

Actividad biosurfactante de dos cepas quitinolíticas de *Bacillus subtilis* y su antagonismo contra *Corynespora cassiicola*

Biosurfactant activity of two chitinolytic *Bacillus subtilis* strains and their antagonism against *Corynespora cassiicola*

Alecsis de Melchor Padrón Chan¹✉, Jairo Cristóbal Alejo¹✉ and Arturo Reyes Ramírez^{1*}✉

¹ Tecnológico Nacional de México/ Instituto Tecnológico de Conkal, Av. Tecnológico S/N, 97345, Conkal, Yucatán, México.

ABSTRACT

Corynespora cassiicola causes losses in tomato production; agrochemicals are used to control it. Rhizobacteria, such as *Bacillus* spp., represent an alternative to chemical products. The effect of *Bacillus subtilis* F8 and K47 against *C. cassiicola* was evaluated, mycelial and fungal growth was determined and the percentage of inhibition was calculated. Damage by the pathogen was evaluated in detached leaves inoculated with spores or cell-free filtrate. In *B. subtilis*, the presence of genes for surfactin biosynthesis, its emulsifying capacity and chitinolytic activity were determined. *B. subtilis* F8 and K47 reduced, respectively, *C. cassiicola* mycelial growth by 5.6 cm and 5.5 cm, the fungal growth by 79.4 % and 75.6 %, with an inhibition percentage of 69.1 % and 72.9 %. On detached leaves, the application of spores or filtrates reduced disease symptoms by up to 63.8 %. Genes related to surfactin biosynthesis were detected in both strains, with an emulsifying capacity of 21.15 and 21.48 % and a chitinolytic activity of 0.165 $\mu\text{M mg}^{-1}$ and 0.367 $\mu\text{M mg}^{-1}$, respectively. *B. subtilis* F8 and K47 present promising potential as an alternative in the control of *C. cassiicola* in tomato crops.

Keywords: Biocontrol, inhibition, detached leaves, surfactin, chitinase.

RESUMEN

Corynespora cassiicola causa pérdidas en la producción de tomate, su principal control son los agroquímicos. Rizobacterias como *Bacillus* spp. representan una alternativa a los productos químicos. Se evaluó el efecto de *Bacillus subtilis* F8 y K47 contra *C. cassiicola*, se determinó el crecimiento micelial y fúngico, además, se calculó el porcentaje de inhibición. En hojas desprendidas inoculadas con esporas o filtrado libre de células se evaluó el daño por el patógeno. En *B. subtilis* se determinó la presencia de genes para la biosíntesis de surfactina, su capacidad emulsionante y actividad quitinolítica. *B. subtilis* F8 y K47 redujeron el crecimiento micelial de *C. cassiicola* 5.6 cm y 5.5 cm y el crecimiento fúngico un 79.4 % y 75.6 %, con un porcentaje de inhibición de 69.1 % y 72.9 % respectivamente. En hojas desprendidas, la aplicación de esporas o filtrados redujo los síntomas de la enfermedad hasta en un 63.8 %. En ambas cepas se identificaron genes relacionados con la biosíntesis de surfactina, con capacidad de emulsión de 21.15 % y 21.48 % y una actividad quitinolítica de 0.165 $\mu\text{M mg}^{-1}$ y 0.367 $\mu\text{M mg}^{-1}$ respectivamente. *B. subtilis*

F8 y K47 presentan potencial prometedor como alternativa en el control de *C. cassiicola* en cultivos de tomate.

Palabras clave: Biocontrol, inhibición, hojas desprendidas, surfactina, quitinasa.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como mancha foliar causada por *Corynespora cassiicola* (Berk. y Curt.) Wei, es importante a nivel mundial debido a que ocasiona pérdidas significativas en la producción de hortalizas de importancia económica como el tomate (*Solanum lycopersicum* L.) (Gao *et al.*, 2020). El patógeno afecta el crecimiento de las plantas en cualquier etapa de desarrollo, se observan lesiones necróticas con patrones de halo amarillo circundante en las hojas (Moo *et al.*, 2022). El método más utilizado para el control de la enfermedad es el uso frecuente de fungicidas, sin embargo, además de los costos económicos, la gran dependencia de estos agroquímicos aplicados en dosis más altas, puede ser un riesgo para la salud humana y para el medio ambiente (Santovito *et al.*, 2018), además, aceleran el proceso de resistencia en los patógenos, *C. cassiicola* está catalogado por el Comité de Acción de Resistencia a Fungicidas como un patógeno de "alto riesgo" debido a su desarrollo de resistencia a fungicidas (Zhu *et al.*, 2018).

Por lo anterior se requieren opciones de manejo amigables con el ambiente sin acelerar la resistencia del patógeno. Una alternativa es el uso de rizobacterias pertenecientes al género *Bacillus* con potencial biocontrolador contra patógenos, con mecanismos como la competencia de espacio y nutrientes, la producción de lipopéptidos con capacidad de formar biopelículas protectoras y alteración de las membranas celulares de los microorganismos, así como actividades enzimáticas con capacidad de degradar la pared celular de los patógenos, sin efectos colaterales (Leal *et al.*, 2015).

Con respecto a la actividad antagónica por competencia de espacios y nutrientes, Sosa *et al.* (2012) reportaron que *Bacillus subtilis* cepa F8 y cepa K47 presentaron más del 56 % en la inhibición *in vitro* de los patógenos *Macrophomina phaseolina*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Helminthosporium* sp. y *Alternaria* sp. En cuanto al modo de acción indirecto *Bacillus* spp. actúa por medio de la producción de lipopéptidos cíclicos (LPC), moléculas anfífilas activas en la membrana con diversas actividades antimicrobianas y funciones antifúngicas importantes (Ongena y Philippe, 2008).

*Autor para correspondencia: Arturo Reyes Ramírez

Correo-e: arturo.rr@conkal.tecnm.mx

Recibido: 10 de junio de 2024

Aceptado: 4 de mayo de 2025

Publicado: 30 de mayo de 2025

Bacillus spp. produce comúnmente tres familias biosintéticas principales de LPC utilizados como agentes de control biológico: surfactinas, iturinas y fengicinas. La familia surfactina destaca por la producción de biopelículas y emulsiones, evitando la adhesión y colonización de patógenos, de igual forma puede alterar la membrana celular del hongo provocando su desestabilización llevándolo a la muerte, también actúa como secuestrador de iones requeridos en el crecimiento y supervivencia del fitopatógeno (Salek y Euston, 2019; Dong *et al.*, 2022). Mejía *et al.* (2016) reportaron que *B. subtilis* F8 mostró presencia de genes relacionados con la biosíntesis de surfactinas e iturinas y antagonismo frente los patógenos *Fusarium equiseti* y *F. solani*, por otra parte, en *B. subtilis* JN005 se detectaron genes que codifican la síntesis de metabolitos secundarios de surfactina y fengicina, se aislaron los lipopéptidos y se probó *in vitro* contra *Magnaporthe oryzae* en plantas de arroz, se reporta una reducción del más del 17 % de la enfermedad causada por el patógeno (Zhu *et al.*, 2023), así mismo en *B. pumilis* se detectó la presencia del gen de la surfactina y la inoculación de la bacteria en semillas protegió significativamente a las plántulas de sorgo de la infección por *Rhizoctonia solani* (Kumar *et al.*, 2023).

Además, algunas cepas de *Bacillus* presentan actividad de enzimas quitinolíticas que hidrolizan los enlaces glicosídicos β -1,4 en la quitina el cual forma el componente principal de la pared celular de los hongos, contribuyendo de manera importante a la actividad antagónica de las cepas bacterianas contra los hongos patógenos de las plantas (Kalai-Grami *et al.*, 2014). *B. subtilis* str. SV41 suprimió más de un 87 % el marchitamiento por *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate, la cepa mostró presencia del gen *ChiA* (Aydi *et al.*, 2017). Por otra parte, Rodas *et al.* (2009) reportan que las cepas LUM, B001, B003, B013, B015 y B065 pertenecientes al género *Bacillus* produjeron una actividad quitinolítica de más de 2 cm (halo de hidrólisis) en medio mínimo suplementado con 5 % de quitina coloidal, mientras que Brzezinska *et al.* (2020) mencionan que *B. subtilis* B3 produjo una actividad quitinolítica de más de 4 U mL⁻¹ utilizando como sustrato quitina coloidal. Así mismo, Le Quoc (2023) reportó que 25 aislados de bacterias inhiben el crecimiento de *C. cassiicola*, entre 39.8 % y 62.6 %, todos los aislados demostraron producir β -1, 3-glucanasa y quitinasas, siendo la cepa *B. siamensis* TV16 que exhibió mayor actividad antifúngica. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad biosurfactante y quitinolítica de dos cepas de *B. subtilis* nativas de Yucatán y su antagonismo contra *C. cassiicola* aislada de tomate.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizó *B. subtilis* F8 y *B. subtilis* K47 aislados previamente de la península de Yucatán (Sosa *et al.*, 2012). Para la obtención de los inóculos las bacterias se cultivaron en caldo nutritivo (CN) durante 10 días en agitación a 180 rpm a 30 °C (Incubator shaker ZWY 200D, Shanghai China), el sobrenadante (filtrado libre de células) y el paquete celular (esporas) se recuperaron

por centrifugación a 3000 rpm por 15 minutos (Centrífuga Solbat C600, Puebla México). El filtrado libre de células se almacenó a -18 °C hasta su uso, y el paquete celular se ajustó a una DO de 0.8 a 550 nm en un espectrofotómetro (Ray Leigh, UV2601, China). La cepa de *Corynespora cassiicola* se aisló de plantas de tomate con síntomas típicos de la enfermedad (Moo *et al.*, 2022), y se reactivó en medio PDA.

Antagonismo *in vitro* por confrontación directa

La actividad antifúngica *in vitro* se evaluó mediante la técnica de cultivo dual. Se colocó un disco de 0.5 cm de diámetro de micelio de *C. cassiicola* en un extremo de la caja Petri con medio PDA, 24 horas después se inoculó con una asa bacteriológica, una colonia aislada de cada cepa bacteriana en el extremo opuesto al hongo. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 15 días y se determinó el crecimiento micelial (cm), se evaluó el crecimiento fúngico (cm²) midiendo el área total del crecimiento del hongo utilizando el programa imageJ y se calculó el porcentaje de inhibición utilizando la fórmula reportada por Abbott (1925):

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Donde R1: valor promedio del radio de la colonia control y R2: es el valor promedio del radio del micelio fúngico que crece en la placa antagonista.

Ensayo en hojas desprendidas inoculadas con esporas o filtrado libre de células

Se realizó de acuerdo a reportes previos (Bañuelos, 2007; Parra *et al.* 2011; De la Caridad *et al.* 2017), se recolectó el segundo foliolo de la tercera hoja a partir del ápice de plantas de tomate variedad Pony express crecidas en condiciones de campo, en una cámara de flujo laminar se trabajó con la técnica de cámara húmeda en cajas Petri estériles de 100 por 15 mm, en la cual se dispuso un foliolo de aspecto sano, previamente desinfectado con hipoclorito de sodio al 2 % y lavada tres veces con agua destilada estéril. Tanto para el ensayo con la solución de esporas (DO = 0.8), como para el filtrado libre de células se asperjaron 200 μ L de cada bacteria por tratamiento en la zona adaxial de la hoja y se dejó secar 15 min, posteriormente, se colocó un disco de 0.5 cm de diámetro de micelio de *C. cassiicola* en dos extremos de la zona media de la parte adaxial de la hoja. Como testigo se utilizaron hojas sin aspersión de esporas o de filtrado libre de células. Se realizaron tres repeticiones por tratamiento (una cámara húmeda como unidad experimental). Las cámaras fueron humedecidas homogéneamente con 1 mL de agua destilada estéril cada dos días. Al quinto día se evaluó el área afectada y área sana mediante el programa Image J 64 bits para Windows.

Evaluación de la capacidad biosurfactante de *Bacillus subtilis*

Se le evaluó la capacidad de emulsión en *B. subtilis* cepa F8 y cepa K47 de acuerdo a lo descrito por Bodour *et al.* (2004), en



tubos de ensayo de 13 x 100 mm, se agregó 2 mL del filtrado libre de células y 2 mL de aceite mineral y se mezcló en la velocidad máxima durante 2 min con un vortex (Ika Vortex 3, Madrid España), las muestras se mantuvieron en oscuridad durante 24 h. El índice de emulsión (E24) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E24 = \frac{AEF(cm)}{ATS(cm)} * 100$$

Donde AEF: Altura de emulsión formada, ATS: altura total de la solución.

Extracción de ADN bacteriano

Las cepas bacterianas se cultivaron en caldo nutritivo y se mantuvieron 24 horas en agitación a 180 rpm a 30 °C (Incubator shaker ZWY 200D, Shanghai China). La extracción de DNA se realizó utilizando el kit de extracción Wizard Genomic, kit Wizard Genomic (Promega®, E.U.A) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La integridad del DNA se visualizó en gel de agarosa al 1 %. La concentración y pureza se determinó con un Nanodrop 2000c (Termo scientific, E.U.A.).

Detección de genes relacionados a la biosíntesis de surfactina

Para determinar la presencia de genes relacionados a la biosíntesis de lipopéptidos *srfAA* y *srf3* pertenecientes a la familia de la surfactina en *B. subtilis* cepa F8 y cepa K47, se realizó la amplificación por la PCR en un termociclador (Techne TC-312 E.U.A.), los iniciadores específicos utilizados se presentan en la Tabla 1. Se realizó a un volumen de reacción de 50 µL, se mezcló buffer PCR 1x, 1.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 µM de cada iniciador y 2 U de Dream Taq DNA Polymerase (Termo Scientific). Las condiciones de reacción de la PCR fueron con una denaturalización inicial a 95 °C durante 3 min, 35 ciclos: desnaturalización a 94 °C durante 1 min, temperatura de alineamiento de 60 °C por 1 min, extensión a 72 °C durante 1 min, y una extensión final de 72 °C por 5 min. Los productos de la PCR obtenidos se enviaron a secuenciar a la empresa Psomagen, Inc. E.U.A. Las secuencias obtenidas se analizaron con el software BioEdit Sequence Alignment Editor, los resultados se compararon con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

Actividad quitinolítica de *Bacillus subtilis* F8 y K47

Se utilizó quitina coloidal al 10 % en medio mínimo como medio de inducción de acuerdo a lo reportado por Monreal y Reese (1969). Al sobrenadante obtenido se le determinó azúcares reductores liberados por el método de Miller (1959). Las proteínas se cuantificaron por el método Bradford (1976) con una curva estándar de albumina sérica bovina (BSA). La unidad de actividad enzimática específica (UQ) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar un micromol de N-acetilglucosamina, determinado como azúcares reductores, por mg de proteína en las condiciones de la reacción (Chávez y Cruz, 1984). Los valores se interpolan en una curva tipo N-acetilglucosamina (NAG).

Análisis estadístico

Los datos se sometieron a un diseño completamente al azar con un análisis de varianza y comparación de medias con la prueba de Tukey, (p≤0.05) en el programa estadístico InfoStat 2019.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antagonismo *in vitro* de *B. subtilis* sobre *C. cassicola*

B. subtilis cepa F8 y cepa K47 inhibieron el crecimiento micelial de *C. cassicola*, el mayor efecto se observó con *B. subtilis* F8 (62.2 %) en comparación con el testigo, no se detectó diferencia significativa entre las cepas de bacterianas. Ambas cepas (F8 y K47) disminuyeron un 79.4 % y 75.6 % el área de crecimiento fúngico de *C. cassicola* comparadas con el testigo. *B. subtilis* F8 mostró el porcentaje de inhibición mayor, siendo estadísticamente diferente a *B. subtilis* K47 y al testigo (Tabla 2).

Debido a la rápida proliferación de ambas bacterias se consume en menor tiempo los nutrientes presentes en el medio de cultivo, limitando los recursos necesarios para el crecimiento del hongo, por otra parte, ambas bacterias cubrieron mayores superficies, impidiendo la proliferación del patógeno y restringiendo su capacidad de expansión (Ghosh y Panja, 2021). En estudios previos, se reportó que *B. subtilis* F8 inhibió el crecimiento micelial un 63.8 % y 69.9 % de los patógenos *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani* (Mejía *et al.*, 2016).

Tabla 1. Iniciadores utilizados para la detección de genes de la biosíntesis de la surfactina
Table 1. Primers used for detection of surfactin biosynthesis genes

Gen	Iniciador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)	Tm (°C)	Referencia
<i>srf3</i>	SUR3F	ACAGTATGGAGGCATGGTC	441	60	Athukorala <i>et al.</i> , 2009
	SUR3R	TTCCGCCACTTTTCAGTTT			
<i>srfAA</i>	SRFAR	TCGGGACAGGAAGACATCAT	201	58	Mora <i>et al.</i> , 2011
	SRFAR	CCACTCAAACGGATAATCCTGA			

Tm: temperatura de alineamiento, pb: pares de bases del ADN.
Tm: Annealing temperature, pb: AND base pairs.

Tabla 2. Antagonismo *in vitro* de *Bacillus subtilis* contra *Corynespora cassiicola* a los 15 días de confrontación.

Table 2. *In vitro* antagonism of *Bacillus subtilis* against *Corynespora cassiicola* after 15 days of confrontation.

Tratamiento	Crecimiento micelial (cm)	Crecimiento fúngico (cm ²)	Inhibición (%)
Bs F8 + C.c.	2.15 ± 0.04 b	14.70 ± 0.36 c	72.96 ± 0.41 a
Bs K47 + C.c.	2.45 ± 0.08 b	17.48 ± 0.26 b	69.14 ± 1.01 b
C.c.	7.94 ± 0.11 a	71.60 ± 0.25 a	0 c
DMS	0.385	1.833	3.472

Los datos son expresados como media ± EE. Medias con diferente letra en columnas indican diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

Data are expressed as mean ± SE. Means with different letters in columns indicate significant differences (Tukey, $p \leq 0.05$).

Supresión de la mancha foliar usando esporas de *B. subtilis* en hojas desprendidas

En cuanto a las hojas desprendidas tratadas con esporas de *B. subtilis* F8 y K47, se observó una reducción de los síntomas de la mancha foliar causada por *C. cassiicola* (Figura 1), la inoculación con la cepa F8 redujo los síntomas de la enfermedad un 66.2 %, mientras que al ser tratadas con la cepa K47 se observó una reducción del 63.8 %, en comparación con el tratamiento infectado con *C. cassiicola* y sin tratar con esporas bacterianas (Figura 2).

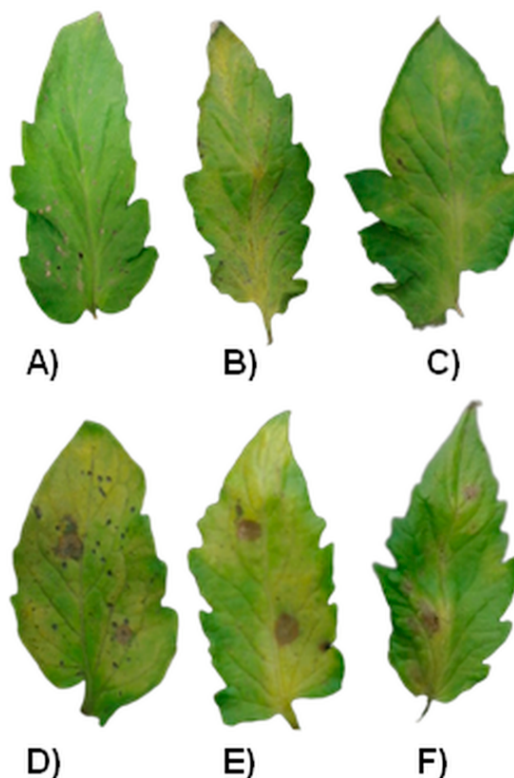


Figura 1. Síntomas de la enfermedad mancha foliar causada por *C. cassiicola* en hojas desprendidas de *S. lycopersicum* tratadas con esporas de *B. subtilis*. A) Testigo sin inoculación, B) *B. subtilis* F8, C) *B. subtilis* K47, D) *C. cassiicola*, E) *B. subtilis* F8 contra *C. cassiicola*, F) *B. subtilis* K47 contra *C. cassiicola*.

Figure 1. Symptoms of leaf spot disease caused by *C. cassiicola* on detached *S. lycopersicum* leaves treated with *B. subtilis* spores. A) Control without inoculation, B) *B. subtilis* F8, C) *B. subtilis* K47, D) *C. cassiicola*, E) *B. subtilis* F8 against *C. cassiicola*, F) *B. subtilis* K47 against *C. cassiicola*.

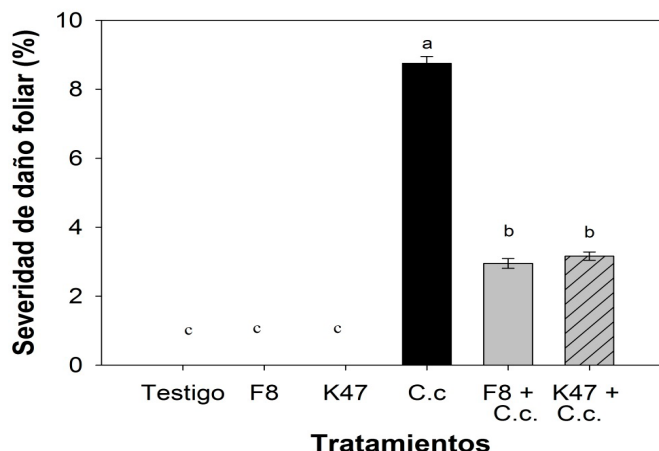


Figura 2. Porcentaje de severidad de *C. cassiicola* en hojas de *S. lycopersicum* tratadas con esporas de *Bacillus subtilis*. F8: *B. subtilis* F8, K47: *B. subtilis* K47, C.c: *C. cassiicola*. Los valores son medias ± EE; barras con literales idénticas son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 2. Percent severity of *C. cassiicola* on *S. lycopersicum* leaves treated with *Bacillus subtilis* spores. F8: *B. subtilis* F8, K47: *B. subtilis* K47, C.c: *C. cassiicola*. Values are means ± SE; bars with identical literals are statistically equal (Tukey, $p \leq 0.05$).

Supresión de la mancha foliar usando filtrado libre de células de *B. subtilis* en hojas desprendidas

En las hojas desprendidas tratadas con el filtrado libre de células de *B. subtilis* cepa F8 y cepa K47, se vio una reducción del área afectada por *C. cassiicola* (Figura 3), la inoculación con el filtrado de la cepa F8 redujo los síntomas de la enfermedad un 69.2 %, mientras que con el filtrado de la cepa K47 se observó una reducción del 76.6 %, en comparación con el tratamiento inoculado con *C. cassiicola* y sin tratar con filtrados libres de células bacterianas (Figura 4).

En el presente estudio *B. subtilis* cepa F8 y cepa K47 mostraron mantener la actividad antagónica *in vitro* reportada anteriormente contra otros fitopatógenos (Sosa *et al.*, 2016; Mejía *et al.*, 2019), esta actividad antifúngica se presentó en los bioensayos en hojas desprendidas, donde se observó una reducción del área afectada en los tratamientos inoculados con las bacterias, sin embargo, las hojas desprendidas mostraron mayor reducción en los síntomas de la enfermedad con el uso de filtrados libres de células, por lo que su acción antifúngica puede estar relacionado con la presencia de metabolitos secundarios y lipopéptidos cíclicos, algunas

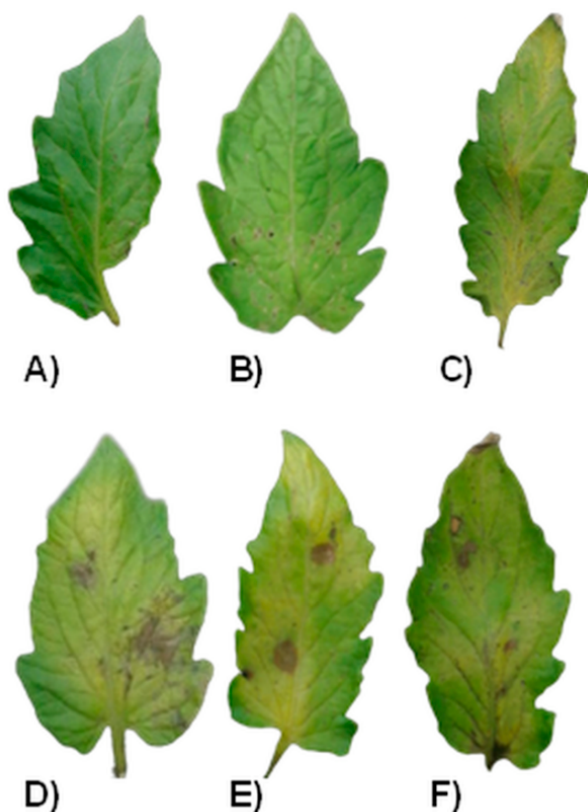


Figura 3. Síntomas de la enfermedad mancha foliar causada por *C. cassiicola* en hojas desprendidas de *S. lycopersicum* tratadas con filtrado libre de células de *B. subtilis*. A) Testigo sin inoculación, B) *B. subtilis* F8, C) *B. subtilis* K47, D) *C. cassiicola*, E) *B. subtilis* F8 contra *C. cassiicola*, F) *B. subtilis* K47 contra *C. cassiicola*.

Figure 3. Symptoms of leaf spot disease caused by *C. cassiicola* on detached *S. lycopersicum* leaves treated with *B. subtilis* cell-free filtrate. A) Control without inoculation, B) *B. subtilis* F8, C) *B. subtilis* K47, D) *C. cassiicola*, E) *B. subtilis* F8 against *C. cassiicola*, F) *B. subtilis* K47 against *C. cassiicola*.

bacterias tienen la capacidad de producir sustancias antimicrobianas que pueden interferir con la replicación celular o dañar las membranas celulares del hongo, sin embargo, no todas las cepas presentan los mismos potenciales (Barboza *et al.*, 2003; Becerra y Horna, 2016; Aydi *et al.*, 2015; Trupo *et al.*, 2023).

Detección de genes de la biosíntesis de surfactina

B. subtilis F8 y K47 produjeron por PCR amplicones de aproximadamente 200 y 440 pb, utilizando los iniciadores para los genes *srfAA* y *srf3* respectivamente. La secuenciación de los

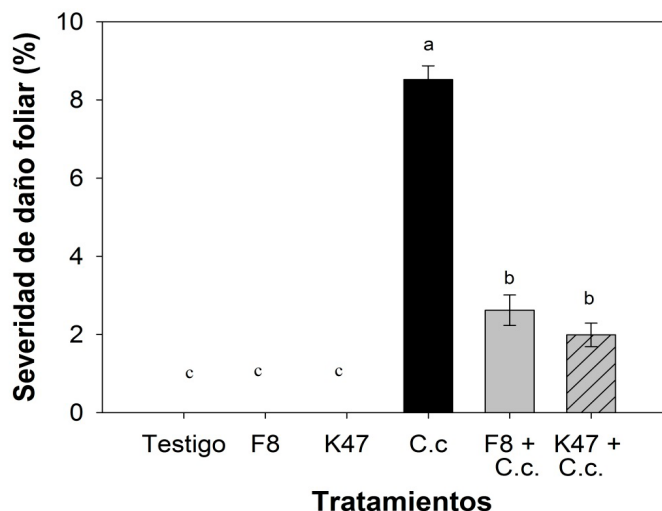


Figura 4. Porcentaje de severidad de *C. cassiicola* en hojas de *S. lycopersicum* tratadas con filtrado libre de células de *B. subtilis*. F8: *B. subtilis* F8, K47: *B. subtilis* K47, C.c: *C. cassiicola*. Los valores son medias \pm EE; barras con literales idénticas son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 4. Severity percentage of *C. cassiicola* on *S. lycopersicum* leaves treated with *Bacillus subtilis* cell-free filtrate. F8: *B. subtilis* F8, K47: *B. subtilis* K47, C.c: *C. cassiicola*. Values are means \pm SE; bars with identical literals are statistically equal (Tukey, $p \leq 0.05$).

fragmentos amplificados por la PCR permitió confirmar tres secuencias relacionadas con la biosíntesis de surfactina (Tabla 3). Para *B. subtilis* F8 se identificó el gen *SrfAD* que codifica para una tioesterasa y el gen *SrfAA* que codifica para la surfactina sintetasa, en el caso de *B. subtilis* K47 se identificó el gen *SrfAA*. Estos genes identificados en *B. subtilis* cepa F8 y cepa K47 pertenecen a la familia surfactina. Las surfactinas poseen actividades antifúngicas y su interacción con las membranas celulares de los microorganismos patógenos conduce a la desestabilización de la estructura y muerte celular, de igual forma puede secuestrar iones metálicos requeridos para el crecimiento y supervivencia de los hongos lo que lleva a la inhibición de su crecimiento, además, forma una capa protectora que interfiere en la adhesión de los hongos en la superficie, lo que limita su capacidad de colonizar y proliferar (Salek y Euston, 2019; Yang *et al.*, 2020; Dong *et al.*, 2022). Anteriormente Mejía *et al.* (2016) reportaron que *B. subtilis* F8 mostró presencia del gen *Srf3*, lo cual fue confirmada con las secuencias obtenidas (Tabla 3) de que dichos fragmentos corresponden a genes que codifican enzimas en la síntesis no ribosomal de surfactinas.

Tabla 3. Identificación de genes relacionados a la biosíntesis de surfactina.
Table 3. Identification of genes related to surfactin biosynthesis.

Cepa	Gen	Tamaño (pb)	Similitud con el GenBank (NCBI)		
			Proteína hipotética	Porcentaje de identidad	Accesión
F8	<i>srf3</i>	433	Tioesterasa de la biosíntesis de surfactina (<i>SrfAD</i>)	99.77	CP156029
F8	<i>srfAA</i>	202	Surfactina sintetasa (<i>SrfAA</i>)	100.0	CP051463
K47	<i>srfAA</i>	202	Surfactina sintetasa - péptido no ribosomal (<i>SrfAA</i>)	99.0	CP046448

pb: pares de bases del ADN.

pb: ADN base pairs.

Actividad biosurfactante de *Bacillus subtilis*

Se detectó que tanto *B. subtilis* F8 y K47 poseen la capacidad de formar de emulsión de 21.15 % y 21.48 % respectivamente, en comparación al testigo, sin embargo, no se detectó diferencias significativas entre los tratamientos bacterianos (Figura 5). Por otra parte Al-Mutar *et al.* (2023) reportaron que el filtrado libre de células bacterianas y el extracto de lipopeptido extracelular de *B. subtilis* DHA41 mostraron inhibir significativamente el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, *Didymella bryoniae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium graminearum* y *Rhizoctonia solani*. El extracto lipopeptídico demostró una actividad emulsionante además inhibió el crecimiento del micelio de *F. oxysporum* en un 86.4 % a 100 µg/ml. A través de observaciones en microscopio electrónico de transmisión se confirmó que el extracto de lipopeptidos alteraba la integridad celular de *F. oxysporum*.

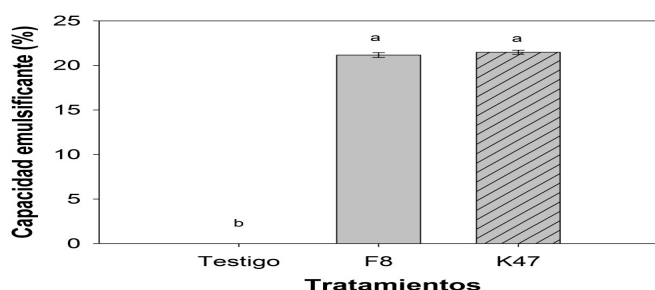


Figura 5. Porcentaje de la capacidad de emulsión de *Bacillus subtilis*. F8: *B. subtilis* F8, K47: *B. subtilis* K47. Los valores son medias \pm EE; barras con literales idénticas son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$).

Figure 5. Percentage of *Bacillus subtilis* emulsifying capacity. F8: *B. subtilis* F8, K47: *B. subtilis* K47. Values are means \pm SE; bars with identical literals are statistically equal (Tukey, $p \leq 0.05$).

Actividad quitinolítica de *Bacillus subtilis*

Ambas cepas de *B. subtilis* (F8 y K47) mostraron tener actividad enzimática con capacidad de degradar la quitina coloidal. La cepa K47 mostró tener mayor actividad quitinolítica específica (UQE) por proteína en la muestra (Tabla 4).

La actividad de la enzima quitinasa está involucrada en la degradación de la pared celular de los hongos, a través de la hidrólisis de los enlaces glucosídicos entre las unidades de N-acetilglucosamina en la quitina, el cual es el componente principal de la pared célula del hongo (Younes y Rinaudo, 2015; Philibert *et al.*, 2017), comprometiendo su crecimiento y desarrollo, lo que condujo directamente a la reducción de los síntomas de la enfermedad de la mancha foliar en las hojas desprendidas tratadas con filtrado libre de células bacterianas. Un estudio realizado por Arun *et al.* (2024) se clonó de *Bacillus aryabhatai* el gen quitinasa en el plásmido

Tabla 4. Actividad quitinolítica de *Bacillus subtilis* en medio líquido con quitina coloidal al 5%.

Table 4. Chitinolytic activity of *Bacillus subtilis* in liquid medium with 5% colloidal chitin.

	UQ ($\mu\text{M mL}^{-1}$)	UQE ($\mu\text{M mg}^{-1}$)
<i>B. subtilis</i> F8	0.027 \pm 0.013	0.165 \pm 0.049
<i>B. subtilis</i> K47	0.113 \pm 0.009	0.367 \pm 0.064

UQ: unidad quitinolítica, UQE: unidad quitinolítica específica.

pET 23a y se transfirió en *E. coli* Rosetta pLysS. La actividad quitinasa más alta en el polvo y las escamas de quitina insoluble alcanzó 875 U mg^{-1} y 625 U mg^{-1} respectivamente. La quitinasa demostró inhibición del crecimiento de *Candida albicans*, *Fusarium solani* y *Penicillium chrysogenum*.

CONCLUSIONES

Bacillus subtilis F8 y K47 son cepas quitinolíticas productoras de surfactantes que inhibieron el crecimiento micelial y disminuyeron el daño foliar ocasionado por *Corynespora cassicola*, por lo que presentan potencial prometedor como alternativa sustentable en el control de *C. cassicola* en el cultivo de tomate.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la SECINTI por la beca otorgada a A.M.P.C para realizar sus estudios de Doctorado. Proyecto financiado por TecNM (19306.24-P).

CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

REFERENCIAS

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*. 18: 265–267. <http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>.
- Al-Mutar, D.M.K., Noman, M., Alzawar, N.S.A., Qasim, H.H., Li, D. y Song, F. 2023. The extracellular lipopeptides and volatile organic compounds of *Bacillus subtilis* DHA41 display broad-spectrum antifungal activity against soil-borne phytopathogenic fungi. *Journal Fungi (Basilea)*. 28: 797. <https://doi.org/10.3390/jof9080797>.
- Arun, K.S., Ramachandra, R., Sachin, T., Vishnupriya, G., Piyush, V., Ritu, R. y Keyur, R. 2024. Engineering a recombinant chitinase from the marine bacterium *Bacillus aryabhatai* with targeted activity on insoluble crystalline chitin for chitin oligomer production. *International Journal of Biological Macromolecules*. 264: 130499. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.130499>.
- Athukorala, S. Dilantha, W.G. y Rashid, K.Y. 2009. Identification of antifungal antibiotics of *Bacillus* species isolated from different microhabitats using polymerase chain reaction and MALDI-TOF mass spectrometry. *Canadian Journal of Microbiology*. 55: 1021–1031.
- Aydi Ben Abdallah, R., Jabnoun-Khiareddine, H., Nefzi, A., Mokni-Tlili, S. y Daami-Remadi, M. 2015. Endophytic bacteria from *Datura stramonium* for *Fusarium* wilt suppression and tomato growth promotion. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*. 8: 30e41. DOI: 10.4172/1948-5948.1000259
- Aydi Ben Abdallah, R., Stedel, C., Garagounis, C., Nefzi, A., Jabnoun-Khiareddine, H., Papadopoulou, K.K. y Daami-Remadi, M. 2017. Involvement of lipopeptide antibiotics and chitinase genes and induction of host defense in suppression of *Fusarium* wilt by endophytic *Bacillus* spp. in tomato. *Crop Protection*. 99: 45–58. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.05.008>.
- Bañuelos, J.J. 2007. Evaluación destructiva de la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol (*Phaseolus*

- vulgaris* L.) Revista Mexicana de Fitopatología. 26: 71–75. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092008000100011.
- Barboza, J.E., Nieto E, Velazquez, R., Salcedo, R., Bautista, M. y Jimenez, B., Ibarra, J. 2003. Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. Applied and Environmental Microbiology. 69: 1023–1029. <https://DOI:10.1128/AEM.69.2.1023-1029.2003>.
- Becerra, L.K. y Horna, M.V. 2016. Aislamiento de microorganismos productores de biosurfactantes y lipasas a partir de efluentes residuales de camales y suelos contaminados con hidrocarburos. Scientia Agropecuaria. 7: 23–31. <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/scientiaagrop>.
- Bodour, A.A., Guerrero, C., Jiorle, B.V., Paull, A.K., Somogyi, A., Trinh, L.N., Bates, R.B. y Maier, R.M. 2004. Structure and characterization of favolipids, a novel class of biosurfactants produced by *Flavobacterium* sp. Strain MTN11. Applied and Environmental Microbiology. 70: 114–120. <https://doi:10.1128/AEM.70.1.114-120.2004>.
- Brzezinska, M.S., Kalwasińska, A., Świątczak, J., Żero, K. y Jankiewicz, U. 2020. Exploring the properties of chitinolytic *Bacillus* isolates for the pathogens biological control. Microbial Pathogenesis. 148: 104462. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104462>.
- Chávez, G.M. y Cruz, R. 1984. El sistema quitinolítico de *Serratia marcescens*. Revista Latinoamericana de Microbiología. 26: 203–215.
- De la Caridad, A.O., González, R., Díaz, F.R., Reyes, C., Gil, Y., Reyes, S. y Barroso, J. 2017. Aplicación del software ImageJ® 1.43u en la caracterización de los síntomas de la mancha anular de la caña de azúcar. Centro Agrícola. 44: 83–88. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-57852017000200011&lng=es&tlng=es.
- Dong, L., Wang, P., Zhao, W., Su, Z., Zhang, X., Lu, X., Li, S., Ma, P. y Guo, Q. 2022. Surfactin and fengycin contribute differentially to the biological activity of *Bacillus subtilis* NCD-2 against Cotton *Verticillium wilt*. Biological Control. 174: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.104999>.
- Gao, S., R. Zeng, Xu, L., Song, Z., Gao, P. y Dai, F. 2020. Genome sequence and spore germination-associated transcriptome analysis of *Corynespora cassiicola* from cucumber. BMC Microbiology. 20:199. <https://doi:10.1186/s12866-020-01873-w>.
- Ghosh, S.K. y Panja, A. 2021. Different mechanisms of signaling pathways for plant protection from diseases by fungi. In: Biocontrol Agents and Secondary Metabolites. Sudisha Jogaiyah. Woodhead Publishing (ed). pp 591–630. ISBN 9780128229194. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822919-4.00026-0>.
- Kalai-Grami, L., Saidi, S., Bachkouel, S., Ben Slimene, I., Mnari-Hattab, M., Hajlaoui, M.R. y Limam, F. 2014. Isolation and characterization of endophytic bacteria antagonistic to *Phoma tracheiphila* and *Verticillium albo-atrum*. Applied Biochemistry and Biotechnology. 174: 365e375.
- Kumar, K., Pal, G., Verma, A., Kumar, D., Shukla, P. y Verma, S. 2023. Seed vectored bacterial endophyte *Bacillus pumilus* protect sorghum (*Sorghum bicolor* L.) seedlings from a fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. Biological Control. 183: 105249. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105249>.
- Le quoc, D.U.Y. 2023. Evaluation of antifungal activity against *Corynespora cassiicola* by bacteria isolated from soil in the root zone of cucumber plants. Biodiversitas Journal of Biological Diversity. 24: 6584–6591. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d241220>.
- Leal, F., Voltolini, R., Velho, D., Gomes, G., Ritter, A., Mui, S. y Brandelli, A. 2015. Expression of essential genes for biosynthesis of antimicrobial peptides of *Bacillus* is modulated by inactivated cells of target microorganisms. Research in Microbiology. 1–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2015.10.005>.
- Mejía, M.A., Cristóbal, J., Tun, J.M. y Reyes, A. 2016. Actividad *in vitro* de *Bacillus* spp. en la inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani* aislado de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). Agrociencia, 50: 1123–1135. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S14051952016000801123&lng=es&tlng=es.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31: 426–428.
- Monreal, J. y Reese, E.T. 1969. The chitinase of *Serratia marcescens*. Canadian Journal Microbiology. 15: 689–696.
- Moo, F.A., Cristóbal, J., Tun, J.M., Medina, I.L., Arjona, A.A. y Gamboa M.M. 2022. Activity of aqueous extracts from native plants of the Yucatan peninsula against fungal pathogens of tomato *in vitro* and from croton chichenensis against *Corynespora cassiicola* on tomato. Plants. 11: 2821. <https://doi.org/10.3390/plants11212821>.
- Mora, I., Cabrefiga, J. y Montesinos, E. 2011. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments. International Microbiology. 14: 213–223. <https://DOI:10.2436/20.1501.01.151>.
- Ongena, M. y Philippe, J. 2008. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiology. 16:115–125. <https://doi:10.1016/j.tim.2007.12.009>.
- Parra, E., Bacab, I.M., Cristóbal, J., Tun J.M., y Ruiz, E. 2011. Patogenicidad de *Fusarium solani* (mart.) sacc. y *Alternaria alternata* (fries) keissler en *thevetia peruviana* (pers.) k. schum. y su control *in vitro*. Fitosanidad, 15: 231–236. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209123682005>.
- Philibert, T., Lee, B.H. y Fabien, N. 2017. Current status and new perspectives on chitin and chitosan as functional biopolymers. Applied Biochemistry and Biotechnology. <https://doi:10.1007/s12010-016-2286-2>.
- Rodas, BA., Quero, M., Magaña, HF. y Reyes, A. 2009. Selección de cepas nativas con actividad quitino-proteolítica de *Bacillus* sp. aislados de suelos tropicales. Revista Colombiana de Biotecnología. 11: 107–113.
- Safek, K. y Euston, S. R. 2019. Sustainable microbial biosurfactants and bioemulsifiers for commercial exploitation. Process Biochemistry. 85: 143–155. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.06.027>.
- Santovito, A., Gendusa, C., Ferraro, F., Musso, I., Costanzo M. y Piero, S.R. 2018. Genomic damage induced by the widely used fungicide chlorothalonil in peripheral human lymphocytes. Ecotoxicology and Environmental Safety. 161: 578–583 <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.047>.
- Sosa, M; Ruiz E.; Mejía, M.; Reyes, A., Cristóbal, J.; Valencia, A. y Gutiérrez, O. 2012. Actividad antagonista *in vitro* de aislados de la clase *bacilli* de la península de Yucatán contra cuatro hongos fitopatógenos. Universidad y Ciencia. 28: 279–284. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=15425102007>.



- Trupo, M., Magarelli, R.A., Martino, M., Larocca, V., Giorgianni, Á. y Ambrico, A. 2023. Crude lipopeptides from culture of *Bacillus subtilis* strain ET-1 against *Podosphaera xanthii* on *Cucumis melo*. *Journal of Natural Pesticide Research*. 4: 100032. <https://doi.org/10.1016/j.napere.2023.100032>.
- Yang, N., Wu, Q. y Xu, Y. 2020. Fe nanoparticles Enhanced Surfactin Production in *Bacillus amyloliquefaciens*. *ACS Omega*. 20: 6321–6329. <https://doi: 10.1021/acsomega.9b03648>.
- Younes, I. y Rinaudo, M. 2015. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Marine Drugs*. 2: 1133–1174. <https://doi:10.3390/md13031133>.
- Zhu, H., Wu, S., Tang, S., Xu, J., He, Y., Ren, Z. y Liu, E. 2023. Isolation, identification and characterization of biopotential cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* strain JN005 and its antifungal activity against rice pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Biological Control*. 182: 105241. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105241>.
- Zhu, J., Zhang, L., Li, T., Ma, D., Gao, Y., Mu, W. y Liu, F. 2018. Baseline sensitivity of *Corynespora cassiicola* to metconazole and efficacy of this fungicide. *Crop Protection*. 130: 105056. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219419304028>.