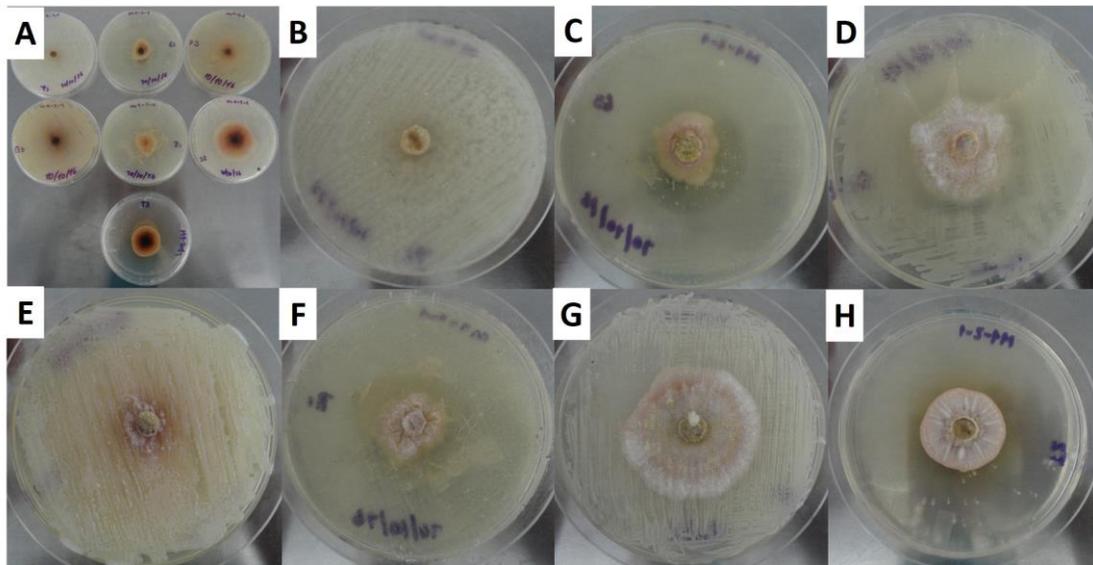


Imagen 9. Evaluación del efecto antagonístico al noveno día de las bacterias seleccionadas: B: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), C: *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), D: *Bacillus sp.* LS6-211 (P), E: *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), F: *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R), G: *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) frente a *Fusarium sp.* M1-2-1 (D). En A se muestran los 7 tratamiento y en H el testigo sin bacterias.

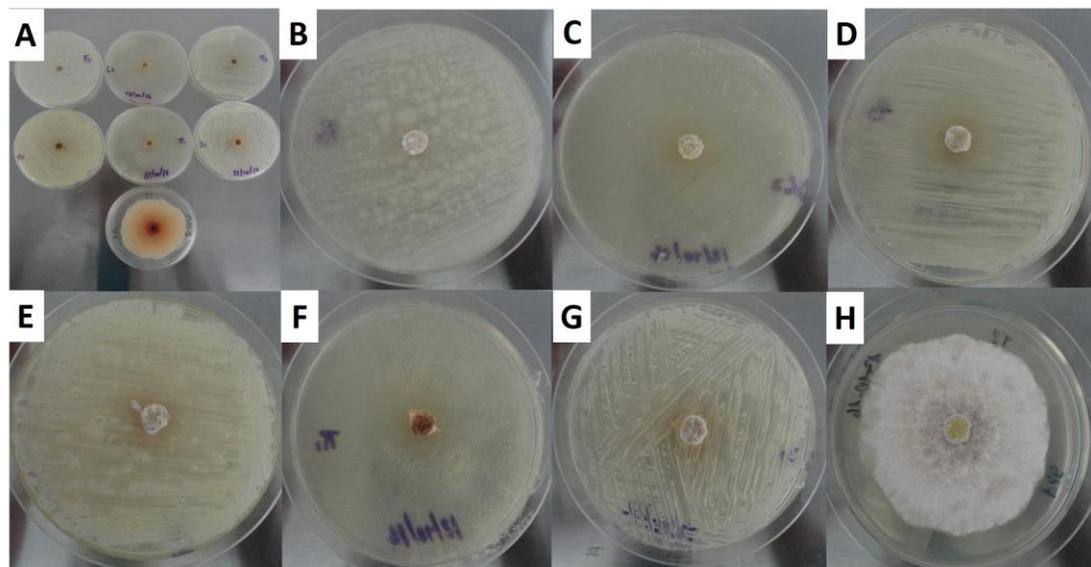


Imagen 10. Evaluación del efecto antagonístico al séptimo día de las bacterias seleccionadas: B: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), C: *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), D: *Bacillus sp.* LS6-211 (P), E: *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), F: *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R), G: *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) frente a *Fusarium sp.* F15 (E). En A se muestran los 7 tratamiento y en H el testigo sin bacterias.

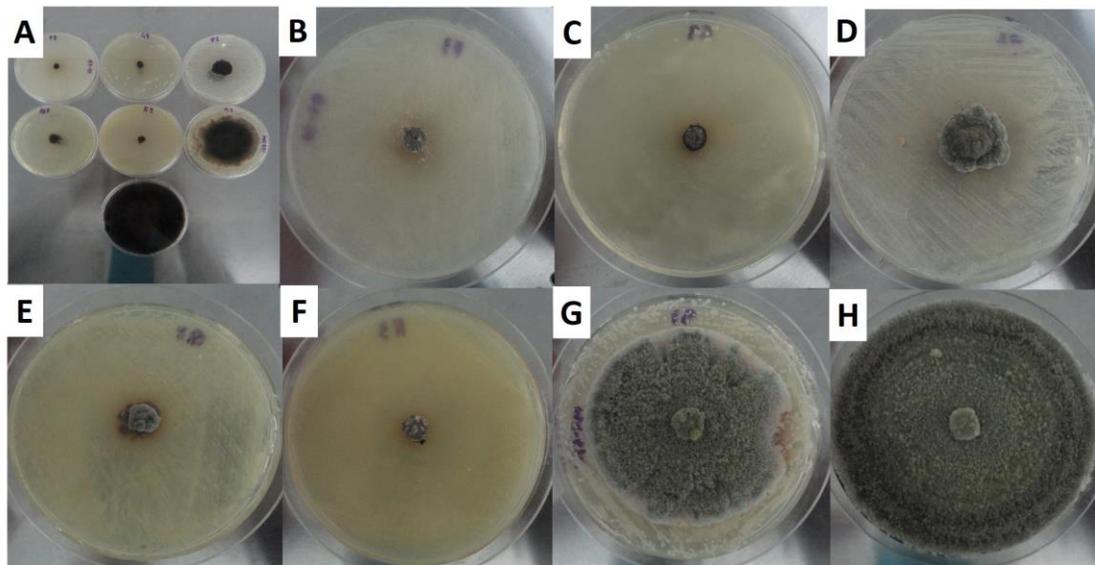


Imagen 11. Evaluación del efecto antagónico al décimo quinto día de las bacterias seleccionadas: B: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), C: *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), D: *Bacillus sp.* LS6-211 (P), E: *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), F: *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R), G: *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) frente a *Alternaria alternata*. M5-62N (I). En A se muestran los 7 tratamiento y en H el testigo sin bacterias.

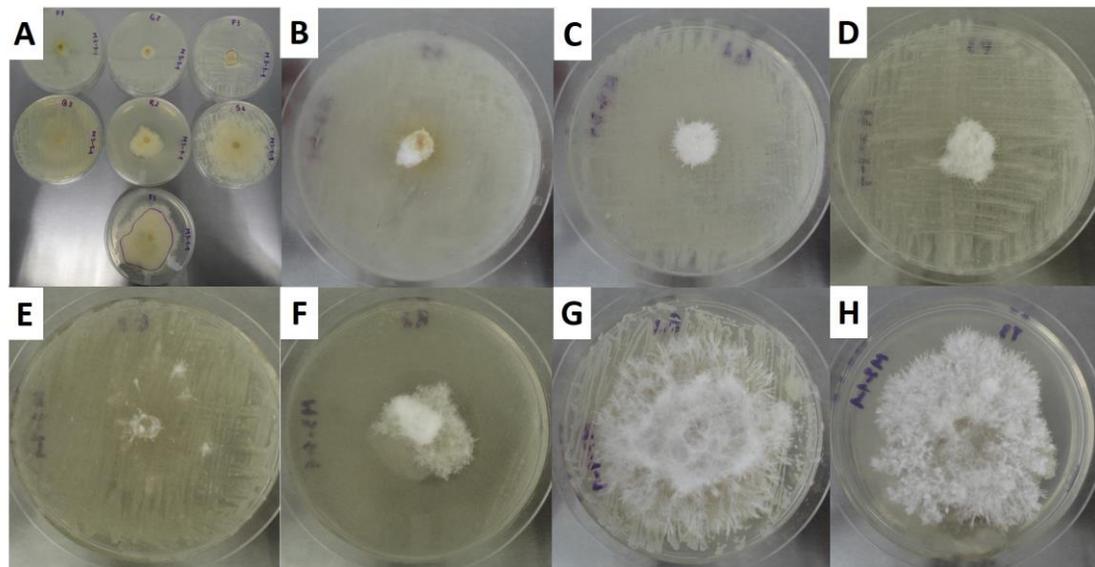


Imagen 12. Evaluación del efecto antagónico al noveno día de las bacterias seleccionadas: B: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), C: *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), D: *Bacillus sp.* LS6-211 (P), E: *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), F: *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R), G: *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) frente a *Fusarium equiseti* M3-1-1 (J). En A se muestran los 7 tratamiento y en H el testigo sin bacterias.

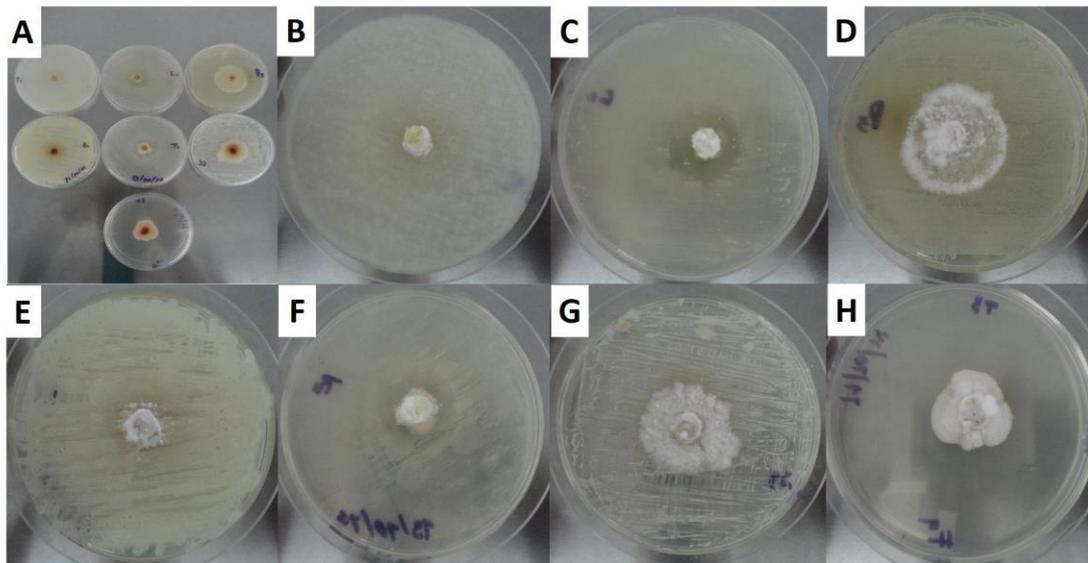


Imagen 13. Evaluación del efecto antagónico al sexto día de las bacterias seleccionadas: B: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), C: *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), D: *Bacillus sp.* LS6-211 (P), E: *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), F: *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R), G: *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S) frente a *Fusarium equiseti* F9 (T). En A se muestran los 7 tratamientos y en H el testigo sin bacterias.

Anexo 4: Porcentaje de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos: *Fusarium sp.* M 1-2-1 (D), *Fusarium sp.* F15 (E), *Alternaria alternata* M5-62N (I), *Fusarium equiseti* M 3-1-1 (J) y *Fusarium equiseti* F9 (T), frente a las Bacterias previamente seleccionadas como inhibidoras de crecimiento: *Bacillus subtilis* DCL4-31 (F), *Bacillus subtilis* LS6-11 (G), *Bacillus sp.* LS6-211 (P), *Rhizobium sp.* DCL12-11 (Q), *Bacillus cereus* X2-10(2)2 (R) y *Bacillus cereus* X5-9CD2 (S).

Bacterias	% Inhibición frente a fitopatógenos				
	D	E	I	J	T
F	94.23	98.33	100.00	83.96	49.68
G	63.92	93.75	90.00	68.75	40.97
P	43.78	95.00	86.25	57.81	-24.52
Q	71.14	90.00	90.00	50.00	62.90
R	58.79	93.75	97.50	51.04	57.42
S	25.25	81.25	42.50	0.00	-45.16

GLOSARIO

ADN: Ácido Desoxirribonucleico. Ácido nucleico formado por nucleótidos en que el azúcar es desoxirribosa, y las bases nitrogenadas son adenina, timina, citosina y guanina. Excepto en los retrovirus que tienen ARN, el ADN codifica la información para la reproducción y funcionamiento de las células y para la replicación de la propia molécula de ADN. Representa la copia de seguridad o depósito de la información genética primaria, que en las células eucariotas esta confinada en la caja fuerte del núcleo.

Aeróbico: proceso en el que se transforma residuos orgánicos de origen animal o vegetal, en presencia de oxígeno.

Aerobio: microorganismos que requieren de la presencia de oxígeno para vivir.

Anaerobio: se le dice al organismo que no necesita oxígeno libre para vivir.

Antibiosis: fenómeno biológico en el que existe una detención o destrucción del crecimiento microbiano debido a sustancias producidas por otro ser vivo.

Antibióticos: sustancias producidas por un ser vivo que se oponen al desarrollo de otro ser vivo.

Anamorfo: estado asexual o imperfecto de un hongo.

Antimicrobianos: sustancias que matan o inhiben el crecimiento de los microorganismos (antibacterianos, antifungosos, etc.).

Antiseptia: operaciones o técnicas encaminadas a crear un ambiente que impida el desarrollo de los microorganismos e incluso pueda matarlos.

Antisépticos: son aquellas sustancias químicas que previenen el crecimiento o acción de los microorganismos ya sea destruyéndolos o inhibiendo su crecimiento y actividad.

Asepsia: técnicas empleadas para impedir el acceso de microorganismos al ambiente de trabajo.

Bioedit: Es un programa informático de secuencias el cual permite la manipulación y análisis de múltiples secuencias y contiene aplicaciones que facilitan su alineamiento.

Biocontrol: El control biológico es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo.

BLAST: Es un programa informático que emplea un algoritmo heurístico que lleva a cabo un alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN o de proteínas. El programa es capaz de comparar una secuencia problema (también denominada en la literatura secuencia query) contra una gran cantidad de secuencias que se encuentren en una base de datos.

Clados: En biología, se llama clado a cada una de las ramas del árbol filogenético propuesto para agrupar a los seres vivos. Por consiguiente, un clado se interpreta como un conjunto de especies emparentadas (con un antepasado común).

Conidias: estructuras propagativas de los hongos producidas al extremo de un conidióforo.

Conidióforo: hifa especializada, en cuyo extremo apical se insertan los conidios.

Desinfección: proceso de destrucción de los agentes infecciosos.

Desinfectantes: aquellas sustancias químicas que matan las formas vegetativas y no necesariamente las formas de resistencia de los microorganismos patógenos.

Esporangio: estructura en forma de bolsa que contiene esporas.

Esporas: unidad reproductiva de los hongos, que se forma dentro de un esporangio.

Esporulación: proceso que ocurre en los hongos y está relacionado con la producción de esporas, conidias, etc.

Hifa: cada uno de los filamentos tubulares que constituyen el micelio en todo su espesor, lo cual confiere un aspecto no estratificado.

MEGA: Es una herramienta para trabajar con el alineamiento de secuencias manual y automáticamente para la realización de árboles filogenéticos empleando secuencias de bases de datos, también estima rangos de evolución molecular y examina hipótesis evolutivas.

Metabolismo: actividad bioquímica que ocurre en los seres vivos para llevar a cabo los procesos esenciales para su supervivencia.

Micelio: estructura vegetativa de los hongos, constituida por filamentos llamados hifas.

Microbicidas: sustancias que matan las formas vegetativas, pero no necesariamente las esporas de un microorganismo (bactericida, fungicida, etc.).

Morfología: estudio de la forma y estructura externa de los seres vivos.

Patógeno: término que se aplica a cualquier elemento que causa enfermedades. Organismo que causan una enfermedad.

Plaga: Población de organismos vivos que al crecer en forma descontrolada, causa daños económicos o transmiten enfermedades a las plantas, los animales o al hombre.

Saprófito: organismo que vive de materia orgánica muerta o en descomposición.

Teleomorfo: Estado sexual o perfecto de un hongo.

Abreviaturas

ADNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal.

AN: Agar Nutritivo o nutriente.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta de Búsqueda de Alineamiento Local Básico).

ITS: Internal Transcribed Space (Espacio Interno Transcrito).

MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (Análisis de Genética Evolutiva Molecular).

NCBI: National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional de Información de Biotecnología).

PIENSA: Programa de Investigación Estudios Nacionales y Servicios Ambientales.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PCA: Plate Count Agar.

PDA: Papa Dextrosa Agar.

RSI: Resistencia sistémica inducida.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA DE LA CONSTRUCCIÓN

SECRETARÍA DE FACULTAD

F-8: CARTA DE EGRESADO

El Suscrito Secretario de la FACULTAD DE TECNOLOGIA DE LA CONSTRUCCION hace constar que:

FLORES HERNÁNDEZ MARIO SERGIO

Carne: 2011-36699 Turno Diurno Plan de Estudios 97 de conformidad con el Reglamento Académico vigente en la Universidad, es EGRESADO de la Carrera de INGENIERIA AGRÍCOLA.

Se extiende la presente CARTA DE EGRESADO, a solicitud del interesado en la ciudad de Managua, a los tres días del mes de marzo del año dos mil dieciseis.

Atentamente,



Dr. Francisco Efraín Chamorro Blandón
Secretario de Facultad



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA DE LA CONSTRUCCIÓN

SECRETARÍA DE FACULTAD

F-8: CARTA DE EGRESADO

El Suscrito Secretario de la FACULTAD DE TECNOLOGIA DE LA CONSTRUCCION hace constar que:

ROQUE CASTELLANO ERICK VICENTE

Carne: 2011-36984 Turno Diurno Plan de Estudios 97 de conformidad con el Reglamento Académico vigente en la Universidad, es EGRESADO de la Carrera de INGENIERIA AGRÍCOLA.

Se extiende la presente CARTA DE EGRESADO, a solicitud del interesado en la ciudad de Managua, a los seis días del mes de febrero del año dos mil diecisiete.

Atentamente,

Dr. Francisco Efraín Chamorro Blandón
Secretario de Facultad



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE TECNOLOGIA DE LA CONSTRUCCION
SECRETARIA ACADEMICA**

**HOJA DE MATRICULA
AÑO ACADEMICO 2017**

No. Recibo **74412456** No. Inscripción **229**

NOMBRES Y APELLIDOS: Mario Sergio Flores Hernández TURNO:
 CARRERA: INGENIERIA AGRÍCOLA CARNET: 2011-36699
 PLAN DE ESTUDIO: 97 SEMESTRE: PRIMER SEMESTRE 2017 FECHA: 23/02/2017

No.	ASIGNATURA	GRUPO	AULA	CRED.	F	R
1ULTIMA LINEA					

F:Frecuencia de Inscripciones de Asignatura R: Retiro de Asignatura.

AJIMENEZ

GRABADOR

FIRMA Y SELLO DEL
FUNCIONARIO



FIRMA DEL
ESTUDIANTE

cc:ORIGINAL:ESTUDIANTE - COPIA:EXPEDIENTE.

IMPRESO POR SISTEMA DE REGISTRO ACADEMICO EL 23-feb-2017



UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE TECNOLOGIA DE LA CONSTRUCCION
SECRETARIA ACADEMICA

HOJA DE MATRICULA
AÑO ACADEMICO 2017

No. Recibo **74443829** No. Inscripción **232**

NOMBRES Y APELLIDOS: Erick Vicente Roque Castellano
CARRERA: INGENIERIA AGRÍCOLA CARNET: 2011-36984 TURNO:
PLAN DE ESTUDIO: 97 SEMESTRE: PRIMER SEMESTRE 2017 FECHA: 23/02/2017

No.	ASIGNATURA	GRUPO	AULA	CRED.	F	R
1	ULTIMA LINEA					

F:Frecuencia de Inscripciones de Asignatura R: Retiro de Asignatura.

USER_ONLINE

GRABADOR

cc:ORIGINAL:ESTUDIANTE - COPIA:EXPEDIENTE.

IMPRESO POR SISTEMA DE REGISTRO ACADEMICO EL 24-feb-2017

FIRMA Y SELLO DEL
FUNCIONARIO



FIRMA DEL
ESTUDIANTE