UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE GUANAJUATO

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Evaluación de cinco especies de *Lactobacillus* spp., como agentes biocontrol y actividad promotora del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum*)

TESIS

Que para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

Presenta

ING. FRANCISCO JAVIER YÉPEZ RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS

DRA. GABRIELA MEDINA RAMOS

6 de Abril de 2016 **Cortázar, Gto, México.**

Universidad Politécnica de Guanajuato

Maestría en Ciencias en Biotecnología Agroalimentaria

Evaluación de cinco especies de *Lactobacillus* spp., como agentes biocontrol y actividad promotora del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum*)

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biotecnología Agroalimentaria

Presenta:

Ing. Francisco Javier Yépez Ramírez

Dirigido Por:

Dra. Gabriela Medina Ramos

Comité de Tesis:

Dr. Gabriela Medina Ramos	_____
Director interno	Firma
Dr. Oscar Manuel Portilla Rivera	_____
Director externo	Firma
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	_____
Codirector	Firma
Dr. Lorenzo Jarquín Enríquez	_____
Codirector	Firma

Cortázar, Gto.

6 de Abril de 2016

México

Cortázar, Gto., a 6 de abril del 2016
Asunto: Impresión de tesis
Oficio No.: MCBA-010-2016

ING. FRANCISCO JAVIER YÉPEZ RAMÍREZ
NÚMERO DE MATRÍCULA 14019005
P R E S E N T E :

De acuerdo al reglamento en vigor y tomando en cuenta el dictamen emitido por el jurado que le fue asignado para la revisión de su documento de tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Biotecnología Agroalimentaria, se le informa que se ha AUTORIZADO LA IMPRESIÓN del trabajo titulado:

"Evaluación de cinco especies de *Lactobacillus* spp., como agentes biocontrol y actividad promotora del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum*)".

Sin más por el momento, me despido de Usted comentándole que este oficio firmado por los integrantes de su comité, debe ser incluido en el documento.

A T E N T A M E N T E

Dra. Gabriela Medina Ramos
Director Interno

Dr. Oscar Manuel Portilla Rivera
Director Externo

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
Codirector

Maestría en Ciencias en Biotecnología Agroalimentaria

Dr. Lorenzo Jarquín Enríquez
Codirector

Arturo Salinas Martínez
Coordinador MCBA

C.c.p. Archivo

DEDICATORIAS

A Dios por darme vida, salud y fortaleza

A mis Padres por el apoyo incondicional

A mi Familiares

A mis compañeros y amigos

AGRADECIMIENTOS

Primeramente a **DIOS**, por darme la oportunidad de afrontar este reto, que había preparado para mí.

A **MIS PADRES**, por su apoyo durante el tiempo que duro este proyecto.

A mis compañeros por el apoyo y complicidad, en estos dos años que compartimos, por los conocimientos que cada uno de ustedes me brindó en estos dos años. Muchas Gracias **MIGUEL**, **ROBERT** y **SUSY**.

Al **Dr. Oscar Manuel Portilla Rivera**, por los materiales, revisiones y conocimientos brindados.

A la **Dra. Gabriela Medina Ramos**, por los materiales, consejos, confianza, paciencia, tiempo y conocimientos relacionados en biología molecular y fitopatología que me compartió.

A mi comité de evaluación, por tomarse el tiempo de revisar mi documento y asistir a mi presentación.

Al grupo de investigadores de la Maestría en Biotecnología Agroalimentaria, por permitirme formar parte de esta primera generación y por los conocimientos brindados cada uno de ustedes.

Al **IPCYT** y su personal por donar la cepa *Clavibacter michiganensis* subs. *michiganensis*.

Al **INIFAP**, Celaya, Gto., por haber donar las cepas de *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici*.

A **CECYTEG**, Villagrán, por permitir desarrollar pruebas dentro del plantel, así como a sus laboratoristas, por la confianza, apoyo.

A la **Universidad Politécnica de Guanajuato y su personal** por brindar recursos y espacios para la realización del presente trabajo.

RESUMEN

El cultivo de tomate presenta condiciones favorables para promover enfermedades sistémicas como la marchitez vascular y el cáncer bacteriano causadas por *Fusarium oxysporum* y *Clavibacter michiganensis*, respectivamente. Estas enfermedades ocasionan cuantiosas pérdidas tanto por la reducción de la calidad del fruto como por la destrucción del cultivo. Con la finalidad de disminuir el uso de fungicidas y bactericidas como agentes control para las enfermedades, se ha investigado sobre el uso alterativo de agentes biocontrol como son hongos micorrízicos y bacterias nativas de la rizosfera, por ejemplo *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp., y bacterias del genero *Bacillus* y *Lactobacillae*. Por lo tanto, el objetivo evaluar del presente trabo es evaluar cinco especies de *Lactobacillus* spp., como agentes biocontrol contra *Fusarium oxysporum* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y la actividad promotora del crecimiento vegetal en tomate (*Solanum lycopersicum*).

Se llevaron a cabo tratamientos con distintas fracciones del medio de cultivo de las especies *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. coryniformis*, *L. helveticus* y *L. pentosus*. En pruebas *in vitro*, la reducción del área micelial de *F. oxysporum* fue de 15 – 95 %; la inhibición de *Cmm* usando la técnica de difusión de pozos fue de 48 – 62 %, y en medio liquido de 99.68 %.

En pruebas *in vivo*, la reducción del área micelial de *F. oxysporum* en hojas de tomate fue de 4.0 a 97.1 %, y la reducción de la severidad de infección por *Cmm* fue de 16.3 a 78.3 %. Además, en las plantas inoculadas con *L. bulgaricus*, *L. coryniformis*, *L. helveticus* y *L. pentosus* se observó una mejoría en la altura de planta (3.3 – 59.13 %), la longitud de raíz (35.2 – 75.3 %) y el peso seco de raíz (14.4 – 75.3 %). En las pruebas de actividad promotora del crecimiento vegetal, todas las especies de *Lactobacillus* mostraron acción benéfica sobre la germinación, al aumentar el índice de vigor (4.71 - 45.57 %).

Los resultados obtenidos demuestran el potencial de las especies de *Lactobacillus spp.* probadas como agentes biocontrol y promotoras de crecimiento vegetal en tomate.

Palabras clave: Bacterias ácido lácticas, Biocontrol, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Fusarium oxysporum*, Inhibición, *Lactobacillus*, tomate.

ABSTRACT

Tomato crop presents favorable conditions to foster systemic disease like tomato wilt and bacterial canker, caused by *Fusarium oxysporum* y *Clavibacter michiganensis*, respectively. These diseases cause considerably losses either by the reduction of the quality of fruits, or by the destruction of the crop.

In order to decrease the use of fungicides and bactericides as disease control agents, the use of alternative biocontrol agents such as mycorrhizal fungi and native rhizosphere bacteria like *Azotobacter* spp., *Azospirillum* spp., and bacteria of the genera *Bacillae* and *Lactobacillae* has been investigated. Therefore, the present work has the objective to evaluate five species of *Lactobacillus* spp., as biocontrol agents against *Fusarium oxysporum* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and the plant growth promoting activity in tomato (*Solanum lycopersicum*).

Treatments using different fractions of fermentation culture form the species *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. coryniformis*, *L. helveticus* and *L. pentosus* were carried out. In assays *in vitro*, the mycelial area reduction for *F. oxysporum* ranged from 15 – 95 %; the *Cmm* inhibition ranged from 48 to 68 % and 99.68 % using the agar diffusion holes and culture broth respectively. In assays *in vivo* the mycelial area reduction in tomato leaves ranged from 4.0 a 97.1 %, and the infection severity reduction ranged from 16.3 a 78.3 %. Besides, in plants inoculated with *L. bulgaricus*, *L. coryniformis*, *L. helveticus* y *L. pentosus* increases in plant height (3.3 – 59.13 %), root length (35.2 – 75.3 %), root dry weight (14.4 – 75.3 %) was observed. In tests of plant growth promoting activity, all species of *Lactobacillus* showed beneficial effect on germination, as they increased the vigor index (4.71 - 45.57 %).

The results obtained demonstrate the potential of the *Lactobacillus* species tested as biocontrol agents and plant growth promoter in tomato.

Keywords: Lactic acid bacteria, Biocontrol, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Fusarium oxysporum*, Inhibition, *Lactobacillus* spp., tomato.

ÍNDICE GENERAL

Página

RESUMEN

ABSTRACT

ÍNDICE GENERAL I

ÍNDICE DE TABLAS IV

ÍNDICE DE FIGURAS V

ÍNDICE DE ECUACIONES VIII

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN 1

1.1. Origen y descripción botánica del cultivo de tomate 1

1.2. Producción mundial, nacional y estatal de tomate 1

1.3. Enfermedades fitosanitarias 2

1.3.1. Marchitez vascular 3

1.3.2. Cáncer bacteriano 5

1.4. Control de enfermedades 6

1.4.1. Control químico 6

1.4.2. Control biológico 7

1.5. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) 8

1.5.1. Mecanismos de acción de las BPCV 8

1.6. Bacterias ácido lácticas (BAL) 10

1.7. Metabolismo de las bacterias ácido lácticas 10

1.7.1. Potencial antimicrobiano de bacterias ácido lácticas 11

1.7.2. Bacterias ácido lácticas promotoras del crecimiento vegetal 16

1.8. Justificación 18

1.9. Objetivos 19

1.9.1. Objetivo general 19

1.9.2. Objetivos específicos 19

CAPITULO II. METODOLOGÍA 20

2.1. Microorganismos y material vegetal 20

2.1.1. Bacterias ácido lácticas 20

2.1.2. *Fusarium oxysporum* 20
2.1.3. *Phytophthora capsici* 20
2.1.4. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 20
2.1.5. Material vegetal. 21
2.2. Cultivo y conservación de microorganismos 21
2.2.1. Bacterias ácido lácticas (BAL) 21
2.2.2. *Fusarium oxysporum* 21
2.2.3. *Phytophtora capsici* 22
2.2.4. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 22
2.3. Cinéticas de bacterias ácido lácticas 22
2.3.1. Cinética crecimiento de bacterias ácido lácticas 22
2.3.2. Cinética de consumo de glucosa 23
2.3.3. Cinética de producción de ácido láctico 23
2.4. Cinéticas de crecimiento de fitopatógenos 23
2.4.1. Cinética de crecimiento de *Fusarium oxysporum* 23
2.4.2. Cinética de crecimiento de *Phytophtora capsici* 24
2.4.3. Cinética de crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 24
2.5. Obtención y evaluación de los productos de fermentación ácido láctica 24
2.5.1. Medio de fermentación 24
2.5.2. Sobrenadante libre de células 26
2.5.3. Productos asociados a membrana 27
2.5.4. Biomasa 27
2.6. Pruebas de inhibición *in vitro* 28
2.6.1. Prueba *in vitro* sobre *Fusarium oxysporum* 28
2.6.2. Prueba *in vitro* sobre *Phytophtora capsici* 29
2.6.3. Pruebas *in vitro* sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) 29
2.7. Actividad biocontrol en tomate 31
2.7.1. Actividad biocontrol sobre *Fusarium oxysporum* 31
2.7.2. Actividad biocontrol sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 32

2.8. Actividad promotora del crecimiento vegetal 37
2.8.1. Actividad promotora en la germinación 37
2.8.2. Actividad promotora en plántula 39
2.9. Análisis de datos 40

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 41
3.1. Comportamiento cinético de las especies *Lactobacillus* spp. 41
3.2. Cinéticas de crecimiento de fitopatógenos 44
3.2.1. Cinética de crecimiento de *Fusarium oxysporum* 44
3.2.2. Cinética de crecimiento de *Phytophtora capsici* 45
3.2.3. Cinética de crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 46
3.3. Obtención y evaluación de los productos de fermentación ácido lácticas 47
3.4. Inhibición *in vitro* 49
3.4.1. Inhibición *in vitro* de *Fusarium oxysporum* 49
3.4.2. Inhibición *in vitro* de *Phytophtora capsici* 54
3.4.3. Inhibición *in vitro* de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 58
3.5. Actividad biocontrol en tomate 62
3.5.1. Actividad biocontrol sobre *Fusarium oxysporum* 62
3.5.2. Actividad biocontrol sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 66
3.6. Actividad promotora del crecimiento vegetal 78
3.6.1. Actividad promotora en la germinación 78
3.6.2. Actividad promotora del crecimiento vegetal en plántula 84

CAPITULO IV. CONCLUSIONES 90

RECOMENDACIONES 91
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 92
ANEXOS 105

ÍNDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Diseño de experimentos para la inhibición *in vitro* de fitopatógenos 29

Tabla 2. Diseño de experimentos para la prueba bicontrol de *Fusarium Oxysporum* 32

Tabla 3. Escala de severidad después de la inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) 36

Tabla 4. Diseño de experimentos planteado para la prueba de biocontrol de *Cmm* 37

Tabla 5. Diseño de experimentos para la actividad promotora del crecimiento vegetal en la germinación 39

Tabla 6. Resultados de ácido láctico, biomasa y glucosa residual, en el máximo de crecimiento de las especies *Lactobacillus* spp., en el cultivo de preinóculo 43

Tabla 7. Resultados de ácido láctico, biomasa y glucosa residual, en el máximo de crecimiento de las especies *Lactobacillus* spp., en el cultivo de inóculo 43

Tabla 8. Resultados de la evaluación de los cuatro productos de las fermentaciones, producidos por las especies *Lactobacillus* spp. 48

Tabla 9. Características macroscópicas del micelio de *Fusarium oxysporum*, en la prueba de inhibición *in vitro* 52

Tabla 10. Actividad de biocontrol de *Fusarium oxysporum* por los productos de las fermentaciones ácido lácticas en hojas de tomate 65

Tabla 11. Actividad biocontrol de los productos de las fermentaciones ácido lácticas de las especies *Lactobacillus* spp. 68

Tabla 12. Comparación de la actividad biocontrol 69

Tabla 13. Control químico y biológico de *Cmm* 70

Tabla 14. Incidencia *Cmm* en pruebas de control químico y biológico 71

Tabla 15. Efecto en la germinación de semillas de tomate *saladette* 78

Tabla 16. Resumen de la actividad promotora del crecimiento en la germinación 82

Tabla 17. Comparativo del efecto de bacterias ácido lácticas en la germinación de semillas 83

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Dispersión del inóculo de *Cmm* en placas de agar 30

Figura 2. Plantas de tomate utilizadas en la prueba biocontrol 33

Figura 3. Biomasa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cepa IFO 34

Figura 4. Inoculación de la suspensión celular de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* 35

Figura 5. Cinéticas de crecimiento para el preinóculo de bacterias ácido lácticas 41

Figura 6. Cinéticas de crecimiento para el inóculo de bacterias ácido lácticas 42

Figura 7. Cinética de desarrollo de área micelial de *Fusarium oxysporum* 45

Figura 8. Morfología micelial de *Fusarium oxysporum* 45

Figura 9. Cinética de crecimiento de *Phytophthora capsici* 46

Figura 10. Vista macroscópica de *Phytophtora capsici* 46

Figura 11. Cinética de crecimiento de *Cmm* (Peso seco) 47

Figura 12. Cinéticas de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en medio sólido en pruebas *in vitro* 50

Figura 13. Porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum* 51

Figura 14. Efecto de los productos de las fermentaciones ácido lácticas, en el crecimiento de *Phytophtora capsici* 55

Figura 15. Inhibición del crecimiento de *Phytophtora capsici* utilizando los productos de las fermentaciones ácido lácticas 56

Figura 16. Halos de inhibición de *Cmm* por los productos de fermentación ácido láctica 58

Figura 17. Porcentaje de inhibición *in vitro* de los productos de las fermentaciones lácticas de las especies *Lactobacillus* spp., contra *Cmm* cepa IFO 59

Figura 18. Inhibición de *Cmm* en medio líquido, por los medios de fermentación de las especies *Lactobacillus* spp. 60

Figura 19. Inhibición de *Cmm* en medio líquido, por las suspensiones de células de *Lactobacillus* spp. 61

Figura 20. Actividad biocontrol de los productos de las fermentaciones sobre el crecimiento de *F. oxysporum* en hojas de tomate *saladette* 63
Figura 21. Análisis DAS-ELISA, como indicativo de la detección de *Cmm* 66
Figura 22. Efecto de los medios de fermentaciones ácido lácticas de las especies *Lactobacillus* spp. en plantas de tomate *cherry* infectadas con *Cmm* 72
Figura 23. Efecto de las suspensiones celulares de las especies *Lactobacillus* spp. en plantas de tomate *cherry* infectadas con *Cmm*. 72
Figura 24. Plantas control de infección de *Cmm* 73
Figura 25. Aspecto de las raíces de tomate *cherry* infectadas con *Cmm* e inoculadas con los medios de fermentación de las especies *Lactobacillus* spp. 73
Figura 26. Aspecto de raíces de tomate *cherry* infectadas con *Cmm* e inoculadas con las suspensiones celulares *Lactobacillus* spp. 74
Figura 27. Aspecto de las raíces de las plantas control 74
Figura 28. Estudio fisiológico de la prueba biocontrol 75
Figura 29. Actividad promotora de los productos de las fermentaciones ácido lácticas en la germinación de semillas de tomate 79
Figura 30. Plántulas inoculadas con los medios de fermentación ácido láctica de las especies *Lactobacillus* spp. 80
Figura 31. Plántulas inoculadas con los sobrenadantes libres de células de las especies *Lactobacillus* spp. 80
Figura 32. Plántulas inoculadas con los productos de membrana de las especies *Lactobacillus* spp. 81
Figura 33. Plántulas inoculadas con las suspensiones celulares de las especies *Lactobacillus* spp. 81
Figura 34. Efecto promotor de los productos de las fermentaciones ácido lácticas en plantas de tomate *cherry* 84
Figura 35. Efecto en plantas de tomate por los medios de fermentación de las especies *Lactobacillus* spp. 85
Figura 36. Efecto en plantas de tomate por las suspensiones celulares de *Lactobacillus* spp. 85

Figura 37. Efecto de los medios de fermentación láctica en la densidad radicular 86
Figura 38. Efecto de las suspensiones celulares sobre la densidad radicular de plantas de tomate 86
Figura 39. Porcentaje de actividad promotora del crecimiento vegetal de los productos de las fermentaciones acido lácticas en plantas de tomate *cherry* 88
Figura 40. Curva de calibración para la cuantificación de ácido láctico 107
Figura 41. Curva de calibración para la determinación de indoles totales 109
Figura 42. Determinación de indoles totales en los medios de fermentaciones 109
Figura 43. Determinación de indoles totales en los sobrenadantes libres de células 109
Figura 44. Curva de calibración para la cuantificación de glucosa 111

ÍNDICE DE ECUACIONES

Página

Ecuación 1. Determinación de área micelial 28

Ecuación 2. Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición 28

Ecuación 3. Fórmula para calcular el porcentaje de inhibición de *Cmm* 31

Ecuación 4. Relación para la determinación de la actividad biocontrol de *Cmm*, en plantas de tomate *cherry* 36

Ecuación 5. Fórmula para determinar el índice de vigor en la germinación 39

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

1.1. Origen y descripción botánica del cultivo de tomate

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es originario de América del sur (Jaramillo *et al*., 2006), pertenece a la familia de las solanáceas, la planta puede presentar dos hábitos de crecimiento: determinado e indeterminado. En el indeterminado, la planta alcanza más de 2 m de altura y se caracteriza por tener un crecimiento extensivo, desordenado y sin límite. En el crecimiento determinado la planta tiene tallos con segmentos que presentan progresivamente menos hojas y terminan en una sola inflorescencia, lo que resulta en un crecimiento limitado, alcanzando una altura por encima de 1 m pero menor a 2 metros (Escalona *et al*., 2009).

1.2. Producción mundial, nacional y estatal de tomate

En el 2015, la producción de tomate a nivel mundial fue encabezada por China con una producción de 50, 000, 000 toneladas métricas (MT), seguida por India 17, 500, 000 MT y Estados Unidos de Norte América con 13, 206, 950 MT, mientras que México se situó en el décimo lugar con una producción de 3, 433, 567 MT (FAOSTAT, 2016).

Por su parte México entre el 2006 y 2010 el volumen de producción de las hortalizas creció 8.6 por ciento, en comparación con el promedio del lapso 2000 - 2005, con un valor promedio anual de 38 mil millones de pesos (SAGARPA, 2012).

De las 23, 482.92 hectáreas de producción bajo agricultura protegida reportadas por la SAGARPA (2016), se estima que 5, 223.30 ha, corresponden a la producción en invernadero, mientras que el resto a malla sombra y macro túnel. De estos datos el 52.75 % de la superficie de agricultura protegida, se ubica en Sinaloa, Baja California, Baja California Sur y Jalisco. En cuestión de la diversidad de cultivos, el 39.4 % de la producción bajo condiciones protegidas corresponde a tomate, el resto de la producción incluye cultivos como pimiento, pepino y se observa cierta diversificación de cultivos tales como papaya, fresa, arándano, calabacín, chile habanero, flores y plantas aromáticas, etc.

Por otro lado en la República Mexicana, se produce tomate durante todo el año, durante los primeros meses del año, que es cuando se genera el tope de producción nacional de 2, 875, 304.08 ton. En lo estatal la producción en invernadero de tomate para el 2012 en Guanajuato presentó una producción 40, 913.5 ton representando un valor de producción de 121, 607.28 Miles de pesos; esta producción se encontró distribuida en 246 hectáreas, de las cuales 25.5 % de la superficie se encuentra en el municipio de Pénjamo, el 11.8 % se encontró en Dolores Hidalgo y Salamanca participaba con 8.9 % (SIAP, 2016).

1.3. Enfermedades fitosanitarias

El cultivo de tomate presenta problemas fitosanitarios asociados a la plántula, follaje, tallos y frutos. El control de enfermedades se basa fundamentalmente en el uso de fungicidas o bactericidas del tipo órgano-sintéticos (Álvarez, 2012).

Una de las problemáticas que afecta la producción de tomate en México es el manejo inadecuado del control de plagas y enfermedades, no solo por aumentar los costos de producción, sino también porque se puede llegar a generar cierta resistencia a los productos químicos por parte de las plagas; esto se agrava por el inadecuado uso de agroquímicos y la falta de laborales culturales que son necesarias para el cultivo (COFUPRO, 2012).

Las enfermedades bióticas son un factor condicionante en la producción de tomate en muchas partes del mundo, más aun cuando no se utilizan cultivares con resistencia a ellas. Durante el ciclo de producción del tomate se pueden presentar diversas enfermedades con diferentes causas y etiologías. Para el control de enfermedades se utilizan cultivares resistentes, así como medidas de exclusión, erradicación y protección, en el contexto de un programa de control integrado (Gómez *et al*., 2011); mientras que en el caso del control químico de enfermedades se incluyen compuestos de cobre y manzeb, productos eficientes contra posibles infecciones de hongos y Acibenzolar-S-methyl un bactericida ampliamente utilizado (Paret *et al*., 2012)

Asociados a los problemas fitosanitarios, que ocasionan pérdidas cualitativas y cuantitativas en la producción del tomate, dichas enfermedades pueden ser originadas por hongos, bacterias, virus y fitoplasmas, en algunos casos las fitopatologías pueden ser confundidas con alteraciones fisiológicas producidas por factores ambientales, nutricionales y de manejo de cultivo, entre otros (Sosa, 2013).

Actualmente se conocen alrededor de 58 enfermedades, de causas y etiologías diferentes que atacan a este cultivo. Entre estos, destacan por su importancia los hongos fitopatógenos, los cuales presentan una gran variación morfológica, patogénica y adaptación a diversas condiciones climáticas, por lo que tienen la capacidad de atacar en etapas especificas del desarrollo del cultivo (Fernández *et al.*, 2013).

En los sistemas de producción hortícola, se tienen condiciones favorables para muchas enfermedades entre las que destacan las ocasionadas por hongos que afectan a las raíces, como *Fusarium oxysporum* y *Fusarium radicis-lycopersici*, los cuales causan síntomas de decoloración y marchitez; además de hongos hay otros patógenos causantes de síntomas similares a los anteriores como son las bacterias que han adquirido gran importancia para el cultivo de tomate, destacando *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* que en años recientes ha causado pérdidas de gran importancia económica debido a su capacidad de destrucción, la carencia de variedades resistentes (Tlatilpa, 2010).

1.3.1. Marchitez vascular

La marchitez vascular producida por *Fusarium oxysporum* es la principal enfermedad causada por hongos, disminuye hasta un 60 % el rendimiento y afecta la calidad del producto (Álvarez *et al*., 2008). Las especies de *Fusarium* spp., causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección que consiste en penetrar por la raíz y la posterior colonización del sistema vascular (González *et al*., 2012).

La marchitez vascular causada por *Fusarium oxysporum*, destaca como una de las principales limitantes de la producción del tomate, debido a su potencial destructivo. La enfermedad se encuentra distribuida en todo el mundo, el primer reporte de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici* en México se realizó en 1996 a partir de una de las plantas de tomate colectadas en Sinaloa (Gómez, 2010).

La enfermedad consiste en una típica marchitez, que inicia con un amarillamiento ascendente del follaje, las hojas más viejas pueden mostrar el amarillamiento en la mitad de los foliolos, que al avanzar los cubre por completo, las hojas y ramas invadidas se deshidratan, se marchitan y mueren, las plantas se tornan de color café cuya necrosis interna se extiende a lo largo de los tallos hasta las ramas superiores. En condiciones de campo los síntomas se inician en plena floración y se intensifican durante la producción de frutos. La enfermedad permite que haya producción pero a corta el ciclo productivo de las plantas, la producción se reduce y la calidad del fruto es afectada (Sánchez, 2007).

Cuando el suelo es inhabitable, *Fusarium oxysporum* puede sobrevivir por periodos prologados en ausencia del hospedero, formando clamidosporas. La proximidad a raíces induce la germinación y la infección inicial. Después de la germinación la hifa infectiva se adhiere a las raíces y las penetra directamente. El micelio avanza intracelularmente, a través del córtex radicular hasta encontrar los vasos del xilema, en este punto el hongo inicia el proceso de infección, durante el cual utiliza los vasos del xilema para colonizar al hospedero, esto se realiza acompañado de la producción de microconidias, las cuales son traslocadas flujo hacia arriba y posteriormente producirán micelio. El síntoma característico de marchitez aparece como resultado del estrés severo por la falta de agua, por obstrucción de los vasos, dicha marchitez también es causada por la combinación de patógenos, la acumulación de micelio y/o toxinas, las respuestas del hospedero por la producción de geles, gomas tialosas y la disrupción de células del parénquima (Di Pietro *et al*., 2003).

Además de afectar de manera individual *Fusarium oxysporum*, también es uno de los microorganismos relacionados a otras enfermedades de gran importancia económica, como lo es la marchitez del chile o secadera. En este patosistema además de *F. oxysporum*, se encuentran presentes otros hongos como *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora capsici*, que se encuentran en diferentes proporciones (43 %, 37 % y 4 %, respectivamente), cumpliendo cada uno de ellos un papel clave en la generación y desarrollo de la enfermedad (Anaya *et al*., 2011).

1.3.2. Cáncer bacteriano

Otra enfermedad que afecta al cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*) es el cáncer bacteriano. Está considerado como una enfermedad poco frecuente, pero severa y de gran importancia económica. El agente causal es conocido como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente que se ha dispersado en el mundo y ha causado pérdidas serias en las cosechas de tomate en invernadero y en cielo abierto, causando la muerte de plantas jóvenes y reduciendo la producción comercial. La reducción en la producción está asociada a la muerte de la planta o al rendimiento debido a que el tamaño del fruto es pequeño y de baja calidad (Borboa *et al*., 2009).

En Ontario, Canadá se registraron reducciones de la producción hasta del 20 %, en Francia de 20 a 30 %, en Illinois, EE.UU del 46 % y 10 % en Australia por la presencia de *Clavibacter michiganensis* (Borboa *et al*., 2009).

Dentro del territorio mexicano, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ha ocasionado pérdidas económicas estimadas en más de 40 millones de dólares, tan solo en el estado de Sinaloa (Lara *et al*., 2012).

La infección por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) se disemina a través de los vasos del xilema e induce síntomas sistémicos, incluyendo la marchitez, necrosis, decoloración vascular y muerte de la planta (Yim *et al*., 2012).

Cuando el suelo está contaminado por *Cmm*, la bacteria entra en la planta por heridas en raíces o tallo y de esta manera ingresa al xilema, por lo que favorece la colonización masiva. La marchitez unilateral de las hojas es el primer síntoma de la enfermedad, después se observa la marchitez de los márgenes de las hojas y las lesiones de cáncer se desarrollarán en el tallo y por último la planta muere. Si la infección ocurre en un estado tardío de la planta, ésta puede sobrevivir y generar frutos, pero los frutos infectados pueden tener manchas llamadas “ojo de pájaro” y contendrán semilla infectada por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Gatermann *et al*., 2003).

Otra forma de infección por *Cmm* es cuando la bacteria está presente en la semilla, que después de germinar, la bacteria penetrará los tejidos vasculares y posteriormente el marchitamiento de foliolos será evidente. Después se harán notar estrías necróticas desde la parte inferior del peciolo hasta el punto que se une con el tallo, debido a la colonización del sistema vascular (Borboa *et al*., 2009).

1.4. Control de enfermedades

Los métodos de control de enfermedades varían entre ellos, las consideraciones van desde el tipo de enfermedad, el patógeno, el hospedante y la interacción que se establece entre los dos. Los distintos métodos de control pueden clasificarse como culturales, biológicos físicos y químicos, dependiendo de la naturaleza de los agentes que se utilicen para controlar las enfermedades. La mayoría de las prácticas culturales y métodos de control evitan que las plantas entren en contacto con el patógeno y permiten erradicar o reducir la abundancia del patógeno en las plantas (Agrios, 2005).

1.4.1. Control químico.

En el caso de agentes fitopatógenos presentes en el suelo (como bacterias, nematodos, virus y hongos como *Fusarium oxysporum*), una de las estrategias empleadas es la solarización, consistiendo en el aprovechamiento del calor emitido por el sol, para obtener temperaturas letales para microorganismos presentes junto con la aplicación de fungicidas o bactericidas (Haggag *et al*., 2015).

Este tratamiento químico al suelo comprende la aplicación de compuestos para el control de nematodos y en ocasionalmente específicos para *Fusarium* spp. y *Verticillium* spp., y bacterias. Entre los fungicidas aplicados se encuentran metalaxyl, diazoben, pentacloronitrobenceno (PCNB), captan y cloroneb (Agrios, 2005); mientras que para el control de bacterias como *Cmm* no hay un control químico o métodos disponibles para que sea controlada eficazmente, además de que no hay cultivares resistentes o con un nivel aceptable de tolerancia a la infección (EFSA, 2014); por ende las prácticas utilizadas para evitar la enfermedad del cáncer bacteriano, son el uso de semilla libre de *Cmm* y cultivo por exclusión (Johnson y Walcott, 2012) y labores culturales, prácticas de sanitización, aplicación de compuestos de cobre, extractos naturales (Li *et al*., 2013).

Pero en ocasiones el control químico de las enfermedades no es satisfactorio, ya que generalmente la enfermedad no solo está controlada por la fumigación al suelo antes de la siembra, sino por cuestiones como el costo que presentan los productos, el efecto de las sustancias aplicadas sobre la salud humana, la seguridad respecto a la aplicación, los riesgos ambientales que conlleva y la alta probabilidad de la aparición de resistencia a los productos por parte de los patógenos y/o la ruptura o la neutralización de la resistencia del huésped, son algunos de los factores en contra el control químico de enfermedades en los cultivos (Ajilogba y Babalola, 2013).

1.4.2. Control biológico

Una opción ante los argumentos, que conlleva la aplicación de pesticidas sintéticos para el control de enfermedades, ha sido la aplicación de rizobacterias que colonicen las raíces del cultivo y que supriman las enfermedades, volviéndose una alternativa frente al uso de compuestos químicos (Labuschagne *et al*., 2010). Este hecho se basa en que existen antagonistas naturales contra varios fitopatógenos, que están en convivencia con la planta. Esta interacción entre los microorganismos y la planta llegan a ser complejos, entre los mecanismos de biocontrol incluyen la antibiosis, la competencia y la inducción de resistencia en el hospedero (McSpandden y Fravel, 2002).

Este biocontrol incluye la supresión de la enfermedad y proveer salud a la planta. La supresión de la enfermedad por agentes biocontrol es una manifestación sustentada en las interacciones entre la planta, el fitopatógeno, el agente biocontrol, la comunidad microbiana alrededor de la planta y el ambiente. El biocontrol de enfermedades es complejo puesto que las enfermedades ocurren junto con una dinámica ambiental entre la interface de la raíz y suelo (rizosfera), zona que comprende la región cercana a la raíz y es afectada por la misma (Handelsman y Stabb, 1996).

1.5. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV)

Ante la afirmación por la presencia de antagonistas naturales, también existen microorganismos con efecto benéfico sobre las plantas, los cuales tienen un potencial considerable como biofertilizantes y como agentes biocontrol, estos microorganismos pueden clasificarse en tres grandes grupos: microorganismos fijadores de nitrógeno, hongos micorrízicos y rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*). Estas últimas son bacterias de vida libre del suelo que se localizan muy cerca de las raíces de las plantas y que tienen un efecto benéfico sobre el crecimiento de las mismas (Rico, 2009).

Los microorganismos promotores del crecimiento vegetal desempeñan un papel clave en la toma de nutrientes, la tolerancia a estrés ambiental y al mantenimiento de la salud radicular, favoreciendo así el aumento del rendimiento de los cultivos (Rives *et al.*, 2007). Es bien conocido que un número considerable de bacterias que están asociadas a la rizosfera de las plantas, son capaces de ejercer un efecto benéfico sobre su crecimiento. Entre estos grupos de bacterias podemos nombrar las del género *Azospirillum, Burkholderia, Bacillus, Enterobacter, Rhizobium, Serratia, Alcaligenes, Arthrobacter, Acinetobacter* y *Flavobacterium* (Rodríguez y Fraga, 1999).

1.5.1. Mecanismos de acción de las BPCV

La acción de las bacterias promotoras del crecimiento presentan diferentes mecanismos como la fijación de nitrógeno, producción de sideróforos, precursores de fitohormonas, antibióticos, sustancias de actividad antimicrobiana, etc., por esta razón, el estudio de las rizobacterias (PGRP) es considerado como una alternativa de mitigación a los problemas de contaminación del suelo (Camelo *et al*., 2011; Ahemad y Kribet, 2013).

Los mecanismos para el bicontrol son divididos en dos categorías (Ahemad y Kribet, 2013), entre los mecanismos directos esta la fijación del nitrógeno, donde se aprovecha la abundancia del nitrógeno en la atmosfera (80 %) y que posteriormente es reducido a amoniaco y ser metabolizado por la planta (Glick, 2015), además de aprovechar que el 90 % del nitrógeno orgánico presente en el suelo se encuentra en una forma orgánica y su ciclo biogeoquímico, es manejado únicamente por microorganismos (Pii *et al*., 2015).

Otro de los mecanismos directos, es la producción de fitohormonas, como el ácido indol acético (AIA), la auxina natural más común y que tiene efecto benéfico sobre el crecimiento de la planta. Varias rizobacterias que colonizan semillas o raíces, producen AIA, lo cual estimula la división, extensión y diferenciación celular, además de provocar la germinación, incrementar la velocidad de desarrollo del xilema y raíces, controlar procesos como la formación de raíces secundarias, mediar las respuestas a la luz, la biosíntesis de varios metabolitos y la resistencia bajo condiciones de estrés (Kumar, 2016). Otro de los mecanismos directos es la capacidad de producción de compuestos de bajo peso molecular denominados sideróforos, que tienen la función de capturar el hierro del suelo, estos compuestos solubilizan específicamente al hierro y lo incorporan al metabolismo celular de la planta (considerados como ligantes del hierro), los cuales reaccionan con el hierro al unirse de manera covalente (Ahemad y Kribet, 2013).

La siguiente categoría son los mecanismos indirectos entre los que podemos mencionar la producción de metabolitos para la antibiosis de patógenos, ya que algunas bacterias pueden producir una amplia variedad de componentes con actividad antimicrobiana, como antibióticos, ácido láctico, otros ácidos orgánicos, lisozimas y bacteriocinas. Estas últimas junto con los antibióticos y los sideróforos son los compuestos más efectivos en la acción antagónica contra fitopatógenos (Beneduzi *et al*., 2012), además de producir componentes como biosurfactantes, que han sido utilizados para aumentar la calidad del suelo y que además presentan actividad antimicrobiana (Sachdev y Cameotra, 2013).

Otro mecanismo indirecto y de suma importancia es la activación o estimulación de la resistencia sistémica estimulada por BPCV, por la activación y señalización de las rutas del ácido salicílico que es activada y señalizada, por proteínas PR (proteínas relacionadas a la patogénesis), o la del ácido jasmónico y el etileno (Gamalero y Glick, 2011; Compant *et al*., 2005). Dicha activación es debida a la colonización del sistema radicular por las BPCV o por moléculas constituyentes de la célula bacteriana o inclusive por productos que actúan como elicitores de señales bioquímicas (Figueiredo *et al*., 2010).

1.6. Bacterias ácido lácticas (BAL)

El término “bacteria ácido láctica” surgió en los años 1975, actualmente esta denominación se refiere a bacterias Gram positivas, no esporuladas, microaerofilas, que durante la fermentación de carbohidratos el principal producto es el lactato. Se incluyen en este grupo de bacterias a los cocos (*Streptoccos*, *Pediococcus* y *Leuconostoc*) y bacilos entre los bacilos se agrupa a *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* (Kandler, 1983).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido empleadas alrededor del mundo, para preservar o modificar características sensoriales y nutricionales de alimentos lácteos y vegetales mediante la fermentación ácido láctica, la cual implica la acidificación del ambiente, la formación de *flavors*, la modificación de la viscosidad del medio, además de proteger el ambiente de la proliferación y esporulación de patógenos (Ruas *et al*., 2002).

1.7. Metabolismo de bacterias ácido lácticas

La oxidación de azúcares constituye la principal ruta de producción de energía. Esta energía es esencial para el crecimiento bacteriano, en el caso concreto de las bacterias ácido lácticas la fermentación es la ruta de asimilación de azucares, donde factores como pH, oxigeno, etc., modifican el rendimiento energético y del producto final (Ribéreau *et al*., 2006). A partir de la degradación de la lactosa, las bacterias lácticas se clasifican en homofermentativas (producen sólo ácido láctico) y heterofermentativa (producen ácido láctico y otras sustancias).

Donde el grupo homofermentativo compuesto por *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, utilizan la ruta Embden-Meyerhoff-Parnas para convertir un mol de glucosa en dos moles de ácido láctico, además producen más del 85 % de ácido láctico a partir de la glucosa. Mientras las del grupo heterofermentativo producen solamente 50 % de ácido láctico, fermentan un mol de glucosa para formar un mol de ácido láctico, un mol de etanol y un mol de dióxido de carbono, este grupo incluye los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* (Parra, 2010).

Las bacterias lácticas producen una serie de sustancias con actividad inhibitoria, entre ellas se encuentran, el ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico, acetoína, diacetilo, alcoholes, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y antibióticos, además de desviar una parte de azucares para la formación de exopolisacáridos (Concha, 2008 y Parra, 2010).

1.7.1. Potencial antimicrobiano de bacterias ácido lácticas

Durante el proceso de fermentación, las bacterias lácticas además de provocar la reducción del pH y la conversión de azucares a ácidos orgánicos, estas bacterias realizan dichas acciones para proteger a los alimentos, sin embargo las bacterias ácido lácticas simultáneamente a la producción de ácidos orgánicos elaboran otros metabolitos que favorecen a la preservación de alimentos (Šušković *et al*., 2010).

El ácido láctico es uno de los agentes inhibitorios producidos por estas bacterias, la acumulación de éste y otros ácidos orgánicos, en combinación con un descenso del pH, da como resultado la inhibición de un amplio espectro de bacterias Gram positivo y negativo, por la interrupción de funciones metabólicas, en aquellas bacterias en las cuales han llegado a penetrar, por la generación de un gradiente electrostático que la célula es incapaz de contrarrestar (De Vuyst y Vandamme, 1994).

En el caso del dióxido de carbono, el principal producto por la fermentación de hexosas, por BAL heterofermentativas (incluyendo algunas homofermentativas), la acumulación del gas produce un ambiente anaerobio por el desplazamiento del oxígeno molecular y a su vez produce un descenso del pH extracelular, provocando afectaciones al entorpecer rutas metabólicas, fenómeno parecido al del ácido láctico (De Vuyst y Vandamme, 1994).

Otros productos antimicrobianos es el ácido acético, que es formado por BAL heterofermentativas en presencia de aceptores de electrones y que en condiciones contrarias el ácido propiónico es producido, ambos ácidos interactúan con membranas celulares para neutralizar el gradiente de protones. El ácido propiónico reduce el crecimiento de hongos y en valores de pH cercanos a 4.5, son afectadas las membranas, en lo particular las sales de propiónato de sodio y amonio muestran actividades semejantes contra levaduras y hongos filamentosos (Schnürer y Magnusson, 2005).

Otros productos pero de naturaleza peptídica son las bacteriocinas, definidas como proteínas que producen un efecto antagónico, ante otros microorganismos (Vandenbergh, 1993). Las bacteriocinas son clasificadas en 4 grupos, dentro del primero se encuentran aquellas denominadas como lantibioticas, la clase II son las pequeñas no lantibioticas estables al calor, la clase III son las bacteriocinas de gran tamaño estables al calor y una cuarta clase ha sido definida como heterobacteriocinas, compuestas por una mezcla de proteínas, lípidos y carbohidratos (Nes *et al*., 1996); la manera de actuar de estas moléculas es la interacción con la membrana celular, la formación de poros y posteriormente la generación de un gradiente de iones y un aumento de la permeabilidad de membrana (Stoyanova *et al*., 2012), además del reconocimiento de moléculas o receptores implicados en la síntesis de estructuras celulares como la síntesis de peptidoglicano (pared celular), bloqueando su funcionalidad (Martínez *et al*., 2016).

Muchas especies de bacterias ácido lácticas (BAL) han sido reconocidas como microorganismos productores de metabolitos bioactivos que actúan contra un amplio espectro de microorganismos patógenos como bacterias y hongos (Shrestha *et al*., 2014), entre los trabajos de impacto para esta investigación son los presentados a continuación, donde se han encontrado importantes resultados no solo frente a patógenos para el ser humano si contra agentes fitopatógenos de importancia agrícola como son bacterias y hongos, donde además de hacer notar las actividades de inhibición *in vitro*, también se han llegado a considerar al grupo de bacterias ácido lácticas como una opción de biocontrol frente agentes causantes de enfermedades de hortalizas.

Las siguientes síntesis muestran el potencial de bacterias ácido lácticas y de los elementos de su metabolismo como agentes antimicrobianos frente agentes patógenos, en mayor o menor medida.

En el 2005 Gutiérrez *et al*., probaron extractos producidos por *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis* que mostraron un efecto antimicrobiano sobre *Salmonella sp*., *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli*, obteniendo mayor inhibición cuando fueron empleados los extractos de *Lactobacillus plantarum*.

En el 2007, Larrea *et al*., evaluaron la actividad antimicrobiana de seis BAL sobre *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Shigella dysenteriae*, determinando una concentración mínima inhibitoria de 4 µL/mL por *Lactobacillus fermentum*.

Jaramillo *et al*., (2010) utilizaron un grupo de BAL aisladas del ensilaje (*Lactobacillus plantarum*, *L. pentosus*, *L. helveticus*), para evaluar su capacidad antimicrobiana frente a *Bacillus sphaericus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas putida*, obteniendo resultados de actividad antimicrobiana prometedora principalmente contra *Pseudomonas*.

Anyogu *et al*., (2014) llevaron a cabo la caracterización molecular de bacterias lácticas aisladas de la fermentación de la yuca, que presentaron actividad antimicrobiana sobre *Escherichia* coli, *Salmonella typhumurium*, *Bacillus cereus* y *Staphylococcus*, resaltando a especies *Lactobacillus plantarum* y *L. paracasei*.

Mientras que para bacterias fitopatógenas Visser *et al*., (1986), encontraron actividad antagónica *in vitro*, por parte de las bacterias ácido lácticas, sobre *Xanthomonas campestri*, *Xanthomonas campestri* pv. *manngiferaeindicae*, *Erwinia carotovora*, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas syringae* var. *capsici*.

Shrestha *et al*., (2009 A), estudiaron a *Lactobacillus* KLF01, *Lactococcus* KLC02 y *Paenibacillus* KPB3, como agentes biocontrol sobre *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, donde en pruebas *in vitro* mostraron halos de inhibición superiores a 5 mm y en pruebas en invernadero los valores de biocontrol fueron de 10 % al 60 %, mientras que en estudio en campo de 55 % - 60 %.

Shrestha *et al*., (2009 B) evaluaron la inhibición *in vitro* de *Lactobacillus* KLF01, frente a *Salmonella*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, *Erwinia pyrifoliae*, *E. carotovora* subsp. *carotovora*. Encontrando un biocontrol por *Lactobacillus* KLF01 contra *Ralstonia solanaceraum* en pimiento de 71.8 % y en tomate de 63.6 %.

En el 2012 la publicación de Jalali *et al.*, comprende un estudio de actividad antagónica por parte de *Lactobacillus plantarum* frente *Xanthamonas campestris* PTCC 1473, encontraron halos de inhibición de 5 y 6.5 mm para la suspensión celular de *L. plantarum*, empleando las técnicas difusión en disco y difusión en pozos, mientras que 2 y 3.5 mm para el medio libre de células utilizando las mismas técnicas de estudio.

Emerenini *et al*., en el 2014, estudiaron la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas, para el biocontrol de patógenos del tomate, de dieciocho aislados, donde resaltan las actividades de *Weissella paramesenteroides* (12 mm frente a *Xanthomas campestris*), *Pediococcus pentosaceus* (15 mm para *X. campestries*), *Weissella cibaria* (10 mm contra *Erwinia caratovora*), *Weissella cibaria* (13 mm frente a *Pseudomonas syringae*), *Lactobacillus pentosus* (12 mm contra *P. syringae*), por mencionar algunos.

En el caso de la actividad antifúngica, también se han encontrado resultados de inhibición por bacterias ácido lácticas. La mayoría de estas investigaciones fueron realizadas sobre hongos fitopatógenos, este grupo de fitopatógenos que como fue revisado anteriormente respecto a *Fusarium* spp., toman importancia por su capacidad destructiva en la producción de hortalizas. Entre las revisiones relevantes son las siguientes.

Laitila *et al*., (2002) estudiaron la capacidad de dos especies de *Lactobacillus plantarum* para ser empleados como agente biocontrol, para el manejo de problemas producidos por especies de *Fusarium* spp., durante el malteado de cereales obteniendo actividades antifúngicas desde 29 % hasta 50 %.

De Muynck *et al*., (2004) evaluaron la actividad antifúngica de diecisiete especies de bacterias ácido lácticas contra trece hongos, obteniendo radios de inhibición hasta 19 mm.

Dal Bello *et al*., en el 2007, evaluaron la capacidad antifúngica de *Lactobacillus plantarum*, sobre *Aspergillus niger* (inhibición media), *Fusarium graminearum* FST 4.0208 (inhibición alta), *Fusarium culmorum* (inhibición alta) y *Fusarium oxysporum* (inhibición media).

Gerez *et al*., en el 2010, estudiaron la actividad antifúngica sobre *Penicillum digitatum*, de 33 BAL de la colección CRL de Argentina, de las cuales presentaron destacada actividad antifúngica las especies *L. rhamnosus 981*, *L. plantarum* 778, *L. paracasei* 1501, *L. casei* 208, *L. casei* 87.

Mauch *et al*., (2010) estudiaron la actividad antifúngica de 129 BAL contra *Fusarium* spp. de cebada, obteniendo una actividad antifúngica destacada la especie *Lactobacillus brevis*, obtenido hasta 43 % de inhibición sobre *Fusarium* spp.

Wang *et al*., en el 2011, publicaron un estudio de inhibición fúngica de *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 sobre *Botrytis cinérea* (86 ± 2.0 %), *Phytophthora drechsleri* Turker (100 ± 0.0 %), *Fusarium oxysporum* (79.7 ± 3.7 %), *Alternaria solani* (79.3 ± 6.4 %) y *Glomerella cingulata* (92.4 ± 2.9 %).

El Mabrok *et al*., en el 2012, aislaron siete BAL, identificadas como *Lactobacillus plantarum*, a partir de frutas y vegetales frescos que mostraron actividad antifúngica sobre *Colleotrichium capsici* (halos de 6 a 20 mm).

Oranusi *et al*., (2013) reportaron que BAL aisladas de *Ricinus communis* (Ogiri), *Pentaclethra macrophylla* (Ugba) y yogur, muestran actividad antifúngica (inhibición de 2 mm hasta 15 mm) frente *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *Mucor*, *Penicillum*, *Rhizopus* y *A. nidulans*.

Lactobacillus acidophilus fue estudiado para evaluar su actividad de inhibición sobre *Fusarium oxysporum* (10 %) y *Rhizoctonia solani* (50 %) y particularmente sobre *Sclorotium rolfsii* logrando hasta 90 % de inhibición (Hammed *et al*., 2011).

Estos resultados de actividad antimicrobiana, son relevantes para este trabajo, por la intensión de encontrar si hay efecto por las bacterias ácido lácticas del genero *Lactobacillus* spp., sobre en el desarrollo y crecimiento de hongos miceliares como *Fusarium oxysporum* y bacterias fitopatógenas como *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Además la bibliografía disponible, muestra la atractiva oportunidad para el estudio de bacterias ácido lácticas y su uso en la agricultura evaluando si hay efecto biocontrol significativo de especies de *Lactobacillus* spp., contra agentes fitopatógenos.

1.7.2. Bacterias ácido lácticas promotoras del crecimiento vegetal

Las plantas albergan una numerosa y variada microbiota, aunque el número de bacterias ácido lácticas en la planta es muy variable, la mayoría de las investigaciones han demostrado que su número es muy bajo, en el rango de 10 a 1000 células por gramo, que representan aproximadamente el 0.01 – 1.0 % de la población microbiana (Daeschel *et al*., 1987).

El papel de las BAL y su interacción con el ambiente de la planta es aún desconocido, debido a que las BAL están presentes en hábitat ricos en nutrientes, como ocurre en la descomposición de materia orgánica (König y Fröhlich, 2009), pero también se ha reportado su presencia en partes de plantas dañadas, lo que posiblemente es porqué actúan para proteger a la planta frente a fitopatógenos (Daeschel *et al*., 1987).

En plantas vivas, las BAL están presentes en las superficies externas, entre las estas BAL predominan las heterofermentativas, siendo el género *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*), como el predominante, pero además se han encontrado especies de *Lactobacillus arabinosus*, *L. brevis*, *L. casei*, etc., además de *Pediococcus acidilactici* y *P. pentosaceus*, representando al género *Streptococcus* se encuentran *S. faecalis*, *S. faecalis* var. *liquenfaciens*, *S. lactis*, y *S. faecium* (Daeschel *et al*., 1987).

Debido a hechos como los anteriores y el desconocimiento del propósito certero de la presencia de bacterias ácido lácticas como parte de la microbiota de las plantas, se ha estudiado el beneficio que ofrecen estas bacterias hacia la planta, sin embargo ha sido poco estudiado. En las siguientes revisiones se han realizado estudios de germinación y el efecto de las BAL en desarrollo de la plántula.

Para la actividad promotora del crecimiento vegetal se han evaluado a especies como *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* y *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, que además del efecto antagónico sobre *Ralstonia solanacearum*, presentaron actividad promotora del crecimiento en la germinación al aumentar el porcentaje 76.10 % – 79.76 %, incluyendo un incremento en la longitud de tallo (5.76 cm - 5.80 cm) y longitud de raíz (8.47 cm - 5.83 cm) y el índice de vigor alcanzó valores de 1130 - 1112.76, mientras que en pruebas biocontrol presentó valores de 700.08 (Narasimha *et al*., 2012).

Shrestha *et al*., (2014) evaluaron la actividad promotora del crecimiento vegetal de *Lactobacillus* KLF01, KLC02 y KPD03 en plántulas de pimiento. Que bajo condiciones de invernadero KLF01 y KPD03 aumentaron longitud de tallo en 23.59 % y 22.48 % respectivamente, mientras que la longitud de raíz fue beneficiada por las tres especies en 14.52 % (KLF01), 22.69 % (KLC02) y 24.93 % (KPD03), por su lado en campo abierto 15 días después de la inoculación del medio de fermentación, la altura de planta de pimiento alcanzó valores de 135.87 cm (KLF01), 126.97 cm (KLC02) y 121.83 cm (KPD03).

Lutz *et al*., (2012) estudiaron a dos bacterias ácido lácticas, aisladas de muestras de suelo de diferentes cultivares, estas bacterias aumentaron el peso seco de plántulas de pepino que va desde 3.8 g (Control) a 4.5 g (BAL 1) y 4.1 g (BAL 2), el porcentaje de germinación de semillas de pepino (inoculadas con el medio de crecimiento), aumento por las bacterias lácticas donde BAL 1 alcanzo 58 % y BAL 2 55 %.

Hammed *et al*., (2011) en su estudio con la inoculación directa a semillas de tomate de tres especies de bacterias acido lácticas (aisladas de leche y yogurt), la longitud de plántula aumento en 112 % por LB-1 y 151 % por LB-5, además el número de raíces secundarias incremento un 171 % por LB-1, 146 % por LB-3 y 221 % de LB-5. Por otro lado cuando es inoculado el suelo, el desarrollo del tallo se ve influenciado aumentando su longitud, como lo fue por LB-1 en 135 %, LB-2 en 143 % y LB-5 con 146 %.

La interacción entre las BAL y las plantas que las alberga, aun no es conocida, sin embargo los resultados demuestran la capacidad de bacterias ácido lácticas de favorecer la germinación, el desarrollo y crecimiento de tejidos vegetales, debido a mecanismos como la colonización de la superficie de raíces (Hammed *et al*., 2011) y la producción de compuestos bioactivos a partir de su metabolismo que actúan de manera positiva sobre el desarrollo vegetativo como menciona Glick (2015), a los ácidos orgánicos volátiles como la acetoína que favorece el desarrollo foliar.

Los resultados mostrados por las investigaciones anteriores, muestran la oportunidad de estudiar bacterias acido lácticas del género *Lactobacillus* spp., y evaluar si dichas bacterias presentan efecto promotor del crecimiento vegetal en la germinación de semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*).

1.8. Justificación

En México las enfermedades del tomate se tornan un foco de alerta para la economía nacional por las afectaciones que conlleva la aparición de un cultivar infectado, ejemplo de ellas son la marchitez vascular (en 2002 se reportó una incidencia del 85 % en los campos de Sinaloa) y el cáncer bacteriano (en México ha producido pérdidas económicas de más de 40 millones de dólares), que se caracterizan por una alta capacidad destructiva y que en ocasiones el control químico, que hace uso de productos orgánicos e inorgánicos como alcaloides y derivados del cobre, etc., ante los agentes *Fusarium oxysporum* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, no es efectivo contra estas patologías; motivo por el cual el productor recurre a acciones de cuarentena del terreno, eliminación de plantas infectadas del cultivar y su subsiguiente incineración, hechos que aumentan los costos de producción y generan cuantiosas mermas, sin dejar a un lado las afectaciones ambientales por un abuso en el consumo excesivo de agroquímicos (fungicidas y bactericidas), compuestos que pueden llegar acumularse en la rizosfera y *a posteriori* afectar la microbiota del suelo.

Ante la gravedad que presentan las enfermedades fitopatógenas y los actos que conlleva el controlarlas, es necesario desarrollar técnicas menos agresivas al ambiente, como lo son las herramientas biotecnológicas (agentes biocontrol), que además de aminorar las enfermedades, mediante mecanismos como la producción de ácido orgánicos o sustancias antimicrobianas o mecanismos indirectos como es la estimulación de la resistencia sistémica inducida en la planta, también estos agentes contribuyan a desarrollo de la planta en la germinación y durante su fenología, desarrollando fenómenos como la producción de precursores de fitohormonas como el ácido indol acético y ácido orgánicos volátiles.

1.9. Objetivos

1.9.1. Objetivo general

Evaluar la actividad biocontrol y promotora del crecimiento de vegetal de los productos de fermentaciones ácido lácticas producidos por *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. coryniformis*, *L. helveticus* y *L. pentosus* en tomate (*Solanum lycopersicum*).

1.9.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto *in vitro* de los productos de las fermentaciones ácido lácticas, producidos por cinco especies *Lactobacillus* spp., en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

2. Analizar la actividad biocontrol de los productos de las fermentaciones ácido lácticas contra *Fusarium oxysporum* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

3. Evaluar la actividad promotora de crecimiento vegetal de los productos de las fermentaciones ácido lácticas en la germinación de tomate.

CAPÍTULO II. METODOLOGÍA

2.1. Microorganismos y material vegetal

2.1.1. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) liofilizadas para el proyecto fueron, las siguientes:

NRRL B-227: *Lactobacillus pentosus.*

NRRL B-548: *Lactobacillus bulgaricus.*

NRRL B-4390: *Lactobacillus coryniformis.*

NRRL B-4495: *Lactobacillus acidophilus.*

NRRL B-4526: *Lactobacillus helveticus.*

Obtenidas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), de la colección de microorganismos NRRL -B.

2.1.2. *Fusarium oxysporum*

Fusarium oxysporum, cultivo donado por el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Unidad Celaya, Gto.

2.1.3. *Phytophthora capsici*

Phytophtora capsici cultivo donado por el laboratorio de microbiología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Unidad Celaya, Gto.

2.1.4. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* cepa IFO donada por el laboratorio de fitopatología del Instituto Potosino de Ciencia y Tecnología (IPICYT), Unidad San Luis Potosí.

2.1.5. Material vegetal

Se utilizaron semillas de tomate tipo *saladette* (*Solanum lycopersicum*), semilla catia (Hazera seed), del invernadero de investigación de la Universidad Politécnica de Guanajuato y además se emplearon plantas de tomate *cherry* de dos meses de edad.

2.2. Cultivo y conservación de microorganismos

2.2.1. Bacterias ácido lácticas (BAL)

El crecimiento y activación de las bacterias ácido lácticas se realizó en caldo nutritivo MRS (Man Rogosa Sharpe), de la empresa Fluka® (Anexo 1). La activación de las cepas liofilizadas de *Lactobacillus* spp. se realizó por separado.

Las cepas de *Lactobacillus* spp., fueron incubadas a 28 °C o 37 °C, de acuerdo a las recomendaciones de crecimiento que establece el Departamento de Agricultura de Los Estados Unidos (EEUU).

Las bacterias fueron conservadas en caldo MRS-Glicerol al 50 %, en viales estériles a -20 °C.

2.2.2. *Fusarium oxysporum*

Se inocularon placas de papa dextrosa agar (Bioxon®) (Anexo 2), tomando un anillo de agar con diámetro de ≈ 0.6 cm, sobre el que hay presencia de micelio.

El anillo fue colocado en el centro de la placa de Petri con PDA y por la técnica de punta de hifa en medio solido de PDA.

Las placas de colocaron a temperatura ambiente (27 °C), hasta que el hongo se propagó en la totalidad de la caja de Petri equivaliendo a un diámetro cercano a 8.5 cm (14 días aproximadamente).

Para mantener la patogenicidad del hongo, se realizó su guardado en tubos de ensaye con arena estéril (121 °C por 30 min).

2.2.3. *Phytophthora capsici*

Se inocularon placas de papa dextrosa agar (Bioxon®), por la técnica de crecimiento de anillo en el centro. Las placas de colocaron temperatura (30 °C), hasta que el hongo se propagó en la totalidad de la caja de Petri equivaliendo a un diámetro cercano a 9.0 cm (7 días).

2.2.4. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Para el crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* Cepa IFO, se inoculó por estría a partir de la placa brindada por IPICYT, en medio de cultivo 308 (Anexo 3). Las placas se incubaron a temperatura ambiente ≈ 28 °C por cinco días.

La conservación de *Cmm* se realizó en caldo NBY-Glicerol al 50 % (Anexo 4), en tubos eppendorf y conservados a -20 °C y se realizaron traspasos de caja a caja semanalmente, por estría simple en agar NBY.

2.3. Cinéticas de bacterias ácido lácticas

2.3.1. Cinética de crecimiento de bacterias ácido lácticas

Para conocer el comportamiento de crecimiento, que presentan cada una de las especies de *Lactobacillus* spp., se empleó el método de peso seco (biomasa). A partir de las de los cultivos stock (viales) obtenidos previamente, fueron utilizados para monitorear el comportamiento de la biomasa bacteriana, para ello se tomaron alícuotas a diferentes puntos en el tiempo y se colocaron en tubos de ensaye de cristal previamente secos (24 h a 105 °C). A las alícuotas se aplicaron los procedimientos de centrifugación (4,000 rpm por 10 min) y dos lavados con agua destilada, para posteriormente ser secados 105 °C por 24 h.

La producción de biomasa fue determinada por la diferencia de pesos, entre el tubo de ensaye totalmente seco y el tubo con muestra posterior a su secado.

2.3.2. Cinética de consumo de glucosa

Matraces de 250 mL con 100 mL de caldo MRS estéril, fueron inoculados con un vial de 1 mL de cultivo de BAL, se tomaron alícuotas en intervalos de 3 horas, se concentró la biomasa por centrifugación a 4000 rpm por 10 minutos.

Los sobrenadantes fueron analizados por la técnica del ácido 3,5 - dinitrosalicílico (DNS), realizando la lectura de absorbancia a 490 nm, en el espectrofotómetro (Optizen POP).

2.3.3. Cinética de producción de ácido láctico

Al igual que la cinética de consumo de la fuente de carbono (glucosa), las muestras del medio de fermentación a partir de matraces de 250 mL (inoculados previamente), se les eliminó la biomasa por centrifugación (4000 rpm por 10 min), seguido de la precipitación de proteína, lípidos y carbohidratos empleando sulfato de cobre ($CuSO_4$) al 20 % (W/V) e hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$), posteriormente se provocó la reacción de oxidación del ácido láctico hasta aldehído, utilizando ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 97.7 % (W/V) y así producir una solución coloreada, utilizando 1,2 dimetoxibenzeno al 1.5 % en alcohol metanol (CH_3OH), con la lectura espectrofotométrica (Optizen POP).

2.4. Cinéticas de crecimiento de fitopatógenos

2.4.1. Cinética de crecimiento de *Fusarium oxysporum*

Fueron inoculadas placas de Petri con agar PDA. La inoculación consistió en colocar un disco de agar con diámetro (Ø) de 0.6 cm al centro de la placa. Se utilizó como variable de crecimiento al área micelial, que involucra las dimensiones alcanzadas por el micelio. Las evaluaciones se realizaron en intervalos de 24 h, por un periodo de 14 días, las cajas se mantuvieron a temperatura de 27 °C ± 1.5 °C. Las mediciones fueron realizadas en dos direcciones (horizontal y vertical) medidas con un vernier manual.

2.4.2. Cinética de crecimiento de *Phytophthora capsici*

Al igual que *F. oxysporum*, se siguió la misma metodología de inoculación y evaluación de crecimiento (área micelial), en las mismas condiciones de muestreo, tiempo de incubación y temperatura.

2.4.3. Cinética de crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Para conocer el comportamiento de crecimiento del patógeno *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, se empleó el método de peso seco (biomasa).

A partir del cultivo stock (viales) obtenidos previamente, se inocularon medio líquido y a partir de alícuotas colectadas se monitoreo el comportamiento de la biomasa bacteriana, para la determinación muestras de fueron centrifugadas y lavadas para su posterior secado a 105 °C por 24 horas.

2.5. Obtención y evaluación de los productos de fermentación ácido láctica

Después de realizar de la construcción de las cinéticas de crecimiento, producción y consumo, se determinó el tiempo de colectar los productos y su posterior evaluación de la composición, evaluando el contenido de ácido láctico, glucosa residual en el medio, residuos de glucosa en los productos de membrana y la biomasa.

2.5.1. Medio de fermentación

Este producto comprende, al sobrenadante en el que se desarrolló la bacteria hasta alcanzar su máximo de crecimiento y las bacterias.

Para determinar la concentración de ácido láctico, se empleó la reacción de oxidación de ácido láctico a aldehído. La técnica se basa en los trabajos publicados por Heinemann, (1940), Barker y Summerson (1941) y Davidson, (1949). La reacción se llevó a cabo en presencia ácido sulfúrico al 97.7 %, sulfato de cobre (4 %) y 1,2- dimetoxi-Benceno en metanol al 1.5 % (V/V), siguiendo las siguientes condiciones de operación.

La curva de calibración, consistió en estándares de ácido láctico de concentraciones de 0.07 g/L hasta 1 g/L, a partir de un stock de ácido láctico (Química-Meyer) con concentración de 85 % (W/V).

En caso de las muestras problemas fueron diluidas en agua destilada, para reducir la concentración del ácido y ser cuantificado con la curva de calibración.

Posteriormente tanto estándares como muestras diluidas, se realizó el procedimiento de limpieza de medios biológicos, para ello se transfirió 1 mL a un tubo limpio, se adicionó 1 mL de una solución de sulfato de cobre al 20 %, cuatro volúmenes de agua destilada con respecto al volumen de muestra (1 mL) y 1 g de hidróxido de calcio ($Ca(OH)_2$), este procedimiento fue realizado para precipitar proteína presente, material lipídico y carbohidratos de la solución, ya que pueden producir reacciones de oxidación y alterar la cuantificación.

Los tubos con hidróxido de calcio, se homogenizaron con pulsos de 5 s con vortex y permanecieron por 30 minutos a temperatura ambiente, después de este tiempo, se aplicó una centrifugación a 6,000 rpm por 10 minutos y se recuperaron los sobrenadantes que contenían el analito de interés.

Obtenido el sobrenadante, fue transferido 1 mL a un nuevo tubo de ensaye para realizar la reacción con ácido sulfúrico y 1,2-dimetoxi-Benceno. A un tubo limpio se agregó 1 mL del sobrenadante, se adicionó 0.05 mL de una solución de sulfato de cobre al 4 % y 6 mL de ácido sulfúrico concentrado (97.7 %).

Los tubos de reacción fueron introducidos a un baño de agua en ebullición por 5 minutos y posteriormente enfriado con agua helada hasta una temperatura de 20 °C. Después del tratamiento térmico, se adicionó 0.1 mL de una solución al 1.5 % (V/V) de 1,2- dimetoxi-benceno en metanol, la solución se agitó en vortex por 10 segundos y fue colocado en incubación en baño María a 30 °C por 30 minutos, en este periodo de incubación es desarrollado el color final.

Posterior a la incubación de 30 minutos, los tubos fueron colocados en un baño de agua en ebullición por 90 s, para evaporar todo aquel reactivo fenólico en exceso y después de este corto tiempo en agua en ebullición, se dio un choque térmico con agua helada por 5 minutos.

Después de la operación anterior ahora fue posible determinar el contenido de ácido láctico. La evaluación de muestras problema es llevada a cabo, después de realizar un barrido en el espectrofotómetro (Optizen POP) desde 200 nm hasta 800 nm, identificando la longitud de máxima absorción (Λ), propia de esta reacción. Las muestras problema fueron analizadas en este puto del espectro visible y empleando la curva de calibración (Anexo 5) se estimó la concentración de ácido láctico producido por las bacterias lácticas, durante la fermentación.

Además del contenido de ácido láctico se evaluó el contenido de indoles totales por la técnica espectrofotométrica de reducción de componentes indólicos empleando el reactivo de Salkowski (Shrestha *et al*., 2014), para ello este producto se sometió a centrifugación de 15 minutos a 6000 rpm para retirar la biomasa presente, los sobrenadantes recuperados se diluyeron con agua destilada y un mililitro de las diluciones fueron colocados en reacción con 4 mL del reactivo de Salkowski, permaneciendo a temperatura ambiente por 20 minutos, después de este tiempo se evaluó a 535 nm en espectrofotómetro.

La curva de calibración fue construida utilizando ácido 3-indol-acetico (Fluka®) de alta pureza (99 %), en las mismas condiciones de reacción y volúmenes (anexo 6).

2.5.2. Sobrenadante libre de células

Los caldos de fermentación en los cuales se desarrollaron cada una de las bacterias ácido lácticas, fueron centrifugados a 6,000 rpm por 10 minutos, los sobrenadantes fueron recuperados y esterilizados a 121 °C por 15 min y almacenados en refrigeración.

La evaluación para este producto comprendió la cuantificación de ácido láctico presente (técnica antes mencionada), contenido de indoles totales por la reacción antes mencionada y glucosa residual empleando la técnica de DNS.

2.5.3. Productos asociados a membrana

Al sedimento después de la centrifugación (*pellet* celular), se aplicó un proceso de lavado con solución buffer de fosfatos de pH 7.2 (Anexo 7), para ello se agregó el buffer en una relación 1:1 (V/V) con respecto al volumen inicial antes de la centrifugación, la biomasa fue suspendida con pulsos de 20 segundos, empleando un vortex, después de este procedimiento, se agitaron por 2 h a 180 rpm para arrastrar los productos adheridos membrana, después se realizó una segunda centrifugación de 6,000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante con productos de membrana se esterilizo 121 °C por 15 min y almacenado en refrigeración.

La evaluación de este producto, consistió en cuantificar la concentración de glúcidos, para ello se empleó la técnica de ácido 3,5 dinitrosalicílico (Anexo 8), las lecturas a 490 nm y la determinación expresa la presencia de residuos de glucosa relacionados glicoproteínas, glicolípidos y exopolisacáridos.

La curva de calibración fue construida utilizando glucosa anhidra (Sigma Aldrich®).

2.5.4. Biomasa

A partir del lavado con buffer de fosfatos, el *pellet* celular obtenido (biomasa), se obtuvo una suspensión homogénea en agua destilada estéril utilizando pulsos en vortex y este producto fue almacenado en refrigeración para su empleo posterior.

Para determinar el contenido de biomasa, se utilizó la técnica de peso seco, empleando tubos de ensaye de cristal secos (105 °C por 24 h), a los cuales se colocó un volumen 2 mL de la soluciones de biomasa, estos tubos con muestras se centrifugaron a 4,000 rpm por 10 minutos, se decantaron y fueron secados (105 °C por 24 h).

Los cuatro productos obtenidos de las fermentaciones lácticas, de cada una de las cinco especies de *Lactobacillus* spp., solo podían ser utilizados en un tiempo no mayor a 24 h, para evitar situaciones de muerte celular o contaminación de los productos libres de células.

2.6. Pruebas de inhibición *in vitro*

2.6.1. Prueba *in vitro* sobre *Fusarium oxysporum*

La técnica para medición de inhibición sobre *F. oxysporum*., fue empleando la técnica de envenenamiento de la matriz de agar en un 10 % (V/V). El procedimiento, consistió en la preparación de agar papa dextrosa (PDA), se bajó su temperatura hasta 40 °C, en esta temperatura se incorporó en un 10 % de su volumen con los productos, la mezcla de agar-producto se homogenizo y se vertió a las placas de Petri, las placas permanecieron en condiciones de esterilidad hasta su solidificación. Sobre el agar se colocó en el centro un anillo de micelio del stock del hongo de fitopatógeno de estudio de 0.6 cm de diámetro. Las placas se incubaron a temperatura ambiente, la medición del crecimiento del hongo fue manera diametral (D_1-Horizontal y D_2-Vertical) cada 24 h, tomando como variable de análisis el área del micelio (Ecuación 1).

El diseño de experimentos fue un diseño de bloques (Tabla 1), evaluando el área micelial alcanzada por cada tratamiento y el porcentaje de inhibición de cada tratamiento.

$$\text{Área} = \pi * \frac{D_1}{2} * \frac{D_2}{2}$$

Ecuación 1. Determinación de área micelial.

Como testigos se contaron con placas con la siguiente composición al 10 % del agar:

- PDA-MRS.
- PDA-PBS.
- PDA-Agua destilada.
- PDA únicamente.

Para determinar el porcentaje de inhibición (Ecuación 2), se consideró el área de micelio alcanzada, en el momento en el que el hongo invadió la totalidad de la caja.

$$\%\ \text{Inhibición} = \frac{\text{Área}_{\text{Trat}} - \text{Área}_{\text{Control}}}{\text{Área}_{\text{control}}}$$

Ecuación 2. Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición.

Tabla 1. Diseño de experimentos para la inhibición *in vitro* de fitopatógenos.

	L. acidophilus				*L. bulgaricus*				*L. coryniformis*				*L. helveticus*				*L. pentosus*			
R	MF	SC	PM	B	MF	SC	PM	B	MF	SC	PM	B	MF	SC	PM	B	MF	SC	PM	B
1																				
2																				
n																				

Dónde: R (réplicas). MF (medio de fermentación). SC (sobrenadante libre de células). PM (productos de membrana). B (suspensiones celulares).

2.6.2. Prueba *in vitro* sobre *Phytophthora capsici*

La técnica para medición de inhibición de *Phytophthora capsici* fue empleada la técnica de envenenamiento del agar, siguiendo la metodología aplicada sobre *F. oxysporum* (mencionada antes), considerando la misma variable de respuesta, incluyendo condiciones de incubación, de envenenamiento y diámetro del anillo, el análisis estadístico es igual al planteado a *Fusarium oxysporum* (Tabla 1).

2.6.3. Pruebas *in vitro* sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*)

Las técnicas para evaluar la inhibición de *Cmm* por parte de las bacterias lácticas y sus productos fueron la de difusión en agar y conteo en placa.

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (*Cmm*), fue inoculado por 24 h, en caldo NBY estéril (121 °C por 15 min), en una relación 1 % y fue incubado a temperatura de 28 ± 2 °C a 150 rpm.

Para la prueba de difusión en agar se prepararon cajas de Petri con 35 mL de agar NBY, después de la solidificación se inoculó sobre la superficie del agar, un volumen de 100 µL del cultivo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cepa IFO, la inoculación fue distribuida utilizando una pala de arreaste (pipeta Pasteur, doblada al calor), las placas inoculadas se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente, para permitir la penetración del cultivo bacteriano en red del agar, como se muestra en la figura 1.

Figura 1. Dispersión del inóculo de *Cmm* en placas de agar.

Después de los 30 minutos de incubación se realizaron cuatro pozos de 6 mm de diámetro, utilizando un horadador. Se llenaron los pozos con un volumen de 110 µL, de los productos obtenidos de las fermentaciones ácido lácticas. Para reducir el reporte de un posible falso positivo de inhibición, cada producto incluyó con un control, así que para el presente estudio los controles fueron los siguientes:

Para el medio de fermentación y el sobrenadante (producto 1 y 2), les correspondió como control inocular caldo MRS estéril.

Para el producto 3, siendo productos asociados a membrana, el control pertinente fue buffer de fosfatos (PBS) de pH 7.2 estéril.

Para el producto 4, conformado por una suspensión de células de bacterias lácticas, el control fue agua destilada estéril.

Inoculadas las placas se colocaron en incubación a 28 °C, por 72 h, con la primera revisión a las 24 h. Cada tratamiento conto con seis réplicas.

La inhibición fue observada por la presencia de halos sin crecimiento de *Cmm* alrededor de cada pozo. Las zonas obtenidas fueron medidas con un vernier manual. La inhibición presentó unidades de mm (diámetro del halo), correspondiendo a las zonas claras más allá de los pozos y se determinó el porcentaje de inhibición (Ecuación 3) para cada uno de los productos obtenidos por las fermentaciones ácido lácticas producidas por las cinco especies de *Lactobacillus* spp.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diámetro}_{\text{Trat}} - \text{Diámetro}_{\text{Control}}}{\text{Diámetro}_{\text{trat}}}$$

Ecuación 3. Fórmula para calcular el porcentaje de inhibición de *Cmm*.

El análisis estadístico para la prueba de inhibición *in vitro* de *Cmm*, se utilizó un diseño de bloques al azar (Tabla 1), empleando seis réplicas y tres repeticiones, al final se analizaron los porcentajes de inhibición *Cmm* por parte de cada uno de los cuatro tratamientos.

Para la prueba de inhibición *in vitro* por conteo de colonias en placa, se preparó caldo NBY, el cual fue inoculado en 1 %. Este 1% está compuesto en un 50 % por cultivo de *Cmm* y 50 % por el producto de fermentación ácido láctica, que presento inhibición en la prueba difusión.

Para el conteo, se colectó 1 mL del caldo y se realizaron las diluciones decimales necesarias, posteriormente se colocó 100 µL de la dilución y se vertió sobre placas de Petri con 25 mL de agar NBY, el inóculo fue distribuido por medio de una pala de arrastre, las placas se incubaron a temperatura ambiente.

El conteo se realizó 5 días después de procedimiento, contando únicamente aquellas colonias en la superficie con la morfología característica que esta bacteria presenta como lo describe la EPPO/OEEP (2013).

2.7. Actividad biocontrol en tomate

2.7.1. Actividad biocontrol sobre *Fusarium oxysporum*

Para evaluar la actividad antagónica de los productos de fermentación, ante una posible infección foliar por parte del hongo, se evaluó por medio de la técnica de cámara húmeda. El procedimiento fue sobre hojas de tomate, desinfectadas con cloro al 1.0 % y enjuagadas con agua estéril.

Las hojas fueron sumergidas por 60 min en cada tratamientos de prueba, para corroborar la acción antagónica sobre *Fusarium oxysporum*. Las hojas fueron introducidas a cajas de Petri, con dos hojas de papel filtros húmedos con 4.5 mL de agua estéril y sobre el haz de la hoja se colocó un disco de 0.5 mm de diámetro de agar con micelio de este hongo. Las placas se sellaron con plástico adherente, para generar un sistema cerrado y se incubaron a temperatura ambiente por 7 días, evaluando el diámetro del micelio formado sobre la hoja y el daño producido sobre la misma, cada tratamiento cuenta cinco réplicas.

El análisis estadístico se basó en un diseño de experimentos de bloques, incluyendo aquellos productos que mostraron diferencia significativa contra el crecimiento micelial de *F. oxysporum* sobre hojas de tomate (Tabla 2), estudiando el área micelial producida por el hongo.

Tabla 2. Diseño de experimentos para la prueba bicontrol de *Fusarium oxysporum*.

	L. acidophilus			*L. bulgaricus*			*L. coryniformis*			*L. helveticus*			*L. pentosus*		
R	t-1	t-1	t-n	t-1	t-1	t-n	t-1	t-1	t-n	t-1	t-1	t-n	t-1	t-1	t-n
1															
2															
n															

Dónde: R (réplicas) y t-n son los productos obtenidos de las fermentaciones ácido lácticas de las especies *Lactobacillus* pp.

2.7.2. Actividad biocontrol sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Se obtuvieron plantas de tomate *cherry* de dos meses de edad, con una altura promedio de 35 cm. Se trasplantaron a vasos térmicos de 1 L, con 800 g de una mezcla comercial de sustrato esterilizado a 121 °C durante 60 min (Anexo 9), se realizaron tres perforaciones al fondo del contenedor dos a los lados y uno en la parte inferior para el drenaje del sustrato y oxigenación de raíces.

Figura 2. Plantas de tomate utilizadas en la prueba biocontrol.

Las plantas fueron aclimatadas dentro de bancales en invernadero, aplicando solución nutritiva universal (Anexo 10) con una dosis diaria de 100 mL, distribuido en tres riegos durante el día, la aclimatación fue de 7 días. Después de la aclimatación se inocularon 10 mL de los productos que obtuvieron un resultado favorable en las pruebas *in vitro*, aplicando así los siguientes productos de fermentaciones: Medio de fermentación (células más sobrenadante) y las suspensiones de células, en la figura 2 se muestra plantas empleadas.

Los tratamientos contaron con 12 réplicas, mientras que los testigos y/o controles constaron de las siguientes inoculaciones:

- ✓ Control positivo de patógeno: Plantas inoculadas únicamente con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cepa IFO y ningún tratamiento al sustrato (6 réplicas).
- ✓ Control negativo: Ninguna inoculación hacia la planta y al sustrato (6 réplicas).
- ✓ Control negativo de *Cmm*: Inoculación de buffer de fosfatos al sustrato (4 réplicas).
- ✓ Controles de los productos de fermentación: Inoculación al sustrato de caldo MRS y/o inoculación de agua destilada (3 réplicas).

La incubación fue por 72 h para producir la colonización del sustrato, por parte de las bacterias ácido lácticas.

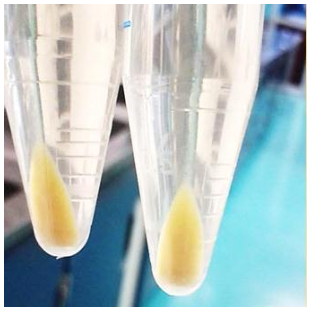


Figura 3. Biomasa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cepa IFO.

Para la primera infección se utilizaron jeringas de insulina de 100 U (1 mL), la infección sistémica fue con una suspensión celular de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* de $1X10^6$ UFC/mL (Figura 3); la inoculación se distribuyó en 3 zonas, la primera inyección fue en la zona basal o cercana al sustrato, la segunda fue a la mitad de la planta y la tercera fue cercana a la zona apical, en los entrenudos de la planta, además 9 mL fueron inoculados directamente a raíz. Las plantas inoculadas se regresaron a los bancales, para una permanencia de siete días.

La segunda inoculación se realizó por frotación foliar, infección axilar y radicular, donde la inoculación por frotación consistió en el colocar hollín de carbón activo (material para inducir heridas), finamente triturado sobre 6 foliolos de cada planta, seguida de la aplicación de una suspensión de células ($1X10^9$ UFC/mL) con hisopos estériles; mientras para la infección axilar, se colocaron 2 alfileres estériles cuyas puntas se colocaron dentro de estrías de *Cmm* desarrolladas en agar NBY por 7 días. En la figura 4 se muestra de manera gráfica los diferentes tipos de inoculación realizada.

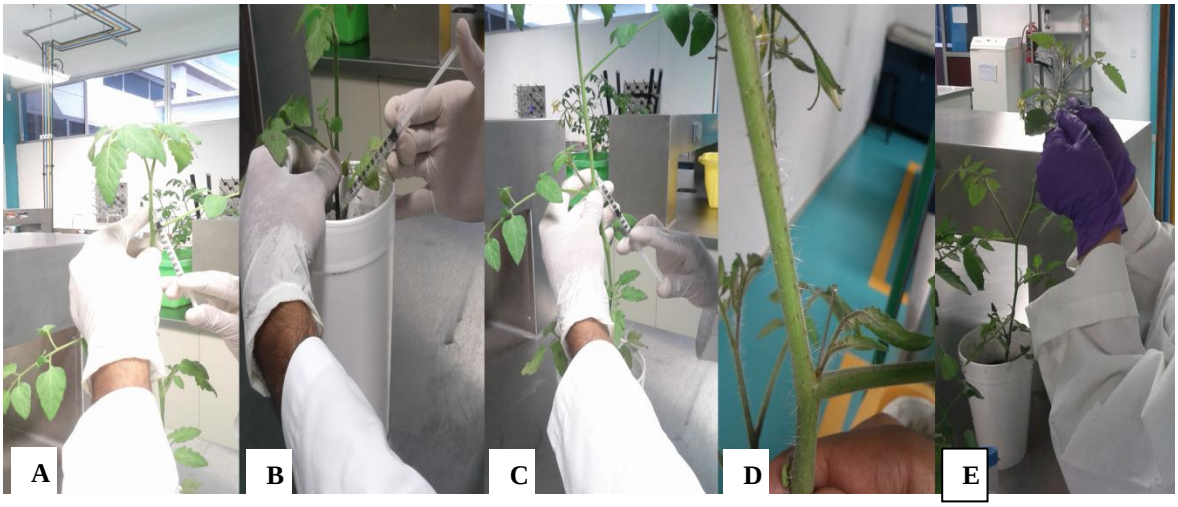


Figura 4. Inoculación de la suspensión celular de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis.* A, B y C: Inoculación por inyección directa. D: Inoculación por punción directa a tallo; E: inoculación por frotación foliar.

Cinco días después de la inoculación de la cepa de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, se verificó la presencia del patógeno en tejidos foliares y tallo, por medio de la técnica inmunológica de DAS-ELISA (Agdia®), siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 11) y catorce días después de la infección se llevó a cabo la evaluación de la enfermedad, para ello se caracterizaron las siguientes variables:

- Altura de planta.
- Longitud de raíz.
- Peso seco de raíz.
- Severidad de la enfermedad (Tabla 3).
- Porcentaje de biocontrol (Ecuación 4).
- Porcentaje de incidencia de la enfermedad.
- Presencia del patógeno *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Tabla 3. Escala de severidad después de la inoculación de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*).

Nivel	Síntomas
0	Planta sana. Planta sin síntomas relacionados a *Cmm*.
1	Tallo de coloración gris y se observa debilidad general de la planta.
2	Comienzan pequeñas lesiones foliares con un halo blanquecino.
3	1/3 de las hojas se muestran marchitas.
4	Se observan zonas aceitosas entre los nervios foliares.
5	2/3 de las hojas se observan marchitas.
6	La planta deja de embeber agua y provoca la desecación, ha iniciado el marchitamiento sistémico.
7	Los bordes de foliolos inferiores aparecen secos y curvados hacia abajo.
8	Se observa una coloración marrón oscuro a negro en las lesiones de los márgenes de las hojas (intervenal necrótico).
9	En los tallos se pueden observar heridas longitudinales que comienzan a abrirse formando cancros.
10	Toda la planta se ve afectada tomando una apariencia de desecación, similar a la causada por afectaciones solares que llegan a quemar a la planta o a un tratamiento excesivo con algún producto químico.

Escala establecida con base a los trabajos de Burokienë *et al*., (2005) y Cárdenas *et al*., (2011).

$$\text{Biocontrol} = \sum_{i=0}^{n} \frac{\text{Severidad}_{\text{Trat}} - \text{Severidad promedio}_{\text{Control}}}{\text{Severidad promedio}_{\text{control}}}$$

Ecuación 4. Relación para la determinación de la actividad biocontrol de *Cmm*, en plantas de tomate *cherry*

En el caso del porcentaje de incidencia se determinó mediante la relación que involucra al número de individuos de estudio que presentan síntomas relacionados a la infección por *Cmm* y el número total de individuos por tratamiento.

El experimento fue desarrollado como un diseño de bloques, evaluando a aquellos tratamientos que fueron significativos en la prueba de inhibición *in vitro* de *Cmm* y posteriormente analizando la severidad obtenida por cada tratamiento, el porcentaje de biocontrol (Tabla 4).

Tabla 4. Diseño de experimentos planteado para la prueba de biocontrol de *Cmm*.

	L. acidophilus		*L. bulgaricus*		*L. coryniformis*		*L. helveticus*		*L. pentosus*	
R	t-1	t-n	t-1	t-n	t-1	t-n	t-1	t-n	t-1	t-n
1										
2										
n										

Dónde: R (réplicas) y t-x son los productos obtenidos de las fermentación ácido lácticas de las especies *Lactobacillus* pp., que presentaron inhibición de *Cmm* en pruebas *in vitro*.

2.8. Actividad promotora del crecimiento vegetal

2.8.1. Actividad promotora en la germinación

Los frutos de tomate *saladette*, fueron obtenidos del invernadero de investigación de la Universidad Politécnica de Guanajuato.

Para la extracción de semillas, los frutos fueron cortados de manera longitudinal, para la posterior obtención del endospermo (zona donde se ubican las semillas). Los trozos de gran tamaño de la pulpa que acompañaban a las semillas se descartaron manualmente, el resto de la pulpa fue pesada. De acuerdo al peso de pulpa total, se mezcló con una solución de bicarbonato de sodio al 10 % esterilizada previamente en una relación 1:1 (W/W), para obtener un medio alcalino y reducir la carga microbiana y viral de la pulpa. La mezcla permaneció en fermentación por cuatro días, a temperatura ambiente, para la posterior separación de semillas. Las semillas viables fueron obtenidas del fondo del mosto de la fermentación, mientras que las semillas no viables, fueron todas aquellas que permanecieron suspendidas, en el mosto de fermentación fueron descartadas.

Las semillas obtenidas, se lavaron a chorro de agua potable para retirar fragmentos de pericarpio adheridos a la semilla, después del lavado fueron secadas al sol por 4 horas, después se introdujeron en una estufa a 32 °C, hasta otro día para lograr así 24 h de secado. Las semillas fueron guardadas bajo refrigeración (8 °C), dentro de un contenedor estéril (121 °C por 15 min).

Charolas de plástico de 200 cavidades (Hydroenviroment®), fueron llenadas con sustrato comercial, que fue humedecido con agua potable. El llenado de las cavidades fue en primera estancia de aproximadamente 75 % de su capacidad. En cada cavidad se colocó una semilla de forma manual y se cubrieron por una segunda capa de sustrato (≈ 0.25 cm), para lograr el llenado total de la cavidad.

Las charolas se colocaron dentro de una bolsa de plástico negro, por 24 horas a temperatura 30 °C. Las charolas se colocaron dentro de una cámara de crecimiento de plantas (Lumistell, ICP18) y permanecieron ahí a temperatura de 30 °C, recibiendo riegos periódicos (cada tercer día) de 3 mL por cavidad.

Cada cavidad fue inoculada con 1 mL del extracto de prueba de las fermentaciones ácido lácticas, la permanencia dentro de la cámara fue por 7 días. La prueba incluyó con 50 unidades por tratamiento. Al final del periodo de permanencia dentro de la cámara de crecimiento de plantas, las plántulas fueron retiradas de la charola y se evaluaron las siguientes características:

1. Numero de semillas germinadas (viabilidad expresada en porcentaje).

2. Longitud de tallo.

3. Longitud de raíz.

Al relacionar estas tres variables (porcentaje de germinación, longitud de raíz, longitud de tallo), permitió determinar el índice vigor, aplicando la ecuación 5 (Narasimha *et al*., 2012).

$$\text{Índice de vigor (IV)} = (LR + LT)*VS$$

Ecuación 5. Fórmula para determinar el índice de vigor en la germinación.

Donde:

IV: Índice de vigor.

LR: Longitud de raíz (cm).

LT: Longitud de tallo (cm).

VS: Viabilidad de la semilla (porcentaje de germinación).

El diseño experimental fue un diseño de bloques al azar (Tabla 5). Se evaluaron las respuestas de longitud de tallo, longitud de raíz e índice de vigor, que obtuvieron por cada producto de la fermentación de ácido láctica de las especies de *Lactobacillus* spp.

Tabla 5. Diseño de experimentos para la actividad promotora del crecimiento vegetal en la germinación.

	L. acidophilus				*L. bulgaricus*				*L. coryniformis*				*L. helveticus*				*L. pentosus*			
R	MF	SC	PM	B	MF	SC	PM	B	MF	SC	PM	B	MF	SC	PM	B	MF	SC	PM	B
1																				
2																				
n																				

Dónde: R (réplicas). MF (medio de fermentación). SC (sobrenadante libre de células). PM (productos de membrana). B (suspensiones celulares).

2.8.2. Actividad promotora en plántula

Para las pruebas se adquirieron plántulas de tomate *cherry* de 2 meses de edad. Las plantas se trasplantaron a macetas de 1 L, con 800 mL de sustrato comercial estéril (121 °C durante 1 hora). Las plantas se mantuvieron por 4 días de aclimatación dentro de bancales en invernadero, cada tratamiento contó con seis plantas como réplicas.

Después de este periodo se inocularon los productos de la fermentación láctica, en una relación de 1 % respecto al volumen del contenedor. Los productos de prueba fueron, los medios de fermentación y las suspensiones de células de las especies de *Lactobacillus* spp., la inoculación fue directamente a la zona radicular. El riego de las plantas fue de 100 mL distribuidos en 3 riegos por día. El riego fue directo al tallo inferior.

Se realizó una segunda inoculación quince días después de la primera inoculación, en las mismas condiciones de volumen y zona de inoculación. A partir de la segunda inoculación siete días después, las plantas se sometieron a estudio fisiológico que incluye la evaluación la acción de los productos de fermentaciones, aplicados en las plantas, siendo las variables de análisis:

- Peso fresco de la parte aérea de la planta.
- Altura de planta (desde la superficie del sustrato hasta la zona apical).
- Longitud de raíz.
- Peso seco de raíz (secado por 24 h a 55 °C).

Respecto al diseño experimental se estableció un diseño de experimentos de bloques al azar (Tabla 4), empleando aquellos tratamientos que en la prueba de biocontrol de *Cmm*, fueron aplicados con la el fin de estudiar el efecto que ejercen estas bacterias y las fracciones de su metabolismo sobre el desarrollo de la plántula de tomate *cherry* en ausencia del agente patógeno.

2.9. Análisis de datos

Para las pruebas de inhibición *in vitro* de *F. oxysporum* y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, biocontrol y actividad promotora del crecimiento vegetal, se utilizó el diseño de bloques al azar (Tablas 1, 2, 4 y 5) y analizados mediante el software estadístico Minitab® 16.1.0.

Se realizaron comparaciones de medias mediante pruebas de Tukey con 95 % de confianza, utilizando el software estadístico Minitab® 16.1.0.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Comportamiento cinético de las especies *Lactobacillus* spp.

Las cinéticas de crecimiento, consumo de glucosa y producción de ácido láctico por parte de las cinco bacterias ácido lácticas son presentadas en la figuras 5 y 6. Las cinéticas de crecimiento fueron evaluadas en cultivo de preinóculo e inóculo. Donde se puede apreciar el tiempo en el cual cada una de las especies de *Lactobacillus* spp., alcanzaron los valores máximos de producción de su principal producto del metabolismo.

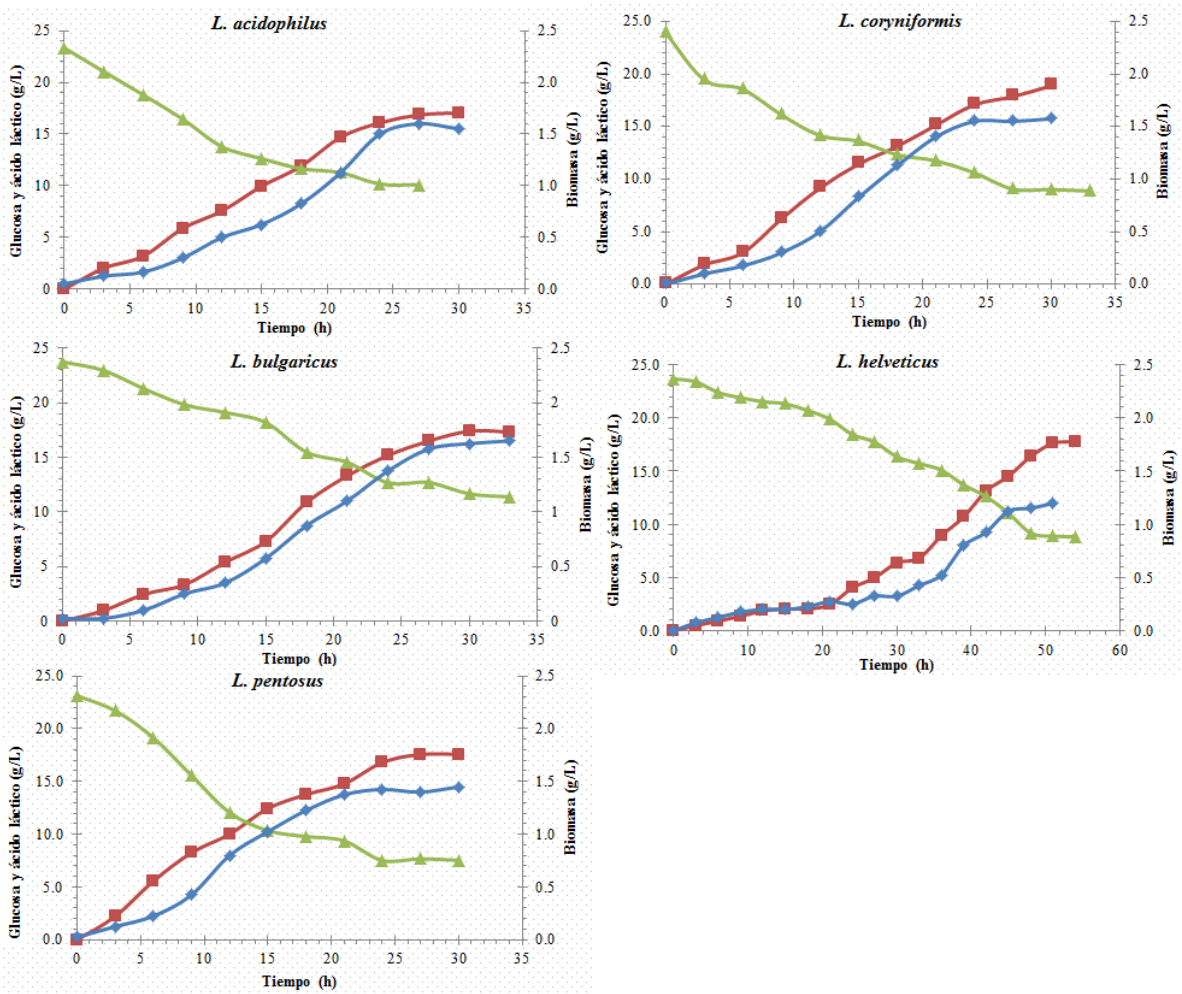


Figura 5. Cinéticas de crecimiento para el preinóculo de bacterias ácido lácticas. Donde la línea roja corresponde a la producción de ácido láctico. La línea verde representa la el consumo de glucosa. La línea azul representa el comportamiento de la biomasa de cada una de las especies *Lactobacillus* spp.

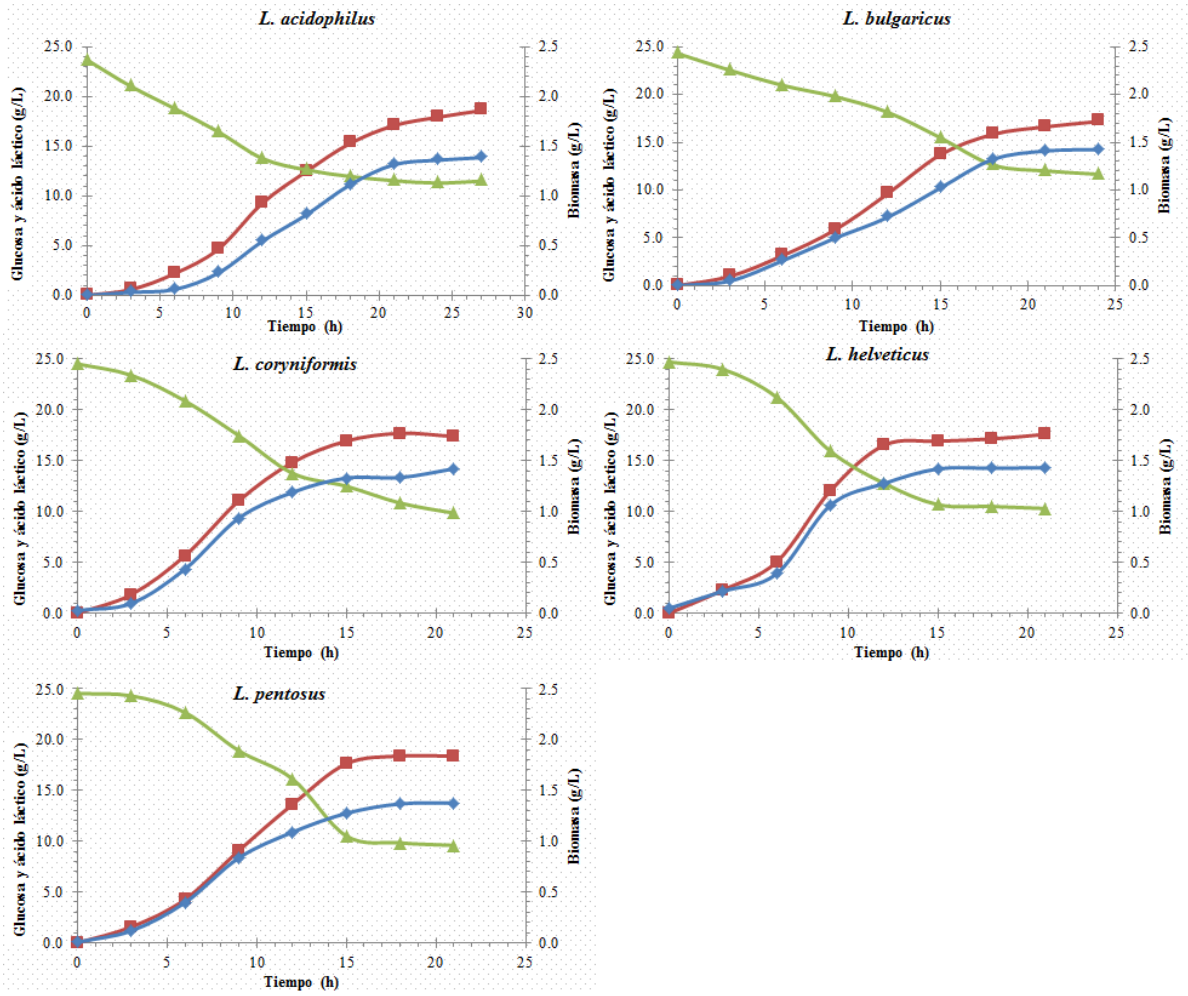


Figura 6. Cinéticas de crecimiento para el inóculo de bacterias ácido lácticas. Donde la línea roja corresponde a la producción de ácido láctico. La línea verde representa el consumo de glucosa. La línea azul representa el comportamiento de la biomasa de cada una de las especies *Lactobacillus* spp.

En las tablas 6 y 7, se muestran un resumen de las características alcanzadas por cada una de las especies *Lactobacillus* durante el monitoreo del desarrollo de biomasa, del consumo de nutrientes y la producción de ácido láctico.

Tabla 6. Resultados de ácido láctico, biomasa y glucosa residual, en el máximo de crecimiento de las especies *Lactobacillus* spp. en el cultivo de preinóculo

NRRL-B	*Lactobacillus*	Tem. Crecimiento* (°C)	Biomasa (g/L)	Glucosa residual (g/L)	Ácido láctico (g/L)
227	*L. pentosus*	28	1.4	7.5	16.8
4390	*L. coryniformis*	28	1.55	9	17
4526	*L. helveticus*	28	1.2	9	16
548	*L. bulgaricus*	37	1.55	10	16
4495	*L. acidophilus*	37	1.6	9	17

* Temperatura de crecimiento recomendada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

Tabla 7. Resultados de ácido láctico, biomasa y glucosa residual, en el máximo de crecimiento de las especies *Lactobacillus* spp. en el cultivo de inóculo.

NRRL-B	*Lactobacillus*	Tem. Crecimiento* (°C)	Biomasa (g/L)	Glucosa residual (g/L)	Ácido láctico (g/L)
227	*L. pentosus*	28	1.2	10	17
4390	*L. coryniformis*	28	1.45	8	16.5
4526	*L. helveticus*	28	1.4	10	16.5
548	*L. bulgaricus*	37	1.3	12	17
4495	*L. acidophilus*	37	1.3	11	17

* Temperatura de crecimiento recomendada por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos.

El propósito de la construcción de las cinéticas características para las cinco especies de *Lactobacillus* spp., fue determinar el momento (tiempo en h), en el que fueron detenidas las fermentaciones ácido lácticas y después fraccionar la fermentación en los cuatro productos. Una vez obtenidos cada uno de los productos, se procedió a realizar las pruebas experimentales.

Las cinéticas muestran tendencias de consumo y producción con una bioconversión de alrededor del 70 % de la fuente de carbono (glucosa) a ácido láctico, resultado superior al reportado por Juárez *et al*., (2003), que estudió a *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259 obteniendo un contenido de ácido láctico de aproximadamente 5 g/L, empleando caldo MRS en múltiples condiciones de pH y temperatura; mientras que Kotzamanidis *et al*., (2002), encontraron una bioconversión casi del 100 % de azúcares en un caldo de melaza a partir de remolacha, que inicialmente contaba con 71 g/L de azúcares, estudiando a *L. delbrueckii* NCIMB 8130; mientras que la especie *L. coryniformis* presentó semejanza en cuanto a la producción y consumo obtenida por Slavica *et al*., (2015), que obtuvo hasta 15 g/L de ácido láctico, partiendo de un contenido de glucosa de 20 g/L, presente en caldo MRS-glc_{20}.

Los resultados obtenidos presentan similitudes con lo reportado anteriormente en cuanto a bioconversión de glucosa como lo fue el trabajo de Slavica *et al*., (2015); haciendo notar que los resultados obtenidos de crecimiento, consumo de glucosa y producción de ácido láctico para esta investigación, fueron estudiados empleando caldo MRS comercial. En caso contrario Kotzamanidis *et al*., (2002), donde dicha investigación no es comparable la concentración inicial de la fuente de carbono, debido a que es obtenida por la hidrólisis química de residuos agroindustriales, mientras que en el caso de Juárez *et al*., (2003) su investigación tuvo como finalida el encontrar las condiciones ambientales para aumentar la producción de ácido láctico (en esta investigación no fue el objetivo planteado).

3.2. Cinéticas de crecimiento de fitopatógenos

3.2.1. Cinética de crecimiento de *Fusarium oxysporum*

La figura 7 presenta la cinética de crecimiento de *Fusarium oxysporum*, en placa de agar. El máximo de crecimiento diametral (8.5 cm) fue obtenido por el desarrollo de micelio a 14 días de incubación, las características fueron micelio pigmentado (color salmón), septos continuos, producción de micelio aéreo y vegetativo (Figura 8), morfología semejante a la descrita por Hafizi *et al*., (2013).

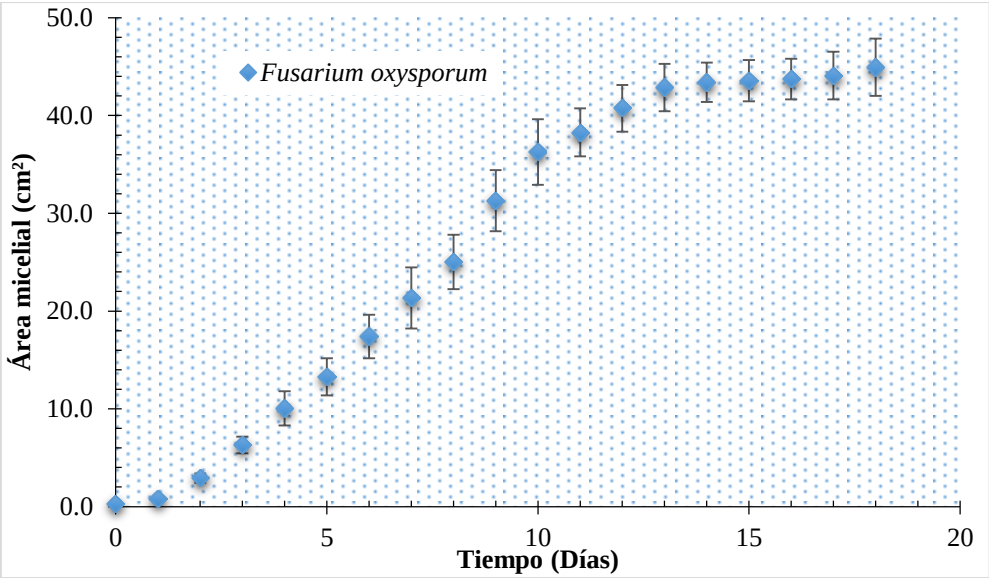


Figura 7. Cinética de desarrollo de área micelial de *Fusarium oxysporum*.

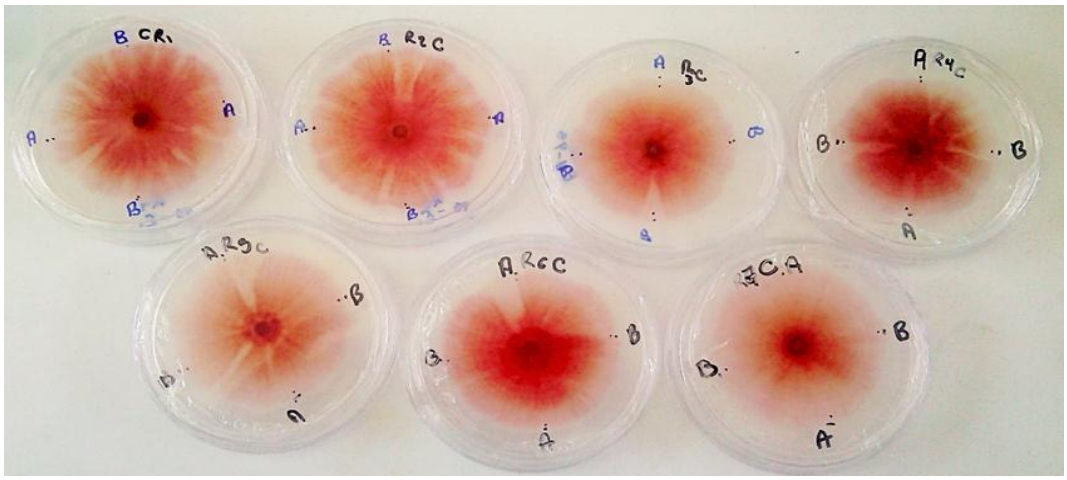


Figura 8. Morfología micelial de *Fusarium oxysporum*.

3.2.2. Cinética de crecimiento de *Phytophtora capsici*

La figura 9, presenta la cinética de *Phytophthora capsici* en placas de agar. Donde el máximo de crecimiento fue en un periodo de 7 días, las características fueron: micelio cenocítico, ausente de pigmentos (micelio hialino), color blanquecino, producción de micelio aéreo casi imperceptible (no formo algodoncillo) y sin producir esporas (Figura 10), la descripción concuerda con la reportada por Fernández (1983).

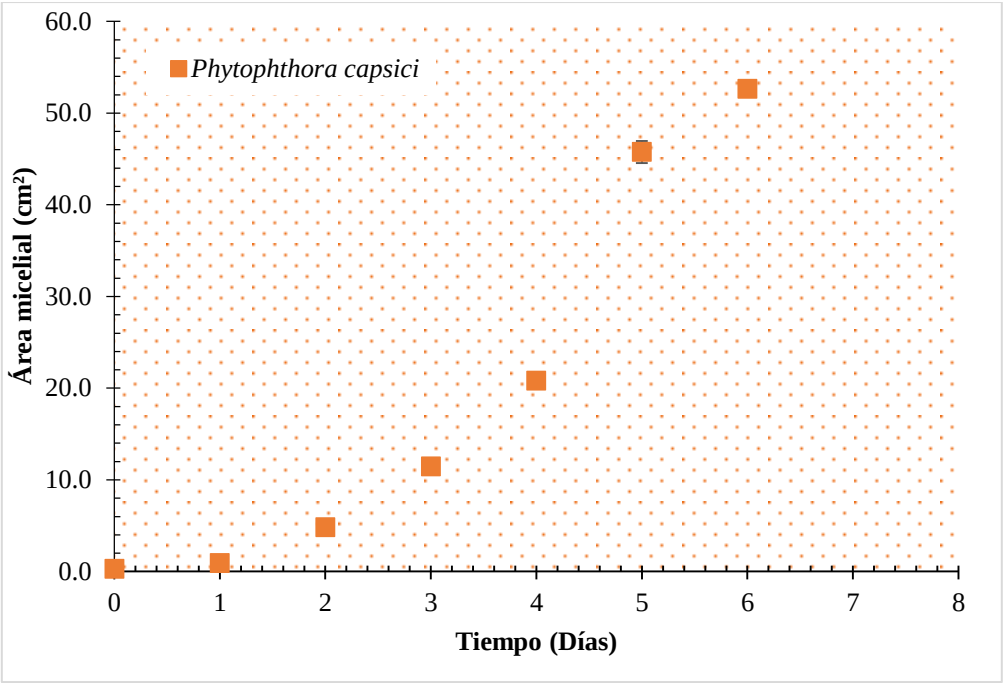


Figura 9. Cinética de crecimiento de *Phytophthora capsici*.

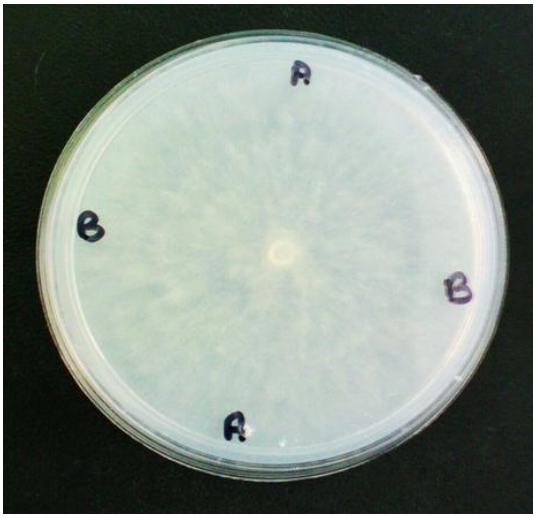


Figura 10. Vista macroscópica de *Phytophtora capsici*.

3.2.3. Cinética de crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

La cepa de *Cmm* empleada en este estudio presentó una cinética de crecimiento cuyo máximo de biomasa (Peso seco), fue alrededor de 1.3 g/L, alcanzado entre las 20 y 25 horas lo cual se muestra en la figura 11.

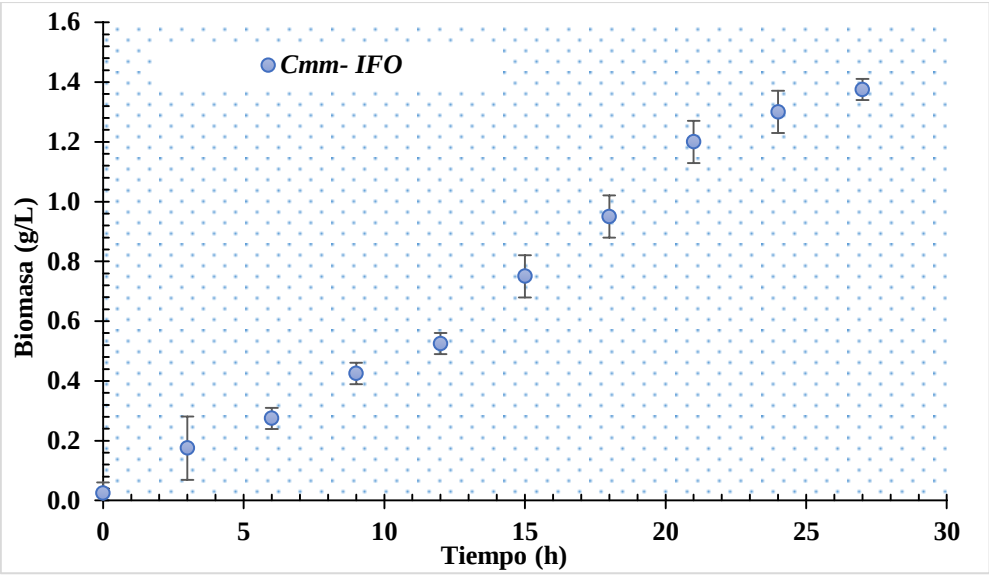


Figura 11. Cinética de crecimiento de *Cmm* (Peso seco).

3.3. Obtención y evaluación de los productos de fermentación ácido láctica

La cosecha de los productos fue en el tiempo de máximo crecimiento encontrado a partir de las cinéticas de producción, crecimiento y consumo. Posterior a la colecta y fraccionamiento de los medios de fermentaciones en los cuatro productos, a cada uno de ellos se evaluó algún componente presente como ácido láctico, glucosa residual, residuos de carbohidratos, índoles totales y biomasa (Tabla 8).

Los resultados de la evaluación de los productos de las fermentaciones ácido lácticas de las cinco especies *Lactobacillus* spp., muestran una producción de ácido láctico muy parecida, con una con una bioconversión del sustrato de alrededor del 60 - 75 % respecto a la concentración inicial de glucosa (25 g/L), sin embargo la producción fue evaluada hasta el máximo de crecimiento de las especies (inicio de la fase de desaceleración).

Tabla 8. Resultados de la evaluación de los cuatro productos de las fermentaciones, producidos por las especies *Lactobacillus* spp.

***Lactobacillus* spp.**	**Medio de fermentación (g/L)**	**Sobrenadante libre de células (g/L)**	**Productos de membrana. Azúcares reductores (g/L)**	**Suspensión de células. Biomasa (g/L)**
L. pentosus	Biomasa 1.75 Ac. Láctico 14.73 Glucosa 11. 153 Indoles 0.053	Ac. Láctico 14.75 Glucosa 11. 15 Indoles 0.034	0.31	1.75
L. bulgaricus	Biomasa 1.67 Ac. Láctico 14.67 Glucosa 8.622 Indoles 0.090	Ac. Láctico 14.67 Glucosa 8.62 Indoles 0.024	0.25	1.67
L. coryniformis	Biomasa 1.57 Ac. Láctico 16.48 Glucosa 10.30 Indoles 0.056	Ac. Láctico 16.48 Glucosa 41.35 Indoles 0.023	0.29	1.57
L. acidophilus	Biomasa 1.57 Ac. Láctico 16.48 Glucosa 10.30 Indoles 0.097	Ac. Láctico 16.48 Glucosa 10.30 Indoles 0.041	0.27	1.57
L. helveticus	Biomasa 1.58 Ac. Láctico 17.72 Glucosa 12.75 Indoles 0.042	Ac. Láctico 17.72 Glucosa 12.75 Indoles 0.027	0.32	1.58

3.4. Inhibición *in vitro*

3.4.1. Inhibición *in vitro* de *Fusarium oxysporum*

Durante 14 días, fueron evaluadas las dimensiones del micelio del hongo, para observar el comportamiento de crecimiento de *F. oxysporum* frente a la inoculación en el medio de los productos obtenidos de las fermentaciones por parte de las cinco especies de *Lactobacillus* spp.

Los resultados revelan un efecto negativo sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, encontrando diferencias entre las bacterias y los productos evaluados. El análisis del diseño experimental, propuesto para esta investigación, indicó diferencia significativa entre las cinco especies de *Lactobacillus* spp., respecto al área micelial que alcanzó el hongo en estos 14 días. La especie de mayor diferencia sobre el resto fue *L. pentosus* al obtener una área promedio de 13.7 cm^2, mientras que *L. coryniformis* presento un área promedio de 44.4 cm^2 (reducción del 69.1 % entre el promedio de las áreas entre estas especies); mientras que entre los productos, el análisis presentó que los cuatro productos presentan diferencia entre cada uno, por ejemplo el medio de fermentación exhibió la menor área micelial (25.3 cm^2), con respecto al resto de los productos, mientras que los productos de membrana fueron los tratamientos que presentaron el área mayor (42.9 cm^2), significando una diferencia en el área micelial 41.02 %, entre estos tratamientos.

El comportamiento de *F. oxysporum* es presentado en la figura 12, donde se muestra la efecto inhibitorio de los productos de las fermentaciones ácido lácticas; el producto de medio de fermentación de *L. pentosus* (Figura 12, gráfico A), impidió el crecimiento del hongo seguido de la especie *L. helveticus.* En cuanto al producto denominado como sobrenadantes libres de células (Figura 12, gráfico B), nuevamente *L. pentosus* presentó mayor efecto. En relación a los productos de membrana (Figura 12, gráfico C), las especies destacables fueron *L. pentosus* y *L. helveticus*. Por otro lado las suspensiones de células (Figura 12, gráfico D) de las especies *L. pentosus*, *L. helveticus* y *L. bulgaricus*, fueron las que redujeron el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, por encima de *L. acidophilus* y *L. coryniformis*.

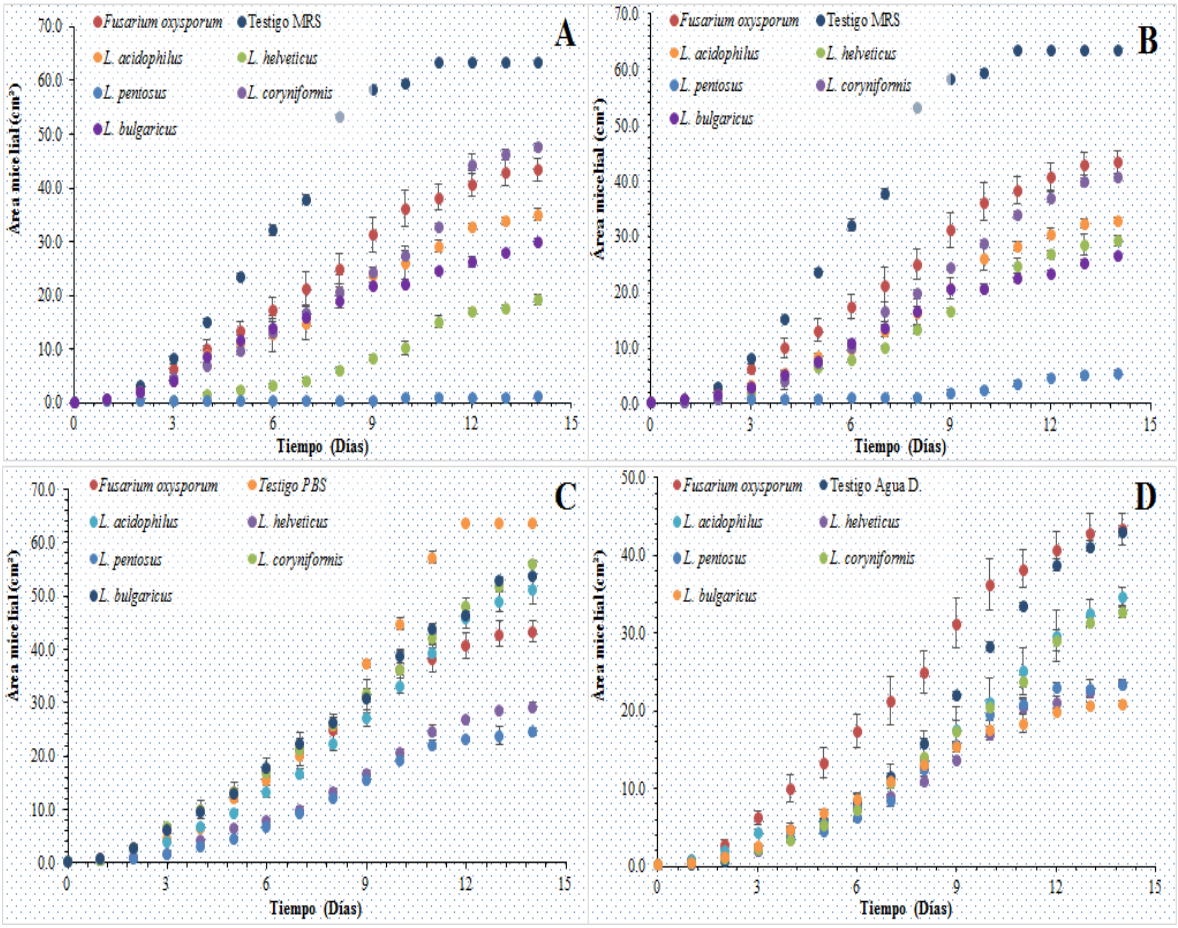


Figura 12. Cinéticas de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en medio sólido en pruebas *in vitro*. El gráfico A. corresponde a la aplicación de los medios de fermentación. El gráfico B involucra a los sobrenadantes libres de células. Gráfico C: presenta la aplicación de los productos asociados a membrana y el gráfico D: corresponde a las suspensiones de células.

A partir de los datos de crecimiento durante los 14 días que tuvo lugar la prueba de inhibición, fue posible encontrar altos porcentajes de inhibición por parte de los cuatro productos obtenidos de las fermentaciones ácido lácticas, estos resultados son presentados en la figura 13.

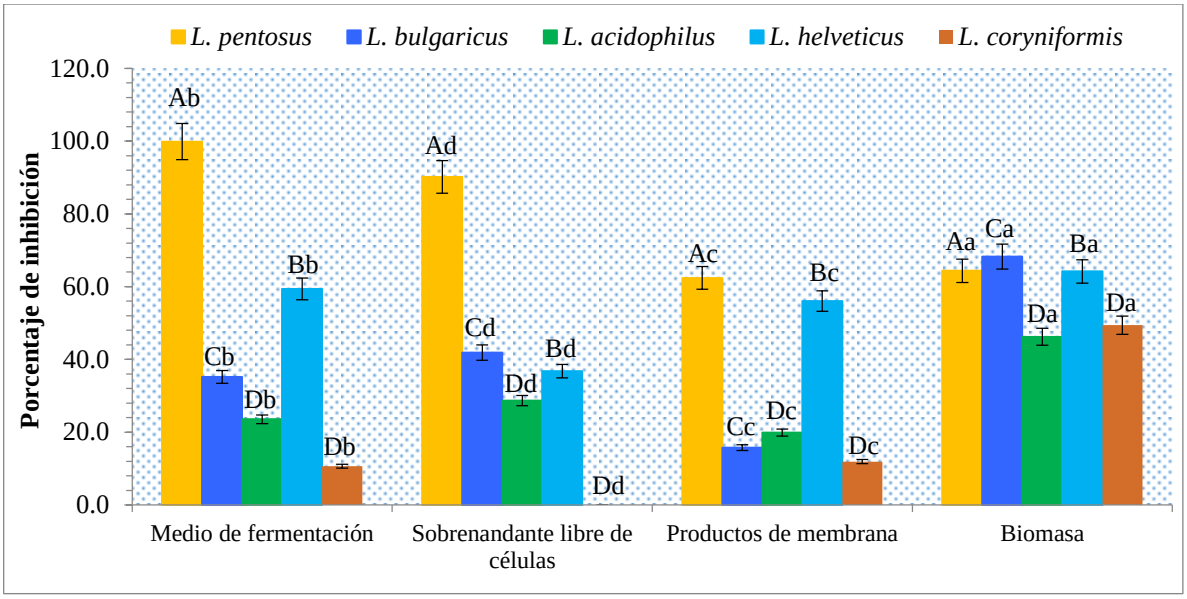


Figura 13. Porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum*. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey *p<0.05*) entre especies *Lactobacillus* spp. Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey *p<0.05*) entre los productos de la fermentaciones ácido lácticas.

Estadísticamente los tratamientos evaluados en esta ocasión exhiben efecto perjudicial sobre el crecimiento de *F. oxysporum*. De los tratamientos estudiados cabe destacar los porcentajes de inhibición especialmente de *L. pentosus*, así como *L. helveticus* y *L. bulgaricus*, especies que mostraron diferencia significativa sobre las otras dos especies. En el caso del análisis respecto a los productos de la fermentación, se encontró diferencia significativa entre los cuatro productos, el orden de relevancia fue con mayor porcentaje de inhibición las suspensiones celulares, seguidas por los medios de fermentación, los productos de membrana y los sobrenadantes libres de células.

Además de los altos porcentajes de inhibición, la morfología del hongo durante el periodo de prueba exhibió afectaciones en las características macroscópicas (área de micelio, pigmentación, apariencia y desarrollo de micelio aéreo) a las que presenta *Fusarium oxysporum* bajo condiciones normales. En la tabla 9, se muestran fotografías de los micelios de *F. oxysporum* por la incorporación de los productos de fermentación al medio, donde se puede visualizar anormalidades en la pigmentación del micelio, afectación en la producción de esporas por parte del hongo, reducción en la densidad del micelio en la superficie del agar.

Tabla 9. Características macroscópicas del micelio de *Fusarium oxysporum*, en la prueba de inhibición *in vitro*.

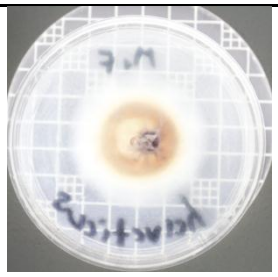
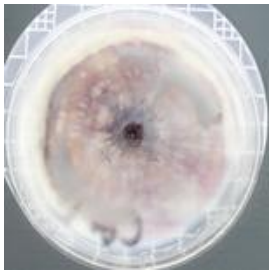
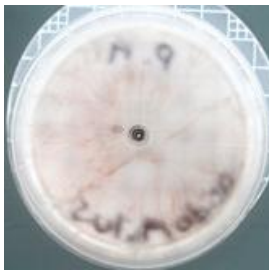
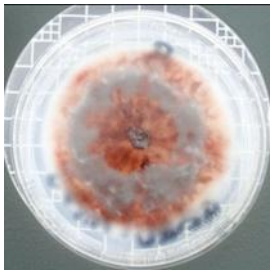
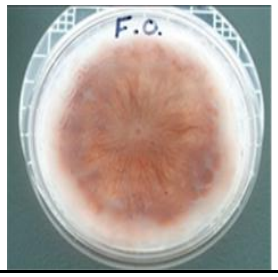
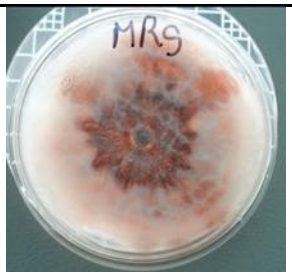
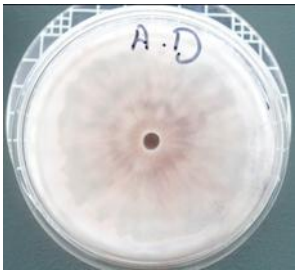
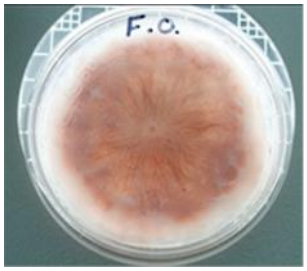
Tratamiento	Características del micelio	Vista macroscópica de *F. oxysporum*
Medio de fermentación	Crecimiento menor al alcanzado por los controles y demás tratamientos. La producción de pigmentos por parte del hongo se ve afectada de manera negativa.	
Sobrenadante libre de células	Producción micelio aéreo en los últimos días de la prueba y no en primeros días de prueba.	
Productos de membrana	Desarrollo de micelio débil, expansión del micelio a través de la matriz del agar; sin embargo alcanza su crecimiento normal por toda la placa.	
Suspensión de células	Producción de micelio aéreo y vegetativo en últimos días.	
Sin tratamiento	Micelio color salmón, producción de micelio aéreo en abundancia y con ello la producción de esporas.	

Tabla 9. ***Continuación***

Controles	Características del micelio	Vista macroscópica de *F. oxysporum*
MRS	Formación de micelio aéreo en abundancia; aumento en la producción de esporas.	
PBS	Crecimiento normal, formación de micelio en la superficie del agar, pigmentación morada. Producción de algodoncillo en la superficie.	
Agua destilada	Crecimiento normal, formación de micelio en la superficie del agar, pigmentación salmón.	
Fusarium oxysporum	Micelio color salmón, producción de micelio aéreo en abundancia y con ello la producción de esporas.	

Estos resultados sobre *Fusarium oxysporum* corresponden con los obtenidos por Mauch *et al*., (2010) respecto a la acción antifúngica de *Lactobacillus brevis* sobre *Fusarium culmurum*, al inhibir la capacidad de producción de micelio aéreo, también al afectar la densidad del micelio y presentando modificaciones en la coloración del micelio, debido a la acción sinérgica de sustancias como isómeros ópticos de ácido láctico, sustancias lipídicas como ácido cáproico, ácido fórmico, ácido propiónico, butírico y ácido n-valérico.

3.4.2. Inhibición *in vitro* de *Phytophtora capsici*

Respecto a la inhibición de uno de los agentes de la enfermedad denominada como la marchitez del chile, que involucra a los hongos *Fusarium oxysporum*, *Rizoctonia solani* y *Phytophtora capsici*. Este último fue incluido en este trabajo para generar la posibilidad de explorar el potencial de las bacterias ácidos lácticas, como agentes biocontrol, frente a este complejo de hongos, que ha provocado devastadoras y cuantiosas pérdidas en la productividad agrícola del chile.

Para el caso de *Phytophtora capsici*, se encontraron efectos importantes por parte de todas las especies de *Lactobacillus* spp., respecto a los medios de fermentación (Figura 14-A), los sobrenadantes libres de células (Figura 14-B) y la biomasa (Figura 14-D), no así por los productos asociados a membrana (Figura 14-C), estos últimos presentaron menor efecto sobre el resto de los productos. Entre las especies sobresalientes y sus productos de membrana fueron *L. pentosus*, *L. coryniformis* y *L. helveticus*.

El análisis estadístico de la prueba de inhibición sobre *Phytophtora capsici*, reveló diferencia significativa entre las especies *Lactobacillus* spp. estudiadas, donde *L. bulgaricus* y *L. acidophilus* (10.9 cm^2 y 10.6 cm^2) fueron las especies permitieron el desarrollo de *Phytophtora capsici*, a diferencia de *L. pentosus* que permitió el desarrollo micelial únicamente hasta 0.3 cm^2, significando una reducción del crecimiento alrededor de un 97 %, las especies *L. helveticus* y *L. coryniformis*, presentaron una reducción del área micelial del 64.6 % y 46.78 % respectivamente, respecto a la especie *L. bulgaricus*.

Mientras que el análisis con relación a los productos de las fermentaciones ácido lácticas obtenidos de cada una de las especies *Lactobacillus* spp., donde se encontró diferencia estadística entre ellos. Los productos que mostraron actividad inhibitoria *in vitro* significativa fueron los productos denominados como medios de fermentación, sobrenadantes libres de células y las suspensiones celulares (biomasa). Que además se encontraron reducciones hasta un 98.7 %, respecto al área micelial promedio que se desarrolló cuando son aplicados los productos de membrana (24.3 cm^2).

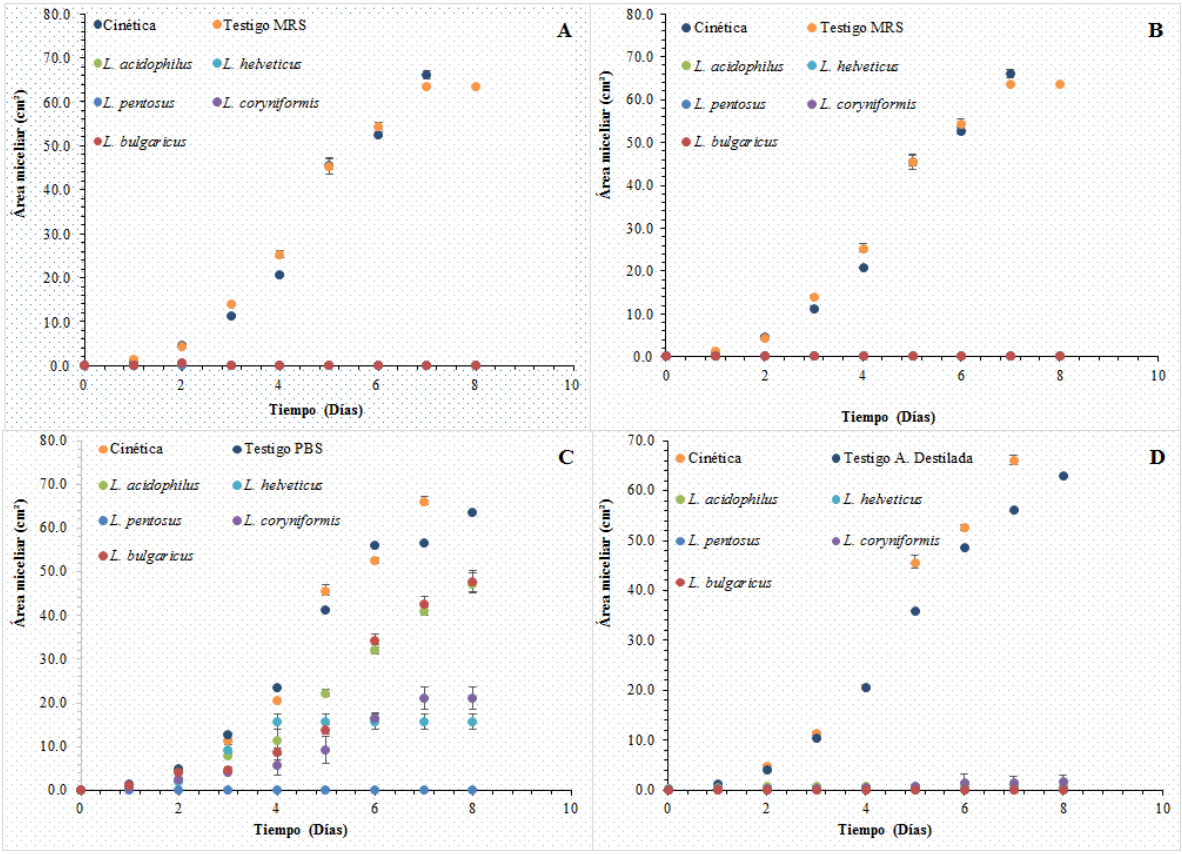


Figura 14. Efecto de los productos de las fermentaciones ácido lácticas, en el crecimiento de *Phytophtora capsici*. A: Medios de fermentaciones. B: Sobrenadantes libres de células. C: Productos asociados a membrana. D: Suspensiones de células.

En la figura 15 se muestran las placas de Petri, que incluyen en la matriz de agar los productos de fermentaciones obtenidos a partir del crecimiento de las cinco especies de *Lactobacillus* spp., donde se aprecia la incapacidad de *Phytophtora capsici* de desarrollar micelio sobre estas condiciones.

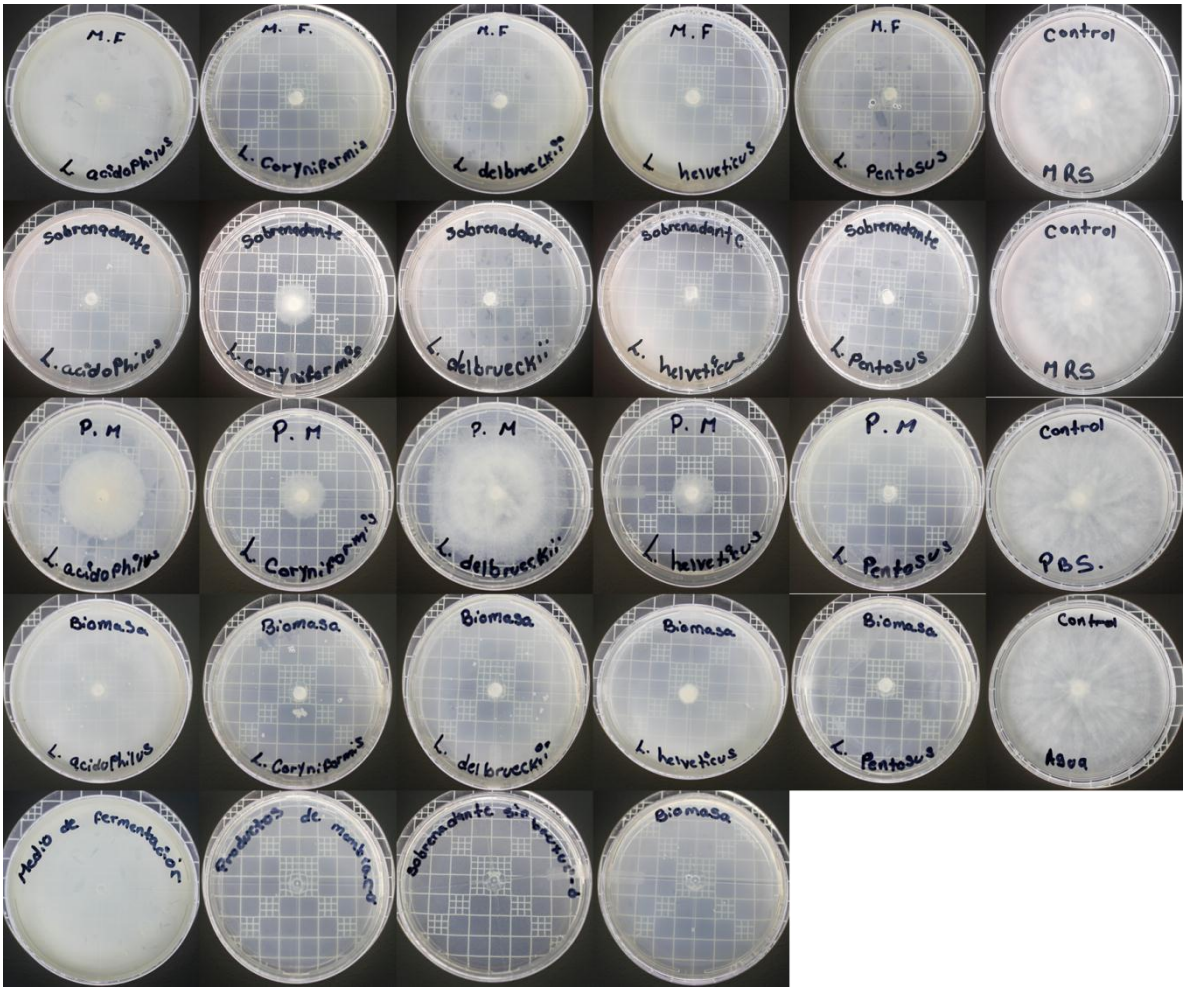


Figura 15. Inhibición del crecimiento de *Phytophtora capsici* utilizando los productos de las fermentaciones ácido lácticas.

El potencial de las bacterias ácido lácticas y los productos obtenidos de las fermentaciones de las especies *Lactobacillus* spp., demuestran la capacidad de producir un efecto negativo en el crecimiento de los hongos fitopatógenos probados en este trabajo (*Fusarium oxysporum* y *Phytophtora capsici*), que puede ser imputada por la liberación de metabolitos con acción antifúngica reconocida como el ácido difeniláctico y 4-hidroxifeniláctico, sustancias citadas por Matei y Cornea (2014), que estudio 27 especies de BAL sobre hongos fitopatógenos como *Penicillium digitatum* y *Aspergillus ochraceus*.

Los mecanismos de inhibición pueden llegar a ser, además de las sustancias antes mencionadas, la producción de otros ácidos orgánicos que al ingresar a espacio citoplasmático producen una disociación, provocando un descenso del pH intracelular y con ello un gradiente de protones, lo cual inhibe la producción de moléculas como el ATP, por la incapacidad de equilibrar este gradiente o por la alteración de rutas metabólicas; este fenómeno fue observado en levaduras, donde al bajar el pH intracelular, se vio inhibida la ruta de glucolisis (Adeniyi y Damsa, 2011). Otro de los posibles mecanismos de actividad antifúngica que pudiesen haberse presentado en este estudio es el documentado por Gerez *et al*., (2010) que mencionan al ácido difeniláctico como el agente involucrado al inhibir actividad enzimática de fenilalanina deshidrogenasa (enzima involucrada en la síntesis de nucleótidos), de igual manera hacen referencia a la peculiar estructura química que presenta similitud a ciertos péptidos antifúgicos como lo la fenilalanina-prolina-4-OH-prolina producida por *L. plantarum*.

Los resultados de actividad antifúngica por los productos producidos por las especies *Lactobacillus* spp., son similares a los obtenidos por Wang *et al*., (2011), que evaluaron la especie *L. plantarum*, encontrando hasta un 100 % de inhibición de *Phytophtora drechsleri* Tucker; mientras que en la revisión publicada por Axel *et al*., (2012) hacen mención a sustancias producidas por especies *Lactobacillus* spp. que afectan el desarrollo de oomicetos (grupo al que pertenece este hongo) como lo son el ácido 3-feniláctico, ácido benceniacético y el 2-propenil-ester. Siendo así, estos productos encontrados en los sobrenadantes producidos por *L. plantarum*, cabe la posibilidad de que las especies estudiadas produzcan en concentraciones variables este tipo de sustancias que presentan efecto significativo sobre *Phytophtora* spp.

En resumen, los efectos de inhibición *in vitro* de las especies de bacterias ácido lácticas y sus productos, presentan la oportunidad de realizar estudios en la evaluación de actividad antagónica sobre estos hongos fitopatógenos y realizar pruebas *in vivo*, para estudiar la acción biocontrol para reducir enfermedades de marchitez, en plantas como tomate, pimiento, berenjena, etc., cultivos que son susceptibles a una infección fúngica.

De los cuatro productos obtenidos para este estudio, los medios de fermentación, los sobrenadantes libres de células y las suspensiones celulares mostraron potencial antifúngico. Sin embargo habrá que realizar un análisis de la composición bioquímica de cada uno, para tratar de elucidar los mecanismos ejercidos sobre el desarrollo del hongo y las afectaciones biológicas y moleculares que pudiesen llegar a efectuarse.

3.4.3. Inhibición *in vitro* de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Se encontraron resultados alentadores por parte de las bacterias ácido lácticas *Lactobacillus helveticus* y *L. pentosus*, presentando una mayor inhibición, a diferencia de las especies *L. coryniformis* y *L. bulgaricus*, siendo la excepción *Lactobacillus acidophilus*, bacteria láctica que no presentó actividad antimicrobiana sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Figura 16). Mientras que el porcentaje de inhibición, presentó diferencia significativa entre aquellos productos que mostraron acción antimicrobiana frente a *Cmm*, siendo los medios de fermentaciones y la biomasa (Figura 17).

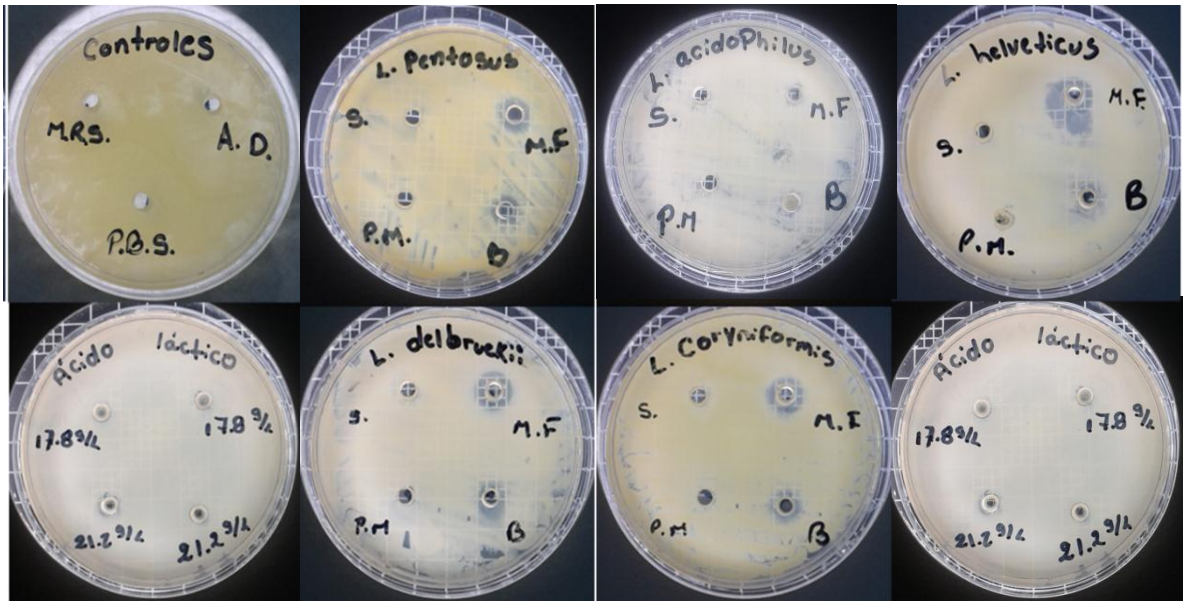


Figura 16. Halos de inhibición de *Cmm* por los productos de fermentación ácido láctica. MF*:* Medio de fermentación. S: Sobrenadante libre de células, PM: Productos de membrana y B: Suspensión de células de bacterias ácido lácticas.

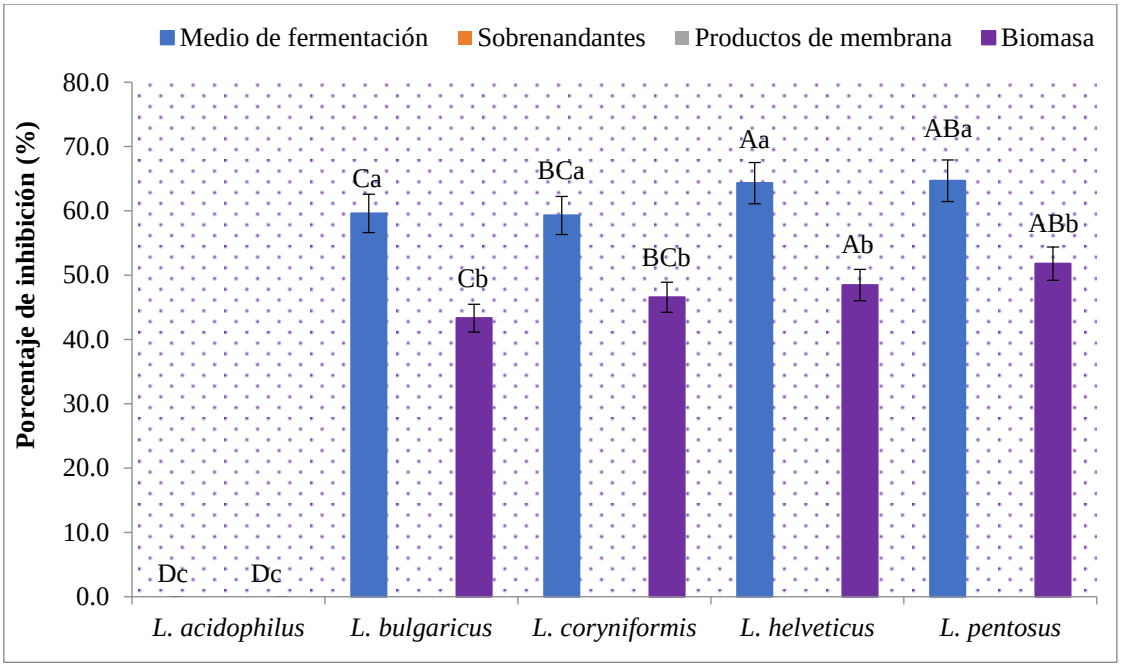


Figura 17. Porcentaje de inhibición *in vitro* de los productos de las fermentaciones lácticas de las especies *Lactobacillus* spp., contra *Cmm* cepa IFO. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey $p<0.05$) entre las cinco especies *Lactobacillus* spp. Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey $p<0.05$) entre los productos de la fermentación ácido láctica. Barras de error del 5 %.

El análisis de los datos, revela diferencia significativa entre las especies de *Lactobacillus* spp., encontrando efecto significativo, por las especies *L. pentosus* y *L. helveticus*, que alcanzaron inhibiciones superiores al 60 %, mientras que las especies *L. bulgaricus* y *L. coryniformis*, consiguiendo porcentajes cercanos al 50 % y que mostraron diferencia estadística respecto a *L. acidophilus*, especie que no presento inhibición de *Cmm*. En relación a los productos nuevamente se encontró diferencia significativa entre aquellos que mostraron inhibición, encontrando que los medios de fermentaciones presentan efecto superior al de las suspensiones celulares, lo que *a priori* puede ser considerado como un efecto sinérgico entre los medios de fermentación y las bacterias.

Además los experimentos en la prueba de difusión en agar indicaron que *Cmm* cepa IFO, presentó tolerancia a concentraciones de ácido láctico de 17 g/L – 22 g/L, ya que no mostraron inhibición, actividad que se esperaba por parte de los sobrenadantes libres de células que contenía este compuesto en abundancia.

Tomando en cuenta la inhibición obtenida en la prueba de difusión en agar, se puede inferir que el medio de fermentación, incluye componentes además de ácido láctico, cuya acción antimicrobiana de estos se ve afectada después de la esterilización.

En las figuras 18 y 19, se presentan las cinéticas de inhibición *Cmm* en caldo NBY, donde no se encontró una inhibición total del crecimiento por parte de las bacterias lácticas y los metabolitos que están presentes, lo que reafirma la inhibición en la prueba de difusión en pozos, donde el ácido láctico no presenta efecto sobre el agente fitopatógeno, descartando así una acidosis de *Cmm*.

En caldo NBY el comportamiento del crecimiento de *Cmm*, al ser incorporado junto al producto de prueba (medios de fermentaciones y suspensiones de células) de las cuatro especies ácido lácticas, que mostraron actividad en medio sólido, dejan ver la capacidad de disminuir la población de *Cmm* inicial (6.4 X 10^7 UFC/mL) hasta una concentración de 2.7 X 10^5 UFC/mL (por ejemplo el medio de *L. pentosus*), que significa una reducción del 99.57 % (acción significativa). Además los resultados presentan semejanzas, para las cuatro especies y los dos productos sometidos a prueba.

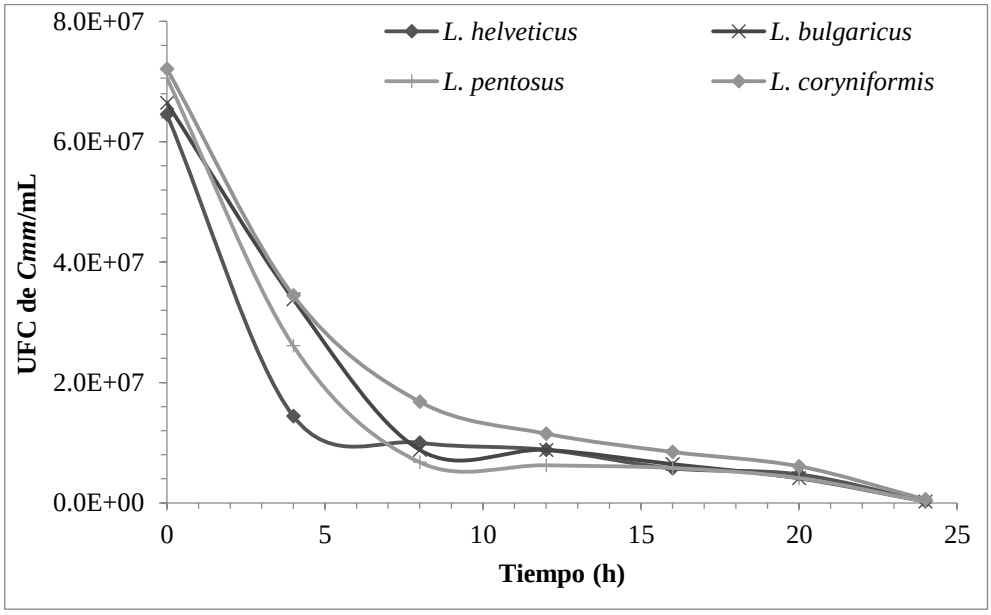


Figura 18. Inhibición de *Cmm* en medio líquido, por los medios de fermentación de las especies *Lactobacillus* spp.

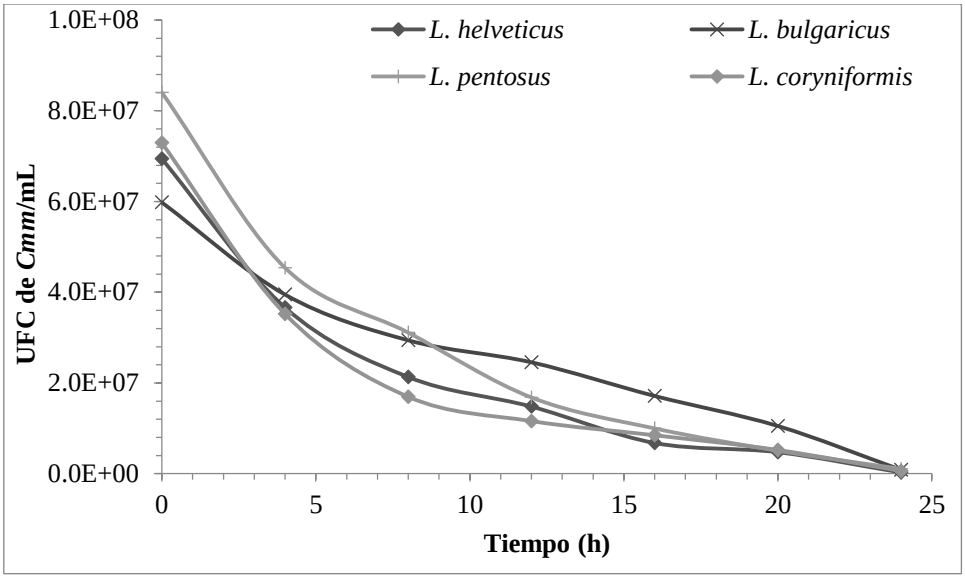


Figura 19. Inhibición de *Cmm* en medio líquido, por las suspensiones de células de *Lactobacillus* spp.

En las pruebas *in vitro* frente a *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (agente causal del cáncer bacteriano), las BAL y sus productos de las fermentaciones estudiados demuestran la capacidad de llevar a cabo mecanismos de antagonismo como la competencia de nutrientes, secreción de metabolitos de acción antimicrobiana cuya diversidad química involucra a bacteriocinas, sustancias de estructura carboxílica albergando los ácidos orgánicos como ácido láctico, ácido acético, productos de estructura lipídica ejemplificando a ácido butírico y los componentes de estructura mixta.

La inhibición presentada, por parte de los productos en gran medida puede ser explicada por la acción de las bacteriocinas excretadas por las bacterias lácticas (Shrestha *et al*., 2009A), donde estas moléculas muestran acción antimicrobiana particularmente frente a bacterias Gram positiva, como es el caso de nisina y pediocina; donde se ha reportado a nisina como la bacteriocina que afecta en mayor medida a bacterias Gram positivo pero que presenta una termoestabilidad cercana a 115 °C (Piard y Desmazeaud, 1992). Además cabe hacer mención que al momento de la cosecha de los productos de prueba para este trabajo fueron en el instante cuando las bacterias entraron a la fase estacionaria de crecimiento, siendo este momento, cuando estos autores mencionan que ocurre la biosíntesis de bacteriocinas, por parte de las bacterias ácido lácticas.

Por el lado contrario no se encontró acción antimicrobiana por los productos sobrenadante libre de células y productos asociados a membrana; en el caso de estos últimos se han reportado actividades antimicrobianas por la presencia de biosurfactantes (Gudiña *et al*., 2010; Gomaa, 2013; Sharma *et al*., 2014), sin embargo en este trabajo no fue así, posiblemente a bajas concentraciones de dichos componentes, mientras que en el caso de los sobrenadantes libres de células, el tratamiento de esterilización pudo llegar a ser muy severo y dañó estructuralmente y por ende la erradicación de su actividad antimicrobiana.

En el caso del comportamiento cinético de *Cmm* frente a estos dos productos, en medio líquido, los mecanismos involucrados en estos estudios pueden ser la competencia de la fuente de carbono. Los comportamientos muestran la incapacidad de *Cmm* de crecer en presencia de los productos de prueba, la disminución de la población de la bacteria patógena se da dentro de las 24 horas y este resultado corresponde al presentado por Visser *et al*., 1986, en las pruebas con *Lactobacillus plantarum* al ser inoculado junto a *Pseudomonas syrigae* var. *capsici*, donde la bacteria fue inhibida en un tiempo menor a las 24 horas en caldo NBY, logrando una inhibición total de la bacteria, a diferencia de esta investigación que no fue se encontró una mortalidad completa de *Cmm*; mientras que en el caso de la investigación dirigida por Anyogu *et al*., (2013), en fermentaciones controladas de yuca, inoculadas con *L. plantarum*, con inoculaciones de 2.0 $X10^7$ UFC/ml de *Bacillus cereus* (Gram positivo al igual que *Cmm*), después de 24 horas encontró concentraciones de 5.0 $X10^3$ UFC/ml, mostrando una inhibición del 99.97 % de la población de esta bacteria.

3.5. Actividad biocontrol en tomate

3.5.1. Actividad biocontrol sobre *Fusarium oxysporum*

Las pruebas de biocontrol que comprendieron el tratamiento foliar preventivo, a hojas de tomate *saladette* y su posterior inoculación con *Fusarium oxysporum*, revelaron la capacidad de protección de los productos de la fermentación láctica del tejido vegetal, al impedir el desarrollo del hongo y la diseminación de la enfermedad en la planta (Figura 20).

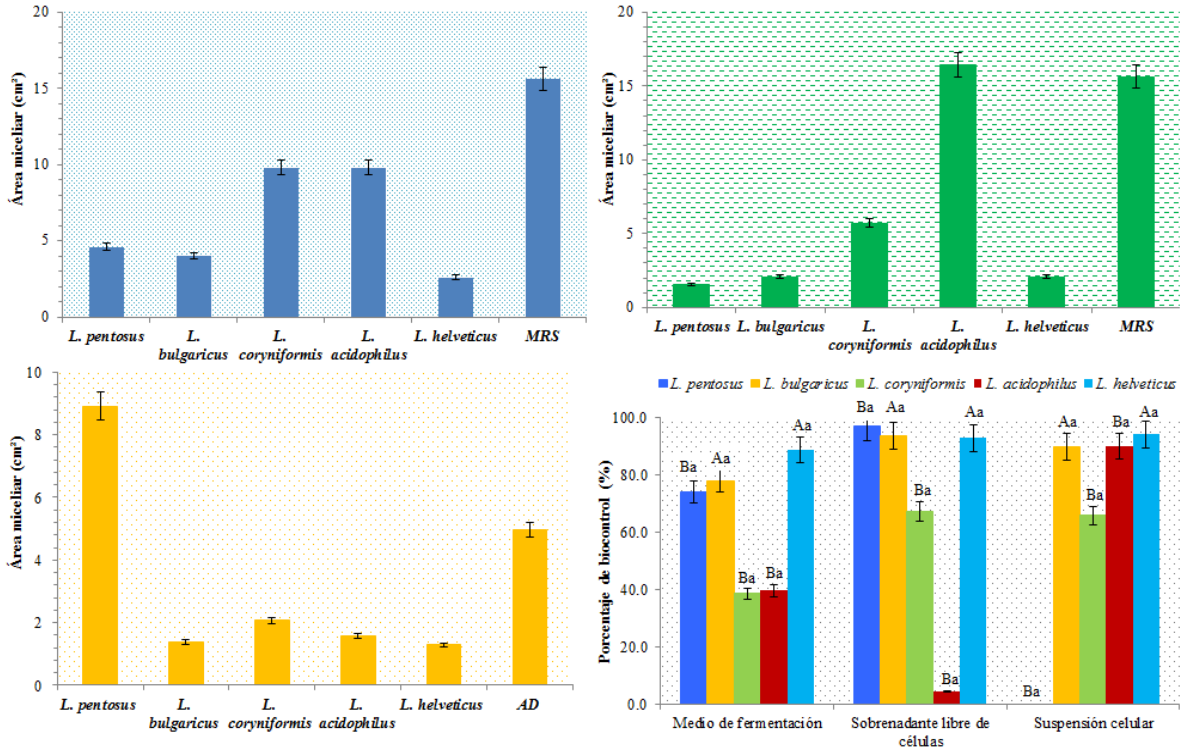


Figura 20. Actividad biocontrol de los productos de las fermentaciones sobre el crecimiento *F. oxysporum* en hojas de tomate *saladette*. Gráfico A áreas miceliales cuando son aplicados los medios de fermentaciones de BAL. Gráfico B áreas miceliales cuando son aplicados los sobrenadantes libres de células. Gráfico C, áreas miceliales cuando son aplicadas las suspensiones de células. Gráfico D, porcentajes de biocontrol de los tres productos de las fermentaciones de las cinco especies *Lactobacillus* spp. Barras de error del 5 %. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey $p<0.05$) entre las especies *Lactobacillus* spp. Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa (Tukey $p<0.05$) entre los productos de la fermentación ácido láctica. Barras de error del 5 %.

Los tratamientos evaluados presentaron la capacidad de reducir y en algunos casos imposibilitar el desarrollo del hongo sobre las superficies vegetales (Tabla 10); esto pudo deberse a una posible formación de un biofilm compuesto por componentes metabólicos, excretados por las bacterias lácticas y que dicha protección afecta el reconocimiento del hospedero, aumentando la resistencia física que comprende a las estructuras preformadas como la cutícula y epidermis; estos resultados presentan semejanza a los obtenidos en sus ensayos utilizando a *Lactobacillus plantarum* frente a la infección de hojas de tomate por *Botrytis cinerea* documentados por Wang *et al*., (2011).

De un total de quince tratamientos de prueba cuatro de ellos estadísticamente no muestran significancia (los medios de fermentación de *L. acidophilus* y *L. coryniformis*, al igual que el sobrenadante de *L. acidophilus* y la suspensión de células de *L. pentosus*). El resto de los tratamientos presentan diferencia significativa sobre estos tratamientos.

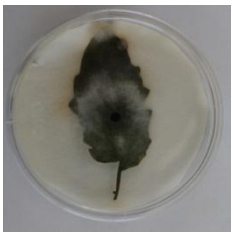
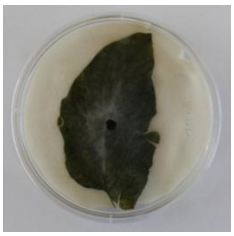
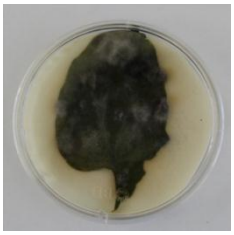
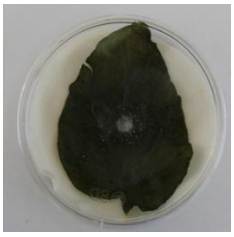
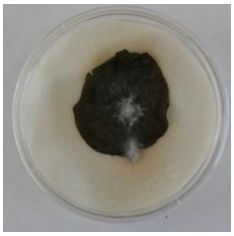
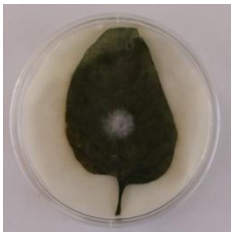
El análisis estadístico del diseño de experimental, reveló que las especies *L. helveticus* y *L. bulgaricus* fueron las que alcanzaron el mayor porcentaje de biocontrol foliar (87.2 % y 92.0 % respectivamente), a diferencia del biocontrol alcanzado por *L. coryniformis*, *L. pentosus* y *L. acidophilus* (57.3 %, 57.1 % y 44.8 %).

El resultado del análisis de los tres productos de prueba (medios de fermentaciones, sobrenadantes libres de células y suspensiones celulares), no presentaron diferencia estadística entre ellos, alcanzando valores promedio de biocontrol de 63.8 %, 71.1 % y 68.1 %.

Por lo que a manera de resumen los productos de mayor efectividad para inhibir el desarrollo del hongo, son las especies *L. helveticus* y *L. bulgaricus*, especies que mostraron altos porcentajes de biocontrol en los tres productos de su fermentación. En el caso de los productos de *L. pentosus* puede ser incluido como un agente biocontrol contra *F. oxysporum*, siempre y cuando sea aplicado el medio de fermentación y/o el sobrenadante libre de células, ya que los resultados muestran que las células por si solas no impiden su desarrollo.

Y en lo general los resultados muestran la posibilidad de utilizar a las bacterias ácido lácticas (especies *Lactobacillus* spp.) y los productos de su metabolismo como agentes de biocontrol preventivo frente a *Fusarium oxysporum*.

Tabla 10. Actividad de biocontrol de *Fusarium oxysporum* por los productos de las fermentaciones ácido lácticas en hojas de tomate.

	Medio de fermentación	Sobrenadante libre de células	Suspensión de células
L. pentosus			
L. coryniformis			
L. acidophilus			
L. bulgaricus			
L. helveticus			

Controles

Agua destilada	MRS	Positivo de infección	Negativo

3.5.2. Actividad biocontrol sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Cinco días posteriores a la inoculación bacteriana de *Cmm*, en tallo (punción e inyección), raíz y foliar, la infección fue corroborada por la prueba DAS-ELISA (Agdia®), al colectar muestras de tallo y hojas, para su posterior análisis con la prueba inmunológica, obteniendo así la placa de ELISA (Figura 21), donde se muestran aquellos pozos donde ocurrió la reacción de antígeno-anticuerpo específica para *Cmm*, para asegurar que los síntomas y la interpretación del nivel de severidad alcanzado, fue causado por la infección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cepa IFO y no por alguna fisiopatía por un exceso o una deficiencia de nutrientes durante el tiempo de la prueba.

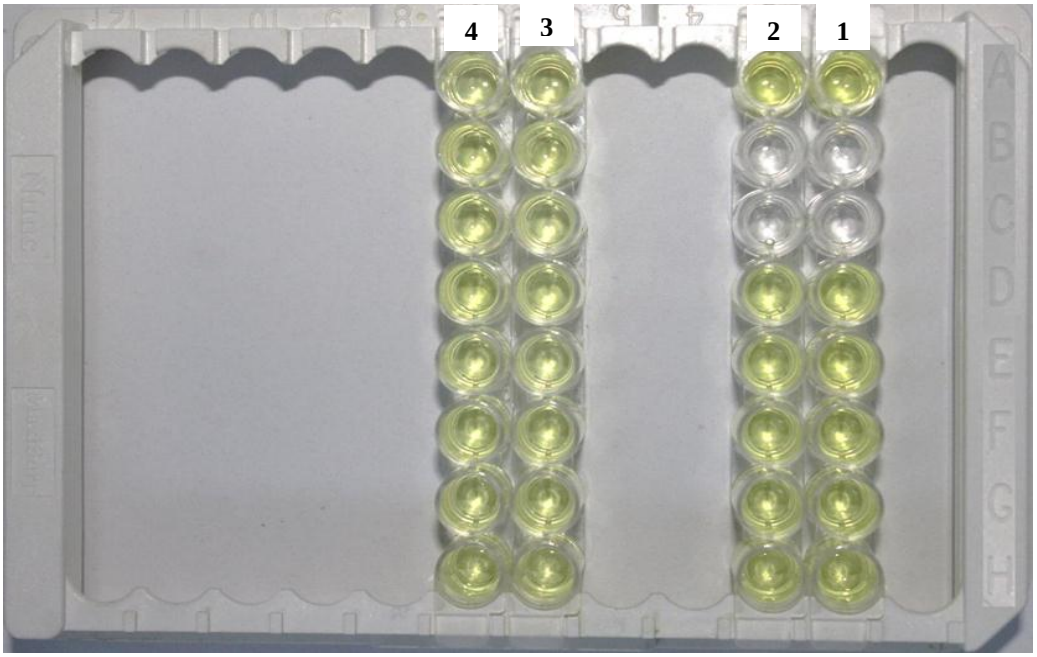


Figura 21. Análisis DAS-ELISA, como indicativo de la detección de *Cmm*. Columna 1-Fila A: Control positivo para *Cmm* de Agdia® (Producto LPC 44000). Columna 1-Fila B: Control Negativo de procedimiento (buffer de extracción). Columna 1-Fila C: Muestra de plantas control negativo de infección. Columna 1-Fila D: Muestra de plantas control positivo de infección. Columna 1- Fila E: Infección positiva-control de MRS. Columna 1-Fila F: Infección positiva- control de agua destilada. Columna 1-Fila G: Infección positiva –P1. *L. helveticus*. Columna 1-Fila H: Infección positiva –P4. *L. helveticus*. Columna 2 corresponde a réplicas. Columna 3- Fila H: Infección positiva –P1. *L. pentosus*. Columna 3-Fila G: Infección positiva –P4. *L. pentosus*. Columna 3-Fila F. Infección positiva –P1: *L. bulgaricus*. Columna 3- Fila E: Infección positiva –P4. *L. bulgaricus*. Columna 3-Fila D: Infección positiva –P1. *L. coryniformis*. Columna 3- Fila C: Infección positiva –P4. *L. coryniformis*. Columna 3- Fila B: Infección positiva – P1 *L. acidophilus*. Columna 3- Fila A: Infección positiva – P4. L. *acidophilus*. La columna 4 corresponde a las réplicas.

De veinte tratamientos probados inicialmente, solo dos productos obtenidos por cada especie *Lactobacillus* spp. fueron seleccionados por sus resultados *in vitro*, para el estudio de biocontrol; siendo únicamente los que en pruebas de difusión en agar mostraron inhibición, incluyendo a *L. acidophilus* aun cuando *in vitro* no presentó dicha inhibición, esta especie fue incluida en este estudio para averiguar el comportamiento de interacción con el patógeno y la planta, organismo de importancia para pruebas *in vivo* y que no está presente en las pruebas *in vitro*.

De las cinco especies *Lactobacillus* spp., cuatro de ellas fueron capaces de reducir significativamente la severidad de la enfermedad por debajo del control de infección con *Cmm*, control que alcanzó una severidad de 7 (síntoma con afectación sistémica por el patógeno). Los niveles promedio de severidad más bajos fueron de 1. 6 y 1.8, donde solo se observó debilidad de la planta y la presencia de lesiones blancas en los foliolos. En conjunto los valores de severidad presentan efectividad de biocontrol hasta del 78.3 %. Mientras que respecto a la variable de incidencia de síntomas relacionados a *Cmm*, en el control se observó en un 100 % de los individuos, mientras que en el resto de los tratamientos la incidencia fue reducida hasta un 58 % (Tabla 11).

Las cuatro especies destacables en este estudio resultaron ser *L. bulgaricus*, *L. coryniformis*, *L. pentosus* y *L. helveticus*. En relación a los productos no se encontró diferencia estadística entre ellos. Donde en el caso del producto denominado como medio de fermentación las especies de mayor efectividad fueron *L. coryniformis* y *L. helveticus*, mientras que en el producto de suspensiones celulares, presentaron mayor efectividad las especies *Lactobacillus coryniformis* y *L. pentosus*. mientras que los productos de *L. bulgaricus*, no presentaron diferencia estadística significativa entre ellos (Tabla 11).

Los mejores tratamientos de biocontrol resultaron ser los medios de fermentación de las especies de *L. pentosus*, *L. helveticus*, *L. coryniformis* y *L. bulgaricus*, mientras que para la suspensión de células fueron *L. coryniformis*, *L. helveticus* y *L. pentosus*.

Tabla 11. Actividad biocontrol de los productos de las fermentaciones ácido lácticas de las especies *Lactobacillus* spp.

Tratamiento*	Producto**	Severidad Media ± D.E.	Biocontrol (%)	Incidencia (%)
Control (+)		7.33 ± 0.82		100.00
Control MRS		7.33 ± 0.58		100.00
Control A.D.		7.67 ± 0.58		100.00
L. acidophilus	Medio de fermentación	4.67 ± 0.89^{Aa}	36.4^{Ca}	91.67
	Suspensión células	6.42 ± 1.00^{Aa}	16.3^{Ca}	100.00
L. bulgaricus	Medio de fermentación	3.75 ± 2.70^{Ba}	48.9^{Ba}	75.00
	Suspensión células	2.42 ± 1.56^{Ba}	68.5^{Ba}	75.00
L. coryniformis	Medio de fermentación	2.50 ± 1.45^{BCa}	65.9^{ABa}	83.33
	Suspensión células	2.17 ± 1.11^{BCa}	71.7^{ABa}	83.33
L. helveticus	Medio de fermentación	1.83 ± 1.47^{Ca}	75.0^{Aa}	58.33
	Suspensión células	1.67 ± 1.30^{Ca}	78.3^{Aa}	75.00
L. pentosus	Medio de fermentación	3.17 ± 1.70^{BCa}	56.8^{ABa}	83.33
	Suspensión células	1.67 ± 1.15^{BCa}	78.3^{ABa}	75.00
Control (-)		0.00 ± 0.00		0.00

*Letras mayúsculas diferentes en columna, indican diferencia estadística significativa (Tukey $p<0.05$) entre las especies *Lactobacillus* spp.

**Letras minúsculas diferentes en columna, indican diferencia estadística significativa (Tukey $p<0.05$) entre los productos de la fermentación ácido láctica.

La actividad biocontrol de *Cmm* por parte de los tratamientos utilizados en esta investigación, fue 10 % más al respecto del uso de *L*. PD03 que alcanzo 66 % de actividad biocontrol en plantas de tomate inoculadas con *Ralstonia solanacearum* (Shrestha *et al*., 2009 B). Mientras los obtenidos para esta investigación superan en un 5 % a los obtendios en el trabajo del 2014 de estos autores al estudiar tres bacterias ácido lácticas contra *X. campestri* pv. *vesicatoria* en pimiento (Tabla 12), además que en comparación con tratamientos con alcaloides en el estudio de *Li et al*., (2013), los resultados de biocontrol de esta investigación fueron ligeramente superiores. Considerando así el uso de *Lactobacillus* spp. como agentes biocontrol de *Cmm*.

Tabla 12. Comparación de la actividad biocontrol.

	Shrestha *et al*., 2009 (B)		Esta investigación	Shrestha *et al*., 2014	Li *et al*. 2013
Patógeno	*R. solanacearum*		*Cmm*	*X. campestri* pv. *Vesicatoria*	*Cmm*
Condiciones	Invernadero		Invernadero	Invernadero	Invernadero
Cultivo	Tomate	Pimiento	Tomate	Pimiento	Tomate
Agente y Biocontrol (%)	*L*. KLF01 63.6 *L*. KLC02 48.2 *L*. PD01 66.4 *L*. KPB3 34.4	*L*. KLF01 71.8 *L*. KLC02 71.8 *L*. PD01 71.9 *L*. KPB3 34.4	*L. acidophilus* 36.4 y 16.3 *L. bulgaricus* 68.5 y 48.9 *L. coryniformis* 65.9 y 71.7 *L. helveticus* 75.0 y 78.3 *L. pentosus* 56.8 y 78.3	*L*. KLF01 73.9 *L*. KLC02 57.5 *L*. PD01 62.1	Alcaloides de piperidina (Trat. 1) 60.0 - 71.7 Alcaloides de piperidina (Trat 2) 67.15 - 70.89

Realizando un comparativo con respecto al uso de compuestos químicos para el control de la enfermedad, los resultados obtenidos fueron destacables sobre compuestos derivados de cobre que son presentados en la tabla 13. Por ejemplo a diferencia a los obtenidos por Li *et al*., 2013, los resultados de biocontrol por las especies *Lactobacillus* spp., presentan una eficiencia superior al obtenido por estos autores del 1 % hasta 18 % aproximadamente, pero a diferencia de los resultados en dos variedades de tomate utilizadas por Bastas (2014), los valores de control de la enfermedad superan a los obtenidos por este autor al utilizar sulfato de cobre pentahidratado, hidróxido de cobre y peróxido de cobre que alcanzaron valores de 12.15 % hasta 43.34 %; mientras que los medios de fermentación de *L. helveticus* y *L. pentosus* (78.3 %), los superan con 34.96 hasta 66.15 % aproximadamente.

Tabla 13. Control químico y biológico de *Cmm*.

	Bastas, 2014		Esta investigación	Li *et al*. 2013
Patógeno	*Cmm*		*Cmm*	*Cmm*
Condiciones	Invernadero		Invernadero	Invernadero
Cultivo	Tomate (1)	Tomate (2)	Tomate	Tomate
Control de la enfermedad (%)	Sulfato de cobre pentahidratado		*L. acidophilus*	Alcaloides de piperidina (Trat. 1)
	28.26	25.18	36.4 y 16.3	60.0 - 71.7
	Peróxido de hidrogeno		*L. bulgaricus*	Alcaloides de piperidina (Trat 2)
	43.34	36.61	68.5 y 48.9	67.15 - 70.89
	Oxicloruro de cobre		*L. coryniformis*	
	22.14	20.54	65.9 y 71.7	
	Hidróxido de cobre		*L. helveticus*	
	16.57	12.15	75.0 y 78.3	
	Estreptomicina		*L. pentosus*	
	95.65	95.94	56.8 y 78.3	

Asimismo los productos de las fermentaciones ácido lácticas mostraron la capacidad de reducir la incidencia de la enfermedad de un 100 % obtenido por el control hasta un 58.33 % por el medio de fermentación de *L. helveticus*. Los resultados de incidencia fueron altos en comparación con otras investigaciones que han tratado de entorpecer el patosistema tomate-*Cmm*, mediante el uso de agentes biológicos y químicos (Tabla 14), donde han encontrado incidencias hasta de 0.0 % mediante el uso de estreptomicina (Hausbeck *et al*. 2000). Mientras que en comparación con los tratamientos utilizados por Ingram *et al*., (2007), los medios de fermentación de *L. helveticus* y *L. pentosus* presentan un 5 y 10 % por debajo a los obtenidos por la aplicación de productos como el firewall y kasumin; pero las incidencias obtenidas por las bacterias ácido lácticas y sus productos fueron superiores a las reportadas por Boudyach *et al*., (2001), que obtuvieron valores de 10 % de incidencia en plántulas de tomate inoculadas con microorganismos antagonistas aislados de suelos agrícolas.

Tabla 14. Incidencia *Cmm* en pruebas de control químico y biológico

	Esta investigación	Hausbeck *et al*. 2000*		Boudyach *et al*., 2001**	Ingram *et al*., 2007***
Cultivo	Tomate	Tomate		Tomate	Tomate
Condiciones	Invernadero	Invernadero		Invernadero	Invernadero
Incidencia/Tratamiento (%)	Control	Control		HF13	Control
	100	10	30.83	10	67.5
	L. bulgaricus	Mancozeb		HF110	Kasumin
	75	33.33	41.66	10	68.8
	L. coryniformis	CuOH			Firewall
	83.33	1.66	0		63.4
	L. helveticus	Estreptomicina			Prophyt
	58.33 – 75	0	1.66		63.8
	L. pentosus	Estrep.+ CUOH			Agriphage
	58.33 – 75	0	4.167		67.5

* Incidencia determinada en grupos de 12 plantas cada uno.

** Porcentaje de infección de plantas de tomate.

*** Plantas que presentaron necrosis intervenal.

Además de las respuestas de severidad, incidencia y biocontrol, el estudio fisiológico mostró beneficios en aquellas plantas que aparte de la infección con *Cmm* recibieron como tratamiento alguno de los productos de las especies *Lactobacillus* spp., por ejemplo los productos de *L. acidophilus* y *L. coryniformis* favorecieron la altura de la planta, la longitud y peso seco de raíces (Figuras 22, 23 y 24); mientras que el medio de fermentación de *L. pentosus* contribuyó en menor proporción a la altura de la planta, al igual que los productos de *L. helveticus*.

Por el contrario las plantas que recibieron la inoculación radicular de *Cmm* y algún tratamiento control (caldo MRS, agua destilada), su desarrollo radicular fue mermado en comparación con productos de las fermentaciones ácido lácticas, que favorecieron su desarrollo (Figuras 25, 26 y 27). Lo anterior demuestra la capacidad de estos productos de favorecer el desarrollo de la planta, al mismo tiempo desempeñar un efecto biocontrol por la reducción de afectaciones por parte del patógeno, exhibiendo potencial para ser utilizados como agentes promotores del crecimiento vegetal.

Figura 22. Efecto de los medios de fermentaciones ácido lácticas de las especies *Lactobacillus* spp. en plantas de tomate *cherry* infectadas con *Cmm*. De izquierda a derecha. Control positivo de infección. *L. bulgaricus. L. acidophilus, L. coryniformis, L. helveticus. L. pentosus.*

Figura 23. Efecto de las suspensiones celulares de las especies *Lactobacillus* spp. en plantas de tomate *cherry* infectadas con *Cmm*. De izquierda a derecha. Control positivo de infección. *L. acidophilus. L. coryniformis. L. bulgaricus. L. helveticus. L. pentosus.*

Figura 24. Plantas control de infección de *Cmm*. De izquierda a derecha. Control positivo de infección. Control de MRS-Positivo de infección. Control de Agua destilada-Positivo de infección.

Figura 25. Aspecto de las raíces de tomate *cherry* infectadas con *Cmm* e inoculadas con los medios de fermentación de las especies *Lactobacillus* spp. De izquierda a derecha: Planta infectada por *Cmm*, Tratamiento con *Lactobacillus helveticus. L. acidophilus, L. bulgaricus, L. coryniformis y L. pentosus.*

Figura 26. Aspecto de raíces de tomate *cherry* infectadas con *Cmm* e inoculadas con las suspensiones celulares *Lactobacillus* spp. De izquierda a derecha*:* Planta infectada por *Cmm*, Tratamiento con *Lactobacillus helveticus. L. pentosus, L. bulgaricus, L. coryniformis* y *L. acidophilus*.

Figura 27. Aspecto de las raíces de las plantas control. Derecha a izquierda: Control positivo de infección. Infección de *Cmm* y aplicación de MRS. Infección de *Cmm* y aplicación de agua destilada.

En la figura 28, se muestran los resultados promedio del estudio fisiológico (Gráficos A, B y C), así como la acción de los productos de las fermentaciones ácido lácticas producidos por las especies *Lactobacillus* spp., sobre el control que comprende únicamente la infección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* cepa IFO (Figura 28, Gráfico D).

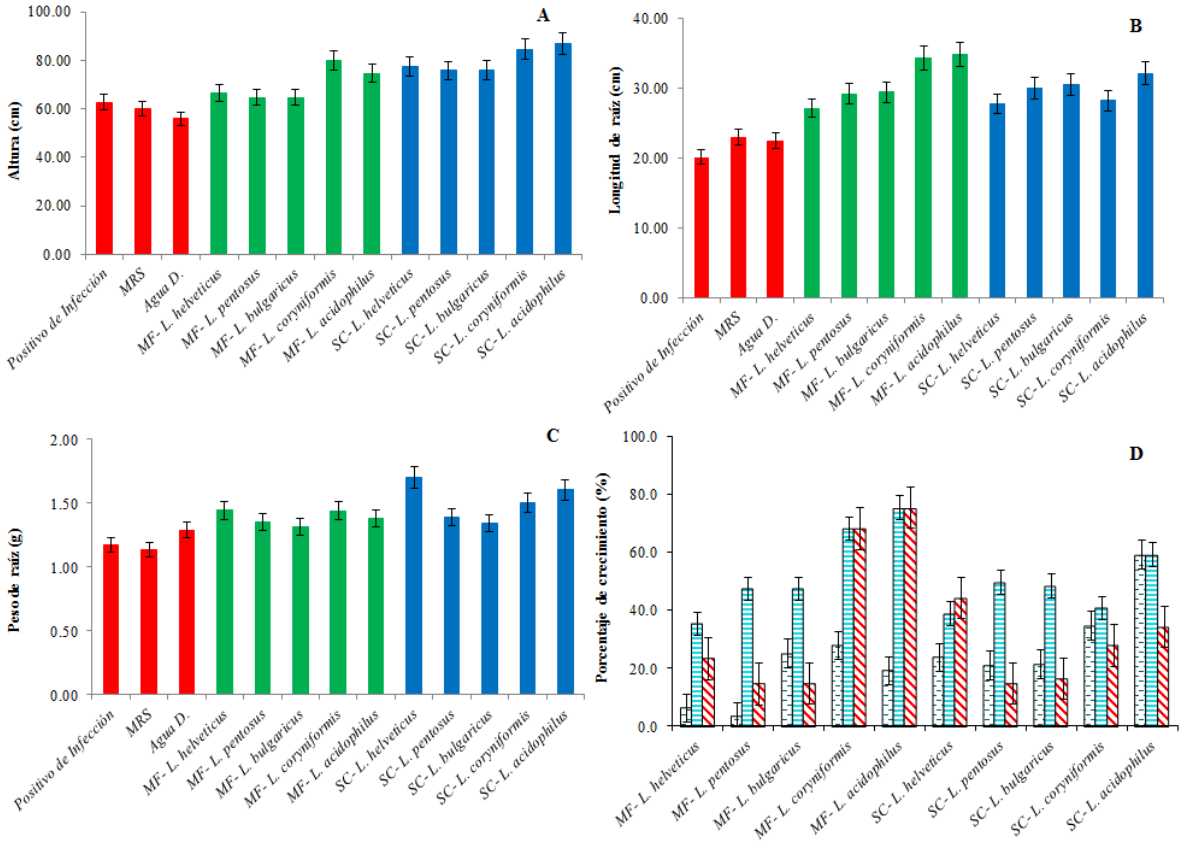


Figura 28. Estudio fisiológico de la prueba biocontrol. Gráfico A: Muestra las alturas promedio. Gráfico B: Muestra la longitud de raíz promedio alcanzada. Gráfico C: Presenta el peso seco de las raíces. Donde las barras color rojo muestran a los controles, las barras verdes muestran los tratamientos con los medios de fermentación (MF) y las barras azules corresponden a las suspensiones de células (SC) de las especies *Lactobacillus* spp. El gráfico D: muestra el porcentaje de contribución por parte de los tratamientos sobre el control de la enfermedad. Donde: se refiere a la altura de la planta, representa la longitud de raíces e indica el peso seco de las raíces. Las barras de error 5 %.

Dicho potencial biocontrol por parte de BAL ha sido estudiado en plantas modelo como tomate, pimiento, pepino, etc., donde se han encontrado actividades contra bacterias como *Ralstonia solani*, *X. campestris* pv. *versicatoria*, *Erwinia carotovora*, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*, *Pseudomonas syringae* y hongos como *Botrytis cinerea*, *F. oxysporum*, *Colletotrichium capsici*, *Pythium ultimum* y muestran su viabilidad para reducir enfermedades causadas por fitopatógenos en mayor o menor grado (Shrestha *et al*. 2009; Shrestha *et al*., 2014; Visser *et al*., 1986; Wang *et al*., 2011; El Mabrok *et al*., 2012; Hammed *et al*., 2011; Lutz *et al*., 2012). Este trabajo es el primero en estudiar el efecto bicontrol de bacterias ácido lácticas sobre la bacteria fitopatógena *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, agente colonizador del sistema vascular.

Los resultados son alentadores al obtener una reducción en la severidad debido una relación entre los mecanismos directos de biocontrol como la producción de antibióticos, enzimas líticas y/o mecanismos indirectos como la competencia y la modulación de la resistencia sistémica inducida (Glick, 2012). Los mecanismos de biocontrol desarrollados por este patosistema pueden ser comparables a los de *Bacillus subtilis*; entre los que se encuentran la competencia por la colonización en la rizosfera, la producción de compuestos antimicrobianos y la modulación de la resistencia sistémica inducida; donde el primer mecanismo de biocontrol incluye la competencia por los nutrientes y el espacio, fenómeno que pudo ser efectuado por las BAL, ya que los productos fueron inoculados previo a la infección del patógeno, durante este tiempo la bacteria ha generado un ambiente ácido en la zona cercana a las raíces, en la que se han excretado una diversidad de metabolitos (segundo mecanismo) y con ello se afectó la interacción, reconocimiento y posterior infección de la planta; además posiblemente las bacterias lácticas liberaron compuestos del tipo volátil involucrados con la activación de respuestas antagónicas a patógenos, al igual que los liberados por *B. subtilis* contra *Erwinia cartotovora* subsp. *carotovora*, (tercer mecanismo) como mencionan Compant *et al*., (2005). Existen otras moléculas, como la familia de lipoproteínas de surfactina, producidas por *Lactobacillus* y *B. subtilis*, que han sido relacionadas a la activación de resistencia sistémica frente a la enfermedad del moho de la uva, por la activación de la ruta de etileno, ruta de defensa frente patógenos necrotróficos (García *et al*., 2012).

Otra explicación de la actividad biocontrol es aquella que involucra la incorporación de sustancias como el ácido indol acético (AIA), a la zona radicular y mediar la producción de fitoalexinas como la camalexina (derivado del indol), ya que la producción de fitoalexinas es estimulada por la acumulación y/o variación en la concentración de compuestos relacionados a sus síntesis (Zhang *et al*., 2013), si es así el AIA funcionó como molécula estimulante en la activación de la ruta de síntesis. Otro punto de conexión del AIA, respecto a la producción de etileno que puede ser modulada por un gradiente en la concentración auxinas, este fenómeno citado por Lieberman (1976), establece que la producción de etileno, es influenciada por concentraciones de auxina superiores a los óptimos necesarios (10^{-3} M - 10^{-5} M).

Basado en lo anterior junto con el estudio fisiológico, concretamente en la altura obtenida en cada uno de los tratamientos y las concentraciones estimadas de indoles en la evaluación de los medios de fermentación, estos compuestos pueden llegar a ejercer una labor como moléculas de estimulacion para la activación de la ruta del etileno y permanecer activa hasta la infección por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* y durante el periodo de prueba; ya que esta hormona está relacionada con la maduración de frutos y la reducción en la tasa de crecimiento como mencionan Shakeel *et al*., (2013); basados en este fundamento en las plantas control expusieron una elevada producción de etileno que originó una afectación en el crecimiento de la planta, pero la producción no fue la suficiente para disminuir las afectaciones por el patógeno; sin embargo los resultados obtenidos son opuestos debido a que las mayores alturas fueron alcanzadas por los tratamientos que manifestaron altos niveles de severidad, posiblemente esto causado por un estrés relacionado a la infección y la búsqueda de la supervivencia por parte de la planta, así en estos casos la producción de etileno se vio reducida; mientras que los tratamientos con los medios de fermentaciones que redujeron la severidad, obtuvieron alturas menores probablemente porque estos tratamientos contribuyeron con la defensa y el crecimiento vegetal, asociado a que los índoles pudieron actuar como moduladores de mecanismos de defensa de la planta y en el caso de las suspensiones de células que aumentaron la altura, se hace la inferencia que no propiciaron la producción de etileno sino algún mecanismo alterno para la defensa contra *Cmm*, por la ausencia de los compuestos indólicos en dicha suspensión.

3.6. Actividad promotora del crecimiento vegetal

3.6.1. Actividad promotora en la germinación

Se obtuvieron resultados importantes en el fenómeno de germinación de semillas de tomate *saladette*, al aumentar la variable de germinación por encima de los controles probados. Los porcentajes de germinación por parte de los tratamientos son mostrados en la tabla 15.

Tabla 15. Efecto en la germinación de semillas de tomate *saladette*.

Especie *Lactobacillus* spp.	Porcentaje de germinación/Tratamiento			
	Medio de fermentación (%)	Sobrenadante libre de células (%)	Productos de membrana (%)	Suspensión celular (%)
L. helveticus	72	64	60	76
L. pentosus	84	70	60	76
L. bulgaricus	74	64	62	78
L. coryniformis	86	64	66	78
L. acidophilus	86	72	62	76
Control	Sol. nutritiva 50	Agua destilada 52	PBS 58	MRS 50

Además de promover la germinación, se obtuvieron diferencias en las características fisiológicas de las plántulas, por parte de las cinco especies de *Lactobacillus* spp. y de los cuatro productos de las fermentaciones, después de siete días de permanencia dentro de la cámara de crecimiento; donde la diferencia más notable fue la longitud del tallo de las plántulas (Figura 29). La actividad promotora en la germinación por parte de los productos obtenidos de las especies *Lactobacillus* spp., manifiestan el potencial de este género de bacterias al favorecer el porcentaje de germinación y beneficiar su desarrollo, dichos resultados pueden ser imputados debido a mecanismos como la producción y liberación de metabolitos, entre los que se encuentran a los indoles como el ácido 3-indol-acético (IAA).

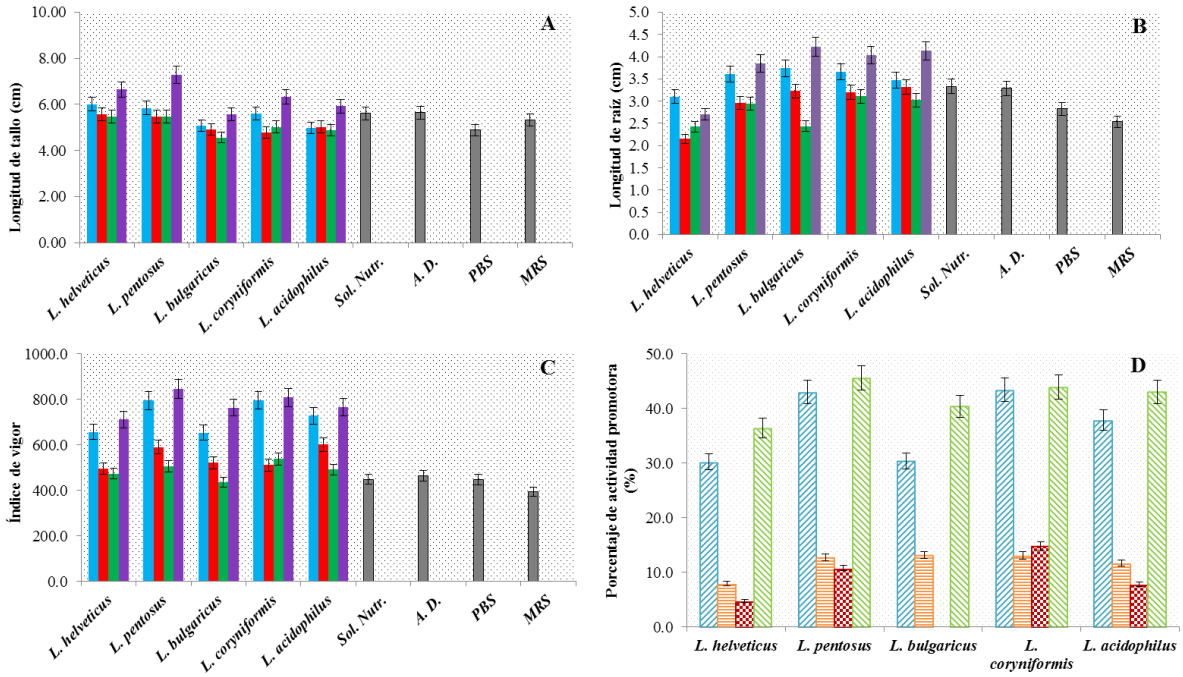


Figura 29. Actividad promotora de los productos de las fermentaciones ácido lácticas en la germinación de semillas de tomate. Gráfico A, longitud promedio de las plántulas. Gráfico B, longitud promedio de raíces. Gráfico C, índice de vigor alcanzado por los tratamientos. Barras azules corresponde al medio de fermentación. Barras rojas corresponden a los sobrenadantes libres de células. Barras verdes representan los productos de membrana. Barras moradas presentan las suspensiones de células. Gráfico D, porcentaje de actividad promotora, logrado por encima del control de solución nutritiva, por parte los productos de las fermentaciones ácido lácticas con relación al índice de vigor: Medios de fermntaciónes. Sobrenadantes libres de células. Productos de membrana. Suspensiones celulares. Barras de error del 5 %.

Los productos con efecto significativo en la germinación de semillas de tomate *saladette* fueron el medio de fermentación y las suspensiones celulares, de las cinco especies de *Lactobacillus* spp., los cuales beneficiaron en diferente proporción, no así los productos libres de células y los productos de membrana que no mostraron actividad representativa, hecho atribuido posiblemente a bajas concentraciones de compuestos que pueden favorecer a la germinación como lo son los indoles; ya que después del tratamiento de esterilización la concentración de ellos fue menor en comparación con el medio de fermentación, esta disminución en la concentración puede ser causada por una probable oxidación.

En la figuras 30, 31, 32 y 33, se muestran imágenes de las plántulas obtenidas siete días después de la siembra; demostrando así que la inoculación de bacterias de la familia *Lactobacillae* a semillas de tomate presenta un potencial de aplicación, al aumentar la viabilidad de la semilla y contribuir significativamente en la elongación de tallos y raíces (Tabla 16).

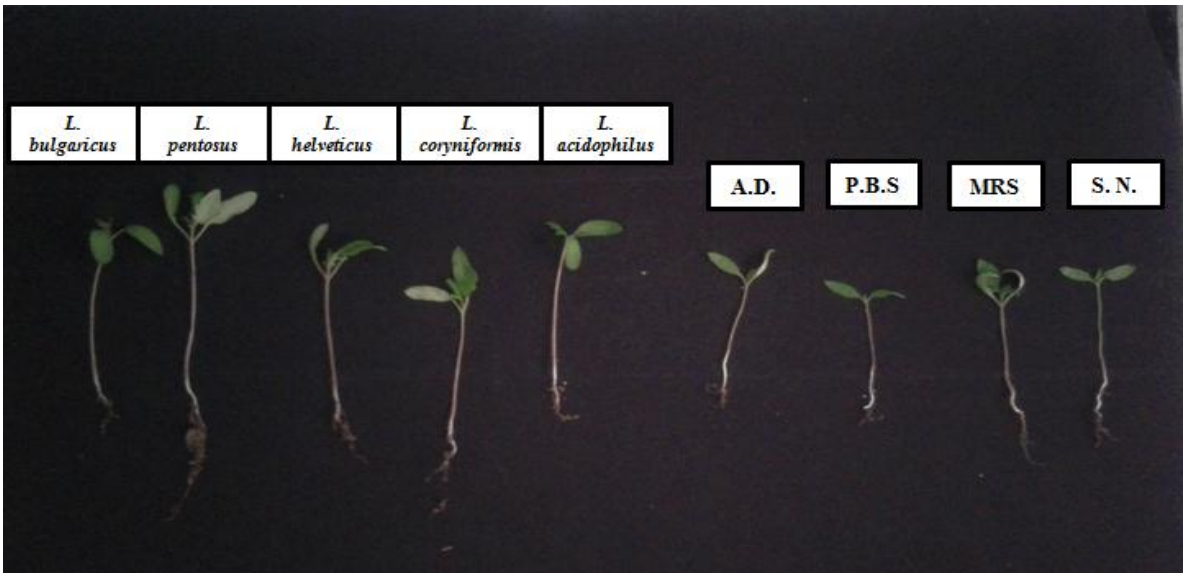


Figura 30. Plántulas inoculadas con los medios de fermentación ácido láctica de las especies *Lactobacillus spp.*

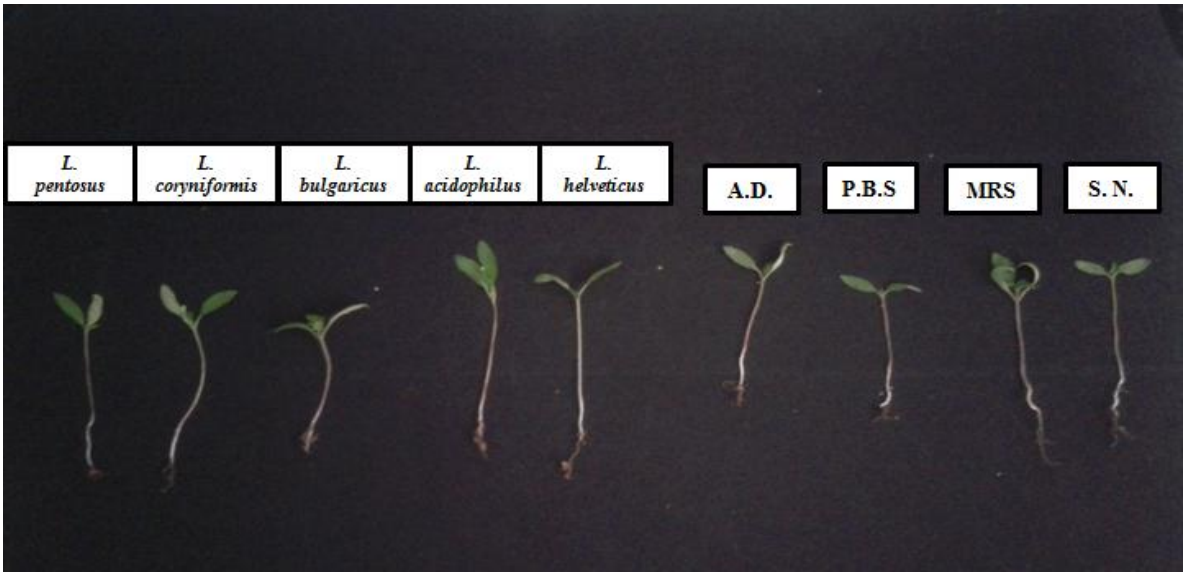


Figura 31. Plántulas inoculadas con los sobrenadantes libres de células de las especies *Lactobacillus* spp.

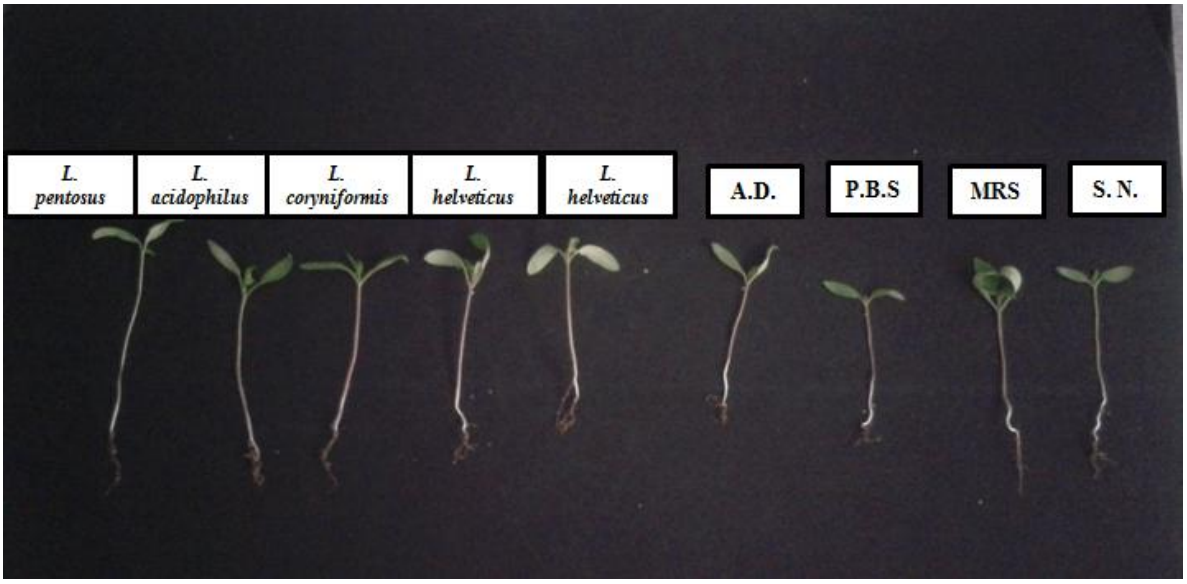


Figura 32. Plántulas inoculadas con los productos de membrana de las especies *Lactobacillus* spp.

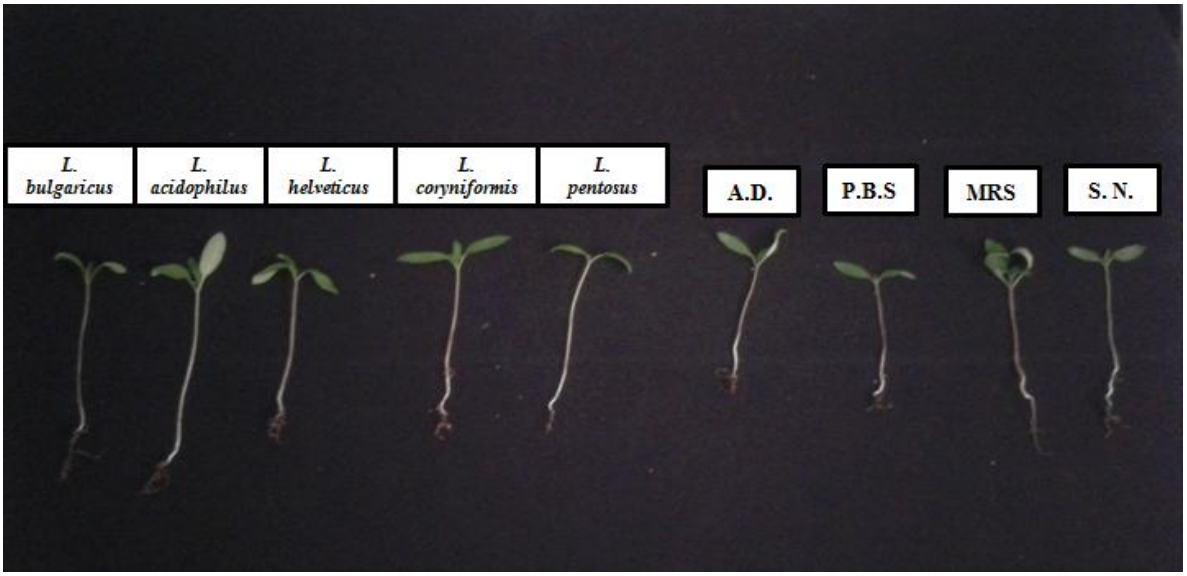


Figura 33. Plántulas inoculadas con las suspensiones celulares de las especies *Lactobacillus* spp.

Tabla 16. Resumen de la actividad promotora del crecimiento en la germinación.

Producto**	Bacteria láctica*	Longitud raíz Media ± D.E. (cm)	Longitud tallo Media ± D.E. (cm)	Índice de vigor Media ± D.E.
	L. helveticus	3.10 ± 0.710^{Cbc}	6.01 ± 0.86^{Aa}	655.92 ± 83.90^{Bb}
	L. pentosus	3.61 ± 0.840^{BAd}	5.85 ± 0.53^{Aa}	845.50 ± 139.96^{Ac}
Medio de fermentación	*L. bulgaricus*	3.74 ± 0.923^{ABa}	5.08 ± 0.84^{Ba}	652.68 ± 82.04^{Bb}
	L. coryniformis	3.65 ± 0.529^{Aa}	5.59 ± 0.65^{Bb}	795.07 ± 75.67^{Aa}
	L. acidophilus	3.47 ± 0.823^{ABab}	4.98 ± 0.69^{Ba}	726.70 ± 93.65^{Aa}
Control	MRS	2.53 ± 0.531^{Cd}	5.31 ± 0.859^{a}	392.25 ± 51.337^{d}
	L. helveticus	2.15 ± 0.516^{Cb}	5.58 ± 0.92^{Aa}	494.40 ± 63.56^{Bb}
	L. pentosus	2.95 ± 0.905^{Bb}	5.46 ± 0.54^{Aa}	589.05 ± 5.92^{Ab}
Sobrenadante libre de células	*L. bulgaricus*	3.22 ± 0.632^{ABa}	4.91 ± 0.42^{Bab}	520.32 ± 51.92^{Bb}
	L. coryniformis	3.19 ± 0.553^{Aa}	4.78 ± 0.51^{Ba}	510.08 ± 41.84^{Ab}
	L. acidophilus	3.31 ± 0.767^{ABa}	5.03 ± 0.49^{Bab}	600.48 ± 65.38^{Aa}
Control	MRS	2.53 ± 0.531^{b}	5.31 ± 0.859^{ab}	392.25 ± 51.337^{c}
	L. helveticus	2.42 ± 0.520^{Cbc}	5.46 ± 0.60^{Aa}	473.10 ± 36.80^{Ba}
	L. pentosus	2.94 ± 0.600^{Bc}	5.48 ± 0.57^{Aab}	505.20 ± 51.56^{Aab}
Productos de membrana	*L. bulgaricus*	2.43 ± 0.380^{ABc}	4.56 ± 0.54^{Bc}	433.38 ± 39.62^{Bc}
	L. coryniformis	3.11 ± 0.726^{Aa}	5.03 ± 0.85^{Bbc}	536.91 ± 80.90^{Aa}
	L. acidophilus	3.02 ± 0.539^{ABa}	4.89 ± 0.66^{Bc}	490.42 ± 49.43^{Aac}
Control	PBS	2.82 ± 0.675^{ab}	4.88 ± 0.763^{c}	447.18 ± 61.436^{bc}
	L. helveticus	2.70 ± 0.502^{Cc}	6.64 ± 0.71^{Ab}	710.22 ± 67.10^{Bb}
	L. pentosus	3.85 ± 1.160^{Bb}	7.28 ± 1.19^{Aa}	845.50 ± 139.96^{Aa}
Suspensión de células	*L. bulgaricus*	4.22 ± 0.704^{ABa}	5.57 ± 0.83^{Bc}	763.23 ± 87.75^{Ba}
	L. coryniformis	4.03 ± 0.805^{Aab}	6.32 ± 0.66^{Bbc}	807.69 ± 80.56^{Aa}
	L. acidophilus	4.13 ± 0.567^{ABab}	5.92 ± 0.61^{Bbc}	763.80 ± 61.62^{Aab}
Control	Agua destilada	3.29 ± 0.853^{bc}	5.64 ± 0.696^{c}	464.36 ± 60.173^{c}
	Sol. nutritiva	3.33 ± 0.652	5.61 ± 0.718	447.50 ± 48.680

*Letras mayúsculas diferentes en columna indican diferencia estadística significativa (Tukey $p<0.05$) entre las especies *Lactobacillus* spp.

**Letras minúsculas diferentes en columna indican diferencia estadística significativa (Tukey $p<0.05$) entre los productos de la fermentación ácido láctica.

El análisis estadístico del índice de vigor, indicó que de las cinco especies de *Lactobacillus* spp., las especies destacables fueron *L. acidophilus*, *L. coryniformis* y *L. pentosus*; en relación a los cuatro productos de la fermentación, el análisis reveló diferencia significativa entre cada uno de ellos, pero en orden de relevancia las suspensiones celulares alcanzaron valores superiores al resto de los productos, seguido por los medios de fermentación, los sobrenadantes libres de células y finalmente los productos de membrana.

A diferencia de otros autores, el tratamiento de semillas tomate con bacterias lácticas y sus productos de la fermentación mostraron un efecto significativo en la germinación al aumentar hasta un 36 % por encima del control, a diferencia de Narasimha *et al*., (2012) que empleo semillas de tomate y únicamente incremento en un 3 % sobre el control de su investigación, pero en comparación con los resultados reportados por Lutz *et al*., (2012), que empleo semillas de pepino inoculadas con dos especies de bacterias ácido lácticas, los resultados son comparables al incrementar hasta un 30 % la germinación (Tabla 17).

Tabla 17. Comparativo del efecto de bacterias ácido lácticas en la germinación de semillas.

	Narasimha *et al*., 2012	Esta investigación	Lutz *et al*., 2012
Condiciones	Laboratorio	Invernadero	Invernadero
Semilla	Tomate	Tomate	Pepino
Germinación (%)	BAL 1 78.13 BAL 2 79.76 Control 76.10	*L. acidophilus* 62 – 86 *L. bulgaricus* 62 - 78 *L. coryniformis* 64 - 86 *L. helveticus* 60.0 - 76.3 *L. pentosus* 60 - 84 Controles 50 - 52	BAL 1 73.9 BAL 2 57.5 Control 35

3.6.2. Actividad promotora del crecimiento vegetal en plántula

El medio de fermentación y las suspensiones celulares, fueron los productos aplicados en la prueba bicontrol que además mostraron efecto significativo en la germinación de semillas de tomate así que fueron utilizados en este ensayo conducido bajo condiciones de invernadero.

Los resultados de la actividad promotora en planta de tomate *cherry* (Figura 34), mostraron que las cuatro variables fueron beneficiadas por los productos. El sistema radicular notablemente fue beneficiado por estos tratamientos (las otras variables presentaron un aumento en mayor o menor grado), por encima de aquellas plantas que fueron regadas únicamente con agua, caldo MRS (comercial) y/o solución nutritiva.

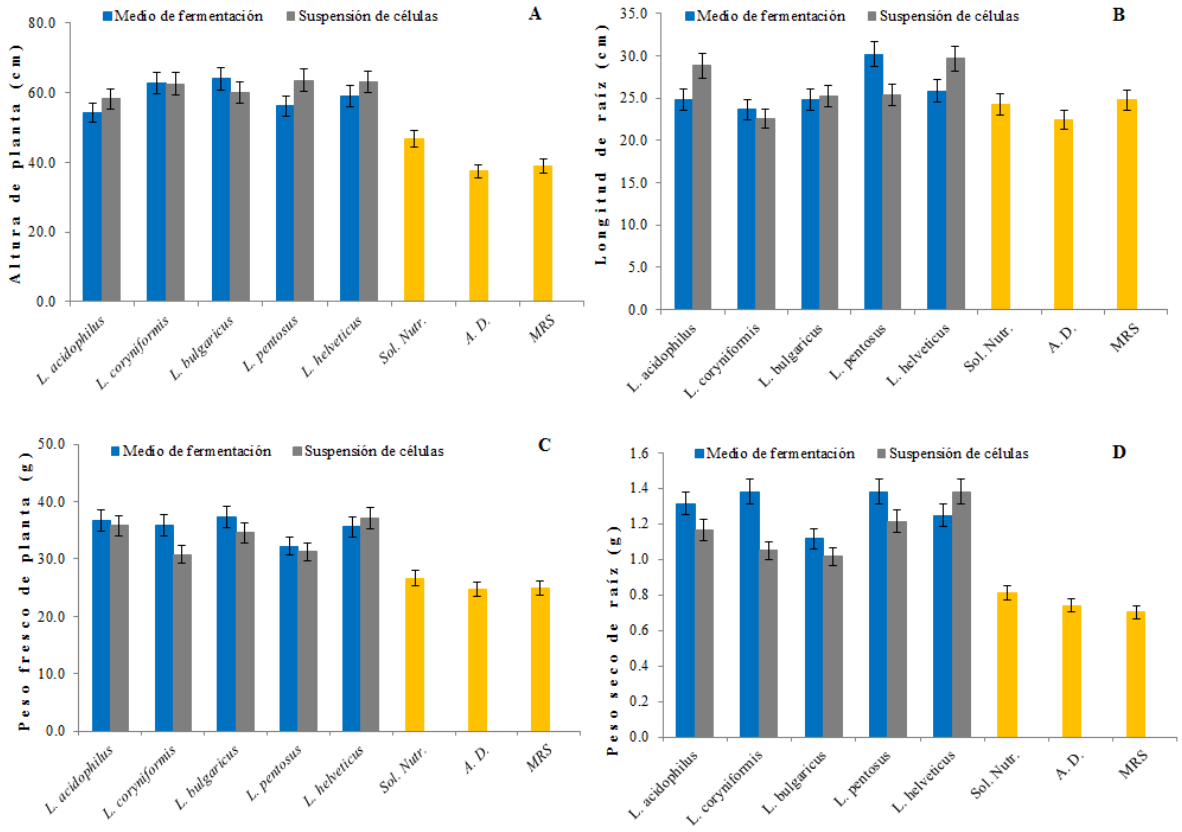


Figura 34. Efecto promotor de los productos de las fermentaciones ácido lácticas en plantas de tomate *cherry*. Gráfico A efecto en la altura. Gráfico B efecto en la longitud de raíces. Gráfico C efecto en el peso fresco de las plantas. Gráfico D efecto en el peso seco de raíces. Barras azules corresponden a los medios de fermentación. Barras grises representan a las suspensiones de células. Barras naranja representan a los controles de la prueba. Barras de error del 5 %.

Visualmente las platas inoculadas con uno de los dos productos de las fermentaciones, presentan mayor densidad foliar a diferencia del control presentado (Figura 35 y 36) y las raíces fueron más densas que las de plantas control (Figuras 37 y 38).

Figura 35. Efecto en plantas de tomate por los medios de fermentación de las especies *Lactobacillus* spp. De izquierda a derecha: Control de solución nutritiva, *L. pentosus, L. bulgaricus, L. acidophilus, L. coryniformis y L. helveticus.*

Figura 36. Efecto en plantas de tomate por las suspensiones celulares de *Lactobacillus* spp. De izquierda a derecha: *L. helveticus. L. coryniformis, L. bulgaricus. L. pentosus, L. acidophilus.* Control de solución nutritiva universal.

Figura 37. Efecto de los medios de fermentación láctica en la densidad radicular. De izquierda a derecha: Caldo MRS. Solución nutritiva, *L. helveticus, L. coryniformis, L. pentosus, L. bulgaricus* y *L. acidophilus.*

Figura 38. Efecto de las suspensiones celulares sobre la densidad radicular de plantas de tomate. De izquierda a derecha: Agua destilada, Solución nutritiva, *L. helveticus, L. coryniformis, L. pentosus, L. bulgaricus* y *L. acidophilus.*

El análisis estadístico de actividad promotora (porcentajes) que presentaron los productos a diferencia del control solución nutritiva (Figura 39), reveló que las especies cinco especies de *Lactobacillus* y los dos productos aplicados no presentan diferencia estadística significativa respecto al porcentaje del peso fresco de la planta (incrementos 15.7 % – 26.2 %). En la evaluación de los datos de peso seco de raíces se encontraron diferencia significativa entre las especies y los productos, destacando el medio de fermentación de *L. coryniformis* aumentó esta variable hasta en un 41.1 %, mientras que la suspensión de células de *L. bulgaricus* únicamente aumento un 18.8 %. El análisis de alturas de igual manera presentó diferencias estadísticas entre las especies de *Lactobacillus* spp. pero no respecto a los productos, en esta variable el tratamiento con el medio de fermentación de *L. bulgaricus* incrementó hasta un 26.4 % por encima del control de solución nutritiva mientras que el tratamiento con el medio de fermentación únicamente aumentó 13.6 % y finalmente con respecto a la longitud de raíces nuevamente se encontró diferencia estadística entre las bacterias, pero no por los productos de la fermentación, donde *L. pentosus* fue la especie que presento el más alto porcentaje (13.6 %), mientras que el más bajo fue *L. coryniformis* (2.4).

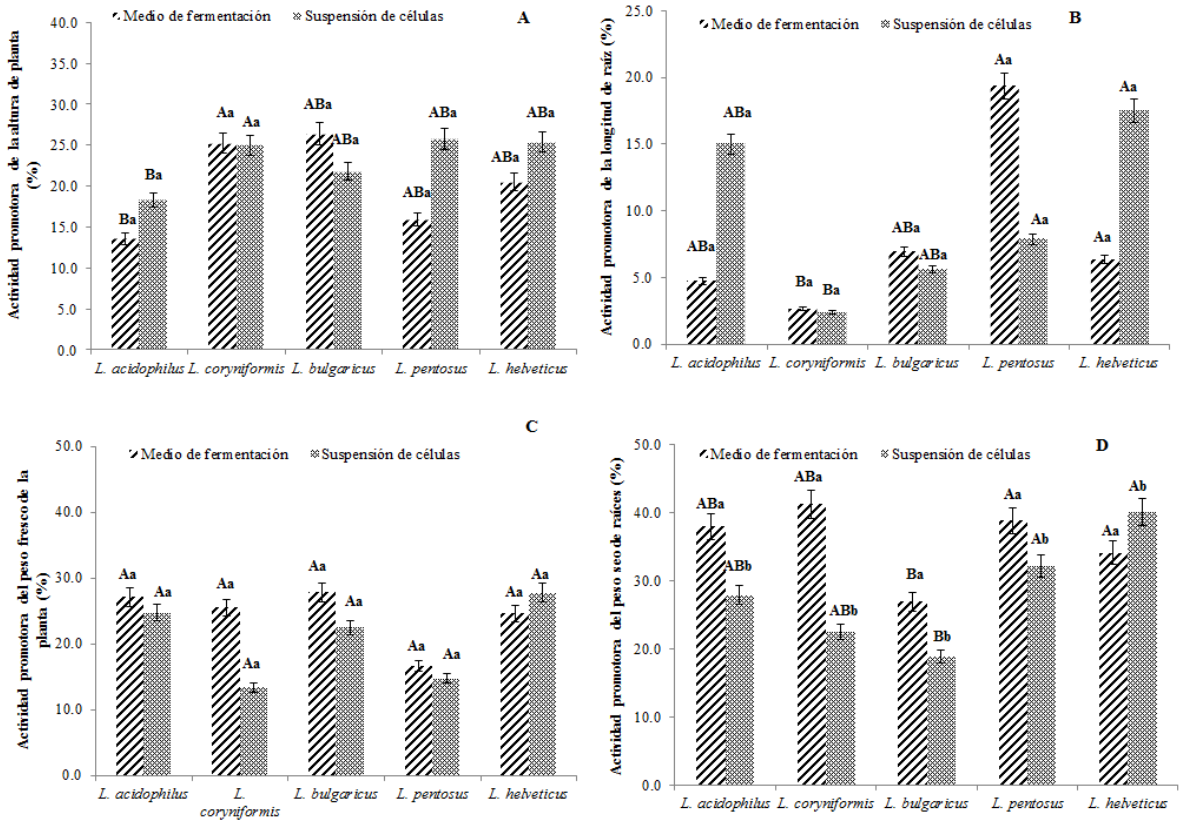


Figura 39. Porcentaje de actividad promotora del crecimiento vegetal de los productos de las fermentaciones ácido lácticas en plantas de tomate *cherry*. Gráfico A, actividad promotora en altura de plantas. Gráfico B, porcentaje de actividad promotora en la longitud de raíces. Gráfico C, porcentaje de actividad promotora en el peso fresco de la planta. Gráfico D porcentaje de actividad promotora sobre el peso seco de las raíces. Barras de error del 5 %.

La actividad promotora encontrada en el presente estudio en tomate por parte de las especies *Lactobacillus* spp., y sus productos, exhiben una atractiva capacidad para ser estudiados como agente promotor del crecimiento vegetal, por la manera de fomentar y favorecer la germinación y desarrollo en planta, debido a una mutua interacción entre estos organismos, hechos originados por la producción de fitohormonas o precursores como el ácido 3-indol-acético, molécula obtenida del metabolismo del triptófano por parte de estas bacterias, como lo deja entre ver la investigación de Shrestha *et al*., (2014), que estudiaron la producción y cuantificación espectrofotométrica de esta auxina durante el crecimiento de tres especies *Lactobacillus* spp., en medios de cultivo, a los cuales se les incluyó concentraciones variables de triptófano, encontrando resultados de 0.26 – 0.56 de absorbancia a 530 nm (semejanza a los encontrados en este experimento).

Los efectos por la modificación en la concentración de esta fitohormona están relacionados con la elongación de tejidos como lo reportan Vacheron *et al*., (2013), que a bajas concentraciones de IAA se favorece la elongación de la raíz primaria mientras que en concentraciones altas de IAA se estimula formación de raíces secundarias, decrece la longitud de raíz primaria (resultados obtenidos en tomate *saladette*) e incrementa la formación de pelos radiculares.

Otros de los fenómenos relacionados a la capacidad promotora del crecimiento por parte de bacterias ácido lácticas son la producción de sideróforos y la solubilización de hierro, que mediante el uso de medios de cultivo especializados, se han encontrado con halos de producción de sideróforos de hasta 10 mm y 17 mm por la solubilización de fosfatos, resultados de las BAL estudiadas por Shrestha *et al*., (2014). Fenómenos como la solubilización de fosfatos están relacionadas al potencial de convertir hierro (segundo nutriente de mayor importancia para el crecimiento de la planta después del nitrógeno) en una forma disponible para la planta, este nutriente que está presente en la rizosfera como inositol-fosfato puede llegar a ser modificado a una forma asimilable mediante ácidos orgánicos de bajo peso molecular, sideróforos y por enzimas como fitasas o fosfatasas (Ahemad y Kibret, 2013). Estos fenómenos de solubilización de fosfatos y biodisponibilidad del hierro (no estudiados en el presente trabajo), acoplados con los resultados obtenidos ayudan a vislumbrar el potencial de BAL (especies *Lactobacillus* spp.), para ser empleados como agente promotor del crecimiento vegetal y con ello favorecer el desarrollo y crecimiento de cultivos de interés productivo como lo es el tomate (*Solanum lycopersicum*).

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en pruebas *in vitro* e *in vivo* junto con los análisis estadísticos permite presentar las siguientes conclusiones.

- Para la actividad biocontrol de *Fusarium oxysporum*, los resultados de inhibición de este hongo sobre hojas de tomate, los tratamientos con *L. bulgaricus* y *L. helveticus*, presentaron evidencia como una alternativa de biocontrol de aplicación foliar contra este hongo. Mientras que los resultados de biocontrol de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, los tratamientos con los medios de fermentación y las suspensiones celulares de *L. bulgaricus*, *L. coryniformis*, *L. helveticus* y *L. pentosus* mostraron una mayor reducción de la severidad de la enfermedad en plantas de tomate, demostrando la capacidad de ser utilizados como agentes biocontrol para combatir problemas fitosanitarios referentes a *Cmm*.

- Las suspensiones celulares y los medios de fermentación de las especies *L. acidophilus*, *L. coryniformis* y *L. pentosus*, contribuyeron positivamente a las variables fisiológicas en las plántulas obtenidas en la germinación de semillas de tomate *saladette*.

RECOMENDACIONES

1. Realizar un estudio bioquímico de la composición de los productos del metabolismo excretados al medio de cultivo, por las especies de *Lactobacillus* spp.
2. Evaluar el tipo de daño que causan los productos de las fermentaciones lácticas sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, evaluando si se presentan afectaciones metabólicas, estructurales o son fenómenos de físicos como la competencia.
3. Experimentar pruebas de biocontrol correctivo sobre *F. oxysporum* y *Cmm*, en condiciones de suelo infectado.
4. Después del estudio de composición de los productos, desarrollar una estrategia de investigación para elucidar los mecanismos de inhibición.
5. Estudiar el mecanismo de interacción planta-bacteria láctica, para comprender el tipo relación mutualista que desarrollan estos organismos.
6. Realizar un estudio del comportamiento de la rizosfera y su microbiota ante la inoculación de estos microorganismos y/o productos.
7. Investigar y tratar de explicar los fenómenos biológicos, bioquímicos y moleculares relacionados al control de enfermedades por las especies de *Lactobacillus* spp.
8. Realizar pruebas *in vivo* (prueba en parcelas o surcos) la posible aplicación de estas especies como agentes biocontrol y promotora del crecimiento vegetal.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeniyi, B. & Damsa, I. (2011). Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from salad vegetables. *African Journal of Biomedical Research*. Nigeria. 14 (*2*). pp 137 – 141.

Agrios, G. (2005). Plan Pathology. *Elsevier Academic Press*. EEUU. P 922. ISBN: 0-12-044565-4.

Ahemad, M. & Kibret, M. (2013). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University-Science*. Etiopia. pp 20.

Ajilogba, C. & Babalola, O. (2013). Integrated management strategies for tomato *Fusarium* Wilt. *Biocontrol Science*. 18 (*3*). pp 117 – 127.

Álvarez, A., López, A., Borrego, F., Rodríguez, S. (2008). Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum f*. sp. *Lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. México. 26 (*2*). pp 114 - 120.

Álvarez, J. (2012). Comportamiento agronómico e incidencia de enfermedades de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) injertadas. *Acta Agronómica*. México. 60 (*2*). pp 117 – 125.

Anaya, J., González, M., Villordo, E., Rodríguez, R., Rodríguez, R., Guevara, R., Guevara, L., Montero, V. & Torres, I. (2011). Selección de genotipos de chile resistentes al complejo patogénico de la marchitez. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 2 (*3*). pp 373 – 383.

Anyogu, A, Awamaria, B., Sutherland, J. P. & Ouoba, L. I.I. (2014). Molecular characterization and antimicrobial activity of bacteria associated with submerged lactic acid cassava fermentation. *Food Control*. Reino Unido. 39. pp 119 – 127.

Axel, C., Zannini, E., Coffey, A., Gou, J., Waters D. & Arendt, E. (2012). Ecofriendly control of potato late blight causative agent and the potential role of lactic acid bacteria: a review. *Appl. Microbiology Biotechnology*. Irlanda. pp 12.

Barker, S., & Summerson, W. (1941). The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *The journal of Biological Chemistry*. New York. 138. pp 535 – 554.

Bastas, K. (2014). Effects on Tomato Bacterial Canker of Resistance Inducers and Copper Compounds in Greenhouse. *Selcuk Journal of Agriculture and Food Sciences*. Turquía. 28 (*1*). pp 1 - 10.

Beneduzi, A., Ambrosini, A. & Passaglia, L. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonist and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology*. Brasil. 35 (*4*). pp 1044 – 155.

Borboa, J., Rueda, E., Acebedo, E., Ponce, J., Onécimo, M., Juárez, G. & Ortega, A. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*. México. 32 (*4*). 319 – 326.

Boudyach, E., Fatmi, M., Akhayat, O., Benizri, E., Ben, A. (2001). Selection of antagonistic bacteria of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and evaluation of their efficiency against bacterial canker of tomato. *Biocontrol Science and Technology*. Francia. 11. pp 141 – 149.

Burokeinë, D., Sobiczewski, P. & Berczyński, S. (2005). Phenotypic characterization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolates from Lithuania. *Phytopathology Polish*. Lituania. 38. pp 66 – 77.

Camelo, M., Vera, S. & Bonilla (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. Colombia. 12 (*2*). pp 159-166

Cárdenas, N., Godoy, H. & Medina, R. (2011). Evaluación de la patogenicidad de diferentes cepas de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* aisladas en el Estado de Guanajuato. *Universidad Politécnica de Guanajuato*. Reporte de estadía. México. pp 80.

Compant, S., Duffy, B., Nowak, J., Clément, C., Barka, E. (2005). Minireview. Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects. *Applied And Environmental Microbiology*. Virginia. 71 (*9*). pp 4951 - 4959.

Concha, A. (2008). Evaluación de una biopelícula con bacterias ácido lácticas y nisina para la inhibición de *Listeria monocytogenes* en salmón ahumado. *Universidad Austral de Chile*. Tesis Profesional. Chile. P 66.

Coordinadora Nacional de las Fundaciones Produce. A. C. (COFUPRO). (2012). El tomate. http://www.cofupro.org.mx/cofupro/Publicacion/Archivos/penit32.pdf. Consultada el 30 de junio del 2014.

Daeschel, M., Anderson, R. & Fleming, H. (1987). Microbial ecology of fermentation plant materials. *FEMS Microbiology Reviews*. 46. EEUU. pp 357 – 367.

Dal Bello, F., Clarke, C., Ryan, L., Ulmer, H., Schober, T., Ström, K., Sjögren, J., Sinderen, D., Schnürer, J, & Arendt, E. (2007). Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with antifungal strain *Lactobacillus platarum* FST 1.7. *Journal of Ceral Science*. Irlanda. 45. pp 309 – 318.

Davidson, J. (1949). *388.* The colorimetric determination of lactic acid in milk and milk products. *Journal of Dairy Research*. 16. pp 209 – 216.

De Muynck, C., Leroy, A., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W. & Vandamme, E. (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research*. Bélgica. 159. pp 339 – 346.

De Vuyst, L. & Vandamme, E. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, Bacteriocins of lactic acid bacteria, microbiology, genetics and applications. De Vuyst L, Vandamme, E. (Eds.). *Blackie Academic & Professional*. Londres. pp 91 – 142. ISBN 978-1-4613-6146-6

Di Pietro, A., Madrid, M., Caracuel, Z., Delgado, J. & Roncero, M. (2003). *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Molecular Plant Pathology*. España. 4 (*5*). pp 315 -325.

El Mabrok, A., Hassan, Z., Mokhtar, A., Hussain, K., & Kahar, F. (2012). Screening of lactic acid bacteria as biocontrol against (*Colletotrichum capsici*) on chilli Bangi. *Research Journal of Applied Sciences*. Malasia. 7. 466–473.

Emerenini, E., Afolabi, O., Okolie, P. & Akintokun, A. (2014). In vitro studies on antimicrobial activities of lactic acid bacteria isolated from fresh vegetables for biocontrol of tomato pathogens. *British Microbiology Research Journal*. Nigeria. 4 (*3*). pp 351 – 359.

Escalona, V., Alvarado, P., Monardes, H., Urbina, C. & Martin, A. (2009). Manual de cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum*. *Mill*). *Innova Chile*. CORFO. Chile. 60.

European and Mediterranean Plant Protection Organization (EPPO)/ Organisation Européenne et Mediterranéenne pour la Protection des Plantes (OEPP). (2013). PM 7/42 (2) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Bulletin. 43 (*1*). pp 46–67

European Food Safety Authority (EFSA), PLH Panel (EFSA Panel on Plant Health). (2014). Scientific Opinion on the pest categorization of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Smith) Davis *et al*. *EFSA Journal*. 12 (*6*). P 29.

FAOSTAT. División de Estadística de la Organización de las Naciones Unidas. www.faostat.org. Pagina consultada el 17 de enero del 2016.

Fernández, C. (1983). *Phytophtora capsici* causante de la marchitez en pimiento (*Capsicum annunum*) en Chile. *Agricultura técnica*. 43 (*2*). pp 91 – 93.

Fernández, E., Guerrero, J., Rueda, E. & Acosta, M. (2013). Patógenos y síntomas asociados a la marchitez del tomate (*Solanum lycopersicum L*.) en Texcoco México. *Revista Biotecnia*. México. 15 (*3*). P 46 - 50.

Figueiredo, M., Seldin, L., de Araujo, F. & Mariano, R. (2010). Plant growth promoting rhizobacteria: fundamentals and applications, D.K. Maheshwari (ed.), Plant Growth and Health Promoting Bacteria. *Springer Heidelberg*. Brasil. pp 21 – 43.

Gamalero, E. & Glick, B. (2011). Mechanisms Used by Plant Growth-Promoting. Maheshwari (Ed.). Bacteria in Agrobiology: Plant Nutrient Management. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. pp 17 – 45.

García, L., Zeriouh, H., Romero, D., Cubrero, J., De Vicente, A. & Pérez, A. (2012). The antagonistic strain *Bacillus subtilis* UMAF6639 also confers protection to melon plants against cucurbit powdery mildew by activation of jasmonate and salicylic acid-dependent defense responses. *Microbial Biotechnology*. España. pp 264 – 274.

Gartemann, K., Kirchner, O., Engenmann, J., Gräfen, I., Eichenlaub, R. & Burger, A. (2003). *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: firsts steps in the understanding of virulence of Gram-positive phyotopathogenic bacterium. *Journal of Biotechnology*. Alemania. pp 179 – 191.

Gerez, C., Carbajo, M., Rollán, G., Torres, G., & de Valdez, G. (2010). Inhibition of citrus fungal pathogens using lactic acid bacteria. *Food Microbiology & Safety*. Argentina. 75 (6). pp 354 – 359.

Glick, B. (2012). Review Article. Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Hindawi Publishing Corporation Scientifica*. Canadá. p 15.

Glick, B. (2015). Beneficial Plant-Bacterial Interactions. *Springer Cham Heidelberg*. Suiza. pp 243. ISBN 978-3-319-13920-3

Gomaa, E. (2013). Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *Journal Gen. Appl. Microbiol*. Egipto. 59. pp 425 – 436.

Gómez, L. (2010). Uso de injertos y contenido de fenoles solubles totales en genotipos de jitomate (*Lycopersicon esculentum Mill*.) resistentes y susceptibles a *Fusarium oxysporum f*. sp. *lycopersici* raza 3. *Colegio de posgraduados*. Tesis Profesional. México. 41.

Gómez, R., Hernández, L., Cossío, L., López, J. & Sánchez, R. (2011). Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. *INIFAP*. México. 85.

González, I., Arias, Y. & Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum f*. sp. *lycopersici* tomate. *Revista protección vegetal*. 27 (*1*). p 1 – 7.

Gudiña, E., Teixeira, J. & Rodrigues, L. (2010). Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactobacillus paracasei*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. Portugal. 76. pp 298–304.

Gutiérrez, L., Montoya, O., Ruiz, O. (2005). Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. Cuba. 36. p 6.

Hafizi, R., Salleh, B. & Latiffah, Z. (2013). Morphological and molecular characterization of *Fusarium*. *solani* and *F*. *oxysporum* associated with crown disease of oil palm. *Brazilian Journal of Microbiology*. Malasia. 44 (*3*). pp 959 – 968.

Haggag, W., Abd-El-Latif, F. & El-Mohamedy, R. (2015). Physical and Biochemical Integrated Management For Controlling Tomato Wilt Disease Under Field Conditions. *Plant Pathology Journal*, 14 (*4*), pp 242.

Hammed, H., Moustafa, Y. & Abdel, S. (2011). *In vivo* efficacy of lactic acid bacteria in biological control against *Fusarium oxysporum* for protection of tomato plant. *Life Science Journal*. Egipto. 8 (*4*). pp 462 – 468.

Handelsman, J. & Stabb, E. (1996). Biocontrol of soilborne plant pathogens. *The Plant Cell*. Wisconsin. 8. pp 1855 – 1869.

Hausbeck, M., Bell, J., Mora, C., Podolsky, R. & Fulbright, D. (2000). Effect of bactericides on population sizes and spread of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* on tomatoes in the greenhouse and on disease development and crop yield in the field. *Phytopathology*. EEUU. 90 (*38*). pp 38 – 44.

Heinemann, B. (1940). A rapid colorimetric method for the determination of lactic acid in milk. *Chief, Producers Creamery Company*. Springfield, Mo. 23 (*10*). pp 469 – 972.

Ingram, D., Lu, S. & Meister, C. (2007). Evaluation of Bactericidal, Biological and Antibiotic Products for the Control of Bacterial Canker in Greenhouse Tomatoes. *Plant Health Progress*. Florida. pp 22.

Jalali, M., Khosro, I., Ghasemi, M. & Tabrizi, S. (2012). Antagonism of *Lactobacillus* species against *Xanthomonas campestris* isolated from different plant. *Journal of Applied Environmental and Biological Sciences*. Iran. 2 (*9*). pp 480 – 484.

Jaramillo, D., Melendez, A. & Sánchez, O. (2010). Evaluación de la producción de bacteriocinas a partir de Lactobacilos y Bifidobacterias. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Venezuela. 1 (*2*). 193 – 209.

Jaramillo, J., Rodríguez, V., Guzmán, M., Zapata. M. (2006). El cultivo de tomate en invernadero (*Lycopersicon esculentum*. *Mill*). *CORPOICA*. Colombia. 48.

Johnson, K. & Walcott, R. (2012). Progress towards a real-time PCR assay for the simultaneous detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* and Pepino mosaic virus in tomato seed. *Journal of Phytopathology*. EEUU. p 11.

Juárez, Ma., Ocaña, V., Wiese, B. & Nader, Ma. (2003). Growth and lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Medical Microbiology*. Argentina. 52. pp 1117 -1124.

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Alemania. 49. pp 209 – 224.

König, H. & Fröhlich, J. (2009). Biology of microorganisms on grapes, in must and in Wine. König, H., Unden, G. & Fröhlich, J. (Eds.), Lactic acid bacteria. Berlin. *Springer-Verlag*. (pp 3 – 29). ISBN: 978-3-540-85462-3.

Kotzamanidis, Ch., Roukas, T. & Skaracis, G. (2002). Optimization of lactic acid production from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* NCIMB 8130. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. Países Bajos. 18. pp 441 – 448.

Kumar, V. (2016). Plant Growth-Promoting Microorganisms: Interaction with Plants and Soil. Hakeem, K., Akhtar, M. & Abdullah, S. (Eds.), Plant, Soil and Microbes (pp 1-16). Switzerland. *Springer International Publishing*. ISBN 978-3-319-27453-9.

Labuschagne, N., Pretorius, T. & Idris, A. (2010). Plant Growth Promoting Rhizobacteria as Biocontrol Agents Against Soil-Borne Plant Diseases. Maheshwari (Ed). Plant Growth and Health Promoting Bacteria, Microbiology Monographs 18. Sudáfrica. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. pp 211 – 230.

Laitila, A., Alakomi, L., Raaska, T., Mattila-Sandholm, T. & Haikara, A. (2002). Antifungal activities of two *Lactobacillus plantarum* strains against *Fusarium* molds *in vitro* and in malting of barley. *Journal of Applied Microbiology*. Finlandia. 93. pp 566 – 576.

Lara, P., Isordia, Ma., Castillo, R., Simpson, J. & Alpuche, A. (2012). Gene Expression Analysis during Interaction of Tomato and Related Wild Species with *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Plant Molecular Biology Rep*. México. 30. pp 498 – 511.

Larrea, H., Flores, M. & Huapaya, J. (2007). Evaluación de la actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas. Parte I. *Revista Horizonte Medico*. Perú. 7 (*1*). p 7.

Li, S., Jin, X., Chen, J. & Lu. (2013). Inhibitory activities of venom alkaloids of Red Imported Fire Ant against *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis in vitro* and the application of piperidine alkaloids to manage symptom development of bacterial canker on tomato in the greenhouse. EEUU. *International Journal of Pest Management*. 59 (*2*). pp 150 – 156.

Lieberman, M. (1976). Role of Ethylene in Plant Growth, Development, and Senescence. Memoria, *ACS Symposium Series; American Chemical Society*. EEUU. pp 115 – 132.

Lutz, M., Michel, V., Martínez, C. & Camps, C. (2012). Lactic acid bacteria as biocontrol of soil-borne pathogens. *Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens*. Suiza. 78. pp 285 – 288.

Martínez, B., Rodríguez, A. & Suárez, E. (2016). Antimicrobial Peptides Produced by Bacteria: The Bacteriocins. New Weapons to Control Bacterial Growth, Villa, T. & Vinas, M. (Eds.). Springer International Publishing. España. p 556. ISBN 978-3-319-28366-1.

Matei, A. & Cornea, C. (2014). Antifungal activity of some lactic acid bacteria isolated from materials of vegetal origin. *Scientific Bulletin. Series F. Biotechnologies*. Romania. 18. pp 42 – 47.

Mauch, A., Dal Bello, F., Coffey, A. & Arendt. E. (2010). The use of *Lactobacillus brevis* PS1to *in vitro* inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *International Journal of Food Microbiology*. Irlanda. 141. 116 – 121.

McSpandden, B. & Fravel, D. (2002). Biological control of plant pathogens: research commercialization, and application in the USA. *Plant Health Progress*. EEUU. p 18.

Narasimha, K., Malini, M., Savitha, J. & Srinivas, C. (2012). Lactic acid bacteria (LAB) as plant growth promoting bacteria (PGPB) for the control of wilt of tomato caused by *Ralstonia solanaceraum*. *Pest. Management in horticultural ecosystems*. 18 (*1*). India. p 60 – 65.

Nes, I., Diep, D., Håvarstein, L., Brurberg, M., Eijsink, V. & Holo, H. (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Países Bajos. 70. pp 113 – 128.

Oranusi, S., Braide, W. & Oguoma, O. I. (2013). Antifungal properties of the lactic acid bacteria (LAB) isolated from *Ricinus communis*, *Pentaclethra macrophylla* and yogurts. *Global Advanced Research Journal of Food Science and Technology*. Nigeria. 20 (*1*). p 6.

Paret, M., Dufault, N., Momol, T., Marois, J., Olson, S. (2012). Integrated Disease Management for Vegetable Crops in Florida. *Universidad de Florida*. pp 193 – 198.

Parra, R. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Facultad de Ciencias Agropecuarias*. 8 (*1*). pp 93 – 105.

Piard, J. & Desmazeaud, M. (1992). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. *Lait*. Francia. 72. pp 73 – 142.

Pii, Y., Mimmo, T., Tomasi, N., Terzano, R., Cesco, S. & Crecchio, C. (2015). Microbial interactions in the rhizosphere: beneficial influences of plant growth-promoting rhizobacteria on nutrient acquisition process. A review. *Biol Fertil Soils*. Berlin. 51. pp 403–415.

Ribéreau, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. and Lonvaud, A. (2006). Metabolism of Lactic Acid Bacteria. Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications (2nd Edition). *John Wiley & Sons, Ltd, Chichester*. Reino Unido. UK. pp 139 – 159. ISBN: 0-470-01034-7.

Rico, M. (2009). Capacidad promotora de crecimiento vegetal por bacterias del genero *Azotobacter* y Actinomicetos aislados de cultivos de *Solanum tuberosum Linnaeus*, 1753 (papa) cultivados en zonas alto andinas del Perú. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Tesis Profesional. Perú. 152.

Rives, N., Acebo, Y. & Hernández, A. (2007). Reseña bibliográfica: Bacterias promotoras del crecimiento vegetal en el cultivo del arroz (*Oryza sativa*). Perspectivas de su uso en Cuba. *Cultivos Tropicales.* Cuba. 28 (*2*). P 29 – 38.

Rodríguez, H. & Fraga R. (1999). Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*. Cuba. 17. P 319 – 339.

Ruas, P., Huenholtz, J. & Zoon P. (2002). An overview of the functionality of exopolisaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*. Países Bajos. 12. pp 163 – 171.

Sachdev, D. & Cameotra, S. (2013). Biosurfactants in agriculture Mini-Review. *Appl Microbiol Biotechnol*. India. 97. pp 1005–1016.

Sánchez, M. (2007). Manejo de enfermedades del tomate. Curso del INCAPA “Manejo integrado de plagas y enfermedades en tomate, chile y papa”. 22 – 39.

Schnürer, J, & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science & Technology*. Suecia. 16. pp 70 – 78.

Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2012). Es México potencia en producción y exportación de hortalizas; reto: Diversificar oferta y mercados. *SAGARPA*. México. 2.

Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2016). http://www.sagarpa.gob.mx/quienesomos/datosabiertos/siap/Paginas/superficie_agricola_protegida.aspx. Pagina consultada el día 17 de enero del 2016.

Shakeel, S., Wang, X., Binder, B., & Schaller. (2013). Mechanisms of signal transduction by ethylene: overlapping and non-overlapping signaling roles in a receptor family. *AoB Plants*. EEUU. 5. p 16.

Sharma, A., Soni, J., Kaur, G. & Kaur, J. (2014). A Study on biosurfactant production in *Lactobacillus* and *Bacillus* sp. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. India. 3 (*11*). pp 723 – 733.

Shrestha, A. Seok, B. & Hwan, D. (2014). Biological control of bacterial spot disease and plant growth-promoting effects of lactic acid bacteria on pepper. *Biocontrol Science and Technology*. República de Corea. 24 (*7*). P 763 – 779.

Shrestha, A., Chang, E., Lim, C., CHo, S., Hur, J. & Park, D. (2009A). Biological control of soft on chinese cabbage using beneficial bacterial agents in greenhouse and field. *The Korean Journal of Pesticide Science*. Corea. 13 (*4*). pp 325 – 331.

Shrestha, A., Choi, K., Lim, C., Hur, J. & Cho, S. (2009B). Antagonic effect of *Lactobacillus* sp. KLF01 against plant pathogenic bacteria *Ralstonia solanacearum*. *The Korean Journal of Pesticide Science*. Corea. 13. pp 45 – 53.

Sistema de información agroalimentaria y pesquera (SIAP). www.siap.gob.mx. Pagina consultada el 17 de enero del 2016.

Slavica, A., Trontel, A., Jelovac, N., Kosovec, Ž., Šantek, B. & Novak, S. (2015). Production of lactate and acetate by *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens* DSM 20004^{T} in comparison with *Lactobacillus amylovorus* DSM 20531^{T}. *Journal of Biotechnology*. Croacia. 202. pp 50 – 59.

Sosa, M. (2013). Guía para el reconocimiento de enfermedades en el cultivo de tomate. *INTA*. Argentina. P 34.

Stoyanova, L., Ustyugova, E. & Netrusov, A. (2012). Antibacterial Metabolites of Lactic Acid Bacteria: Their Diversity and Properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*. Rusia. 48 (*3*). pp 229 – 243.

Šušković, J., Koz, B. Begnović J., Leboš A., Habjanič K., & Matošić, S. (2010). Antimicrobial Activity – The Most Important Property of Probiotic and Starter Lactic Acid Bacteria. *Food Technology Biotechnology*. Croacia. 48 (*3*). pp 296–307.

Tlatilpa, M. (2010). Estrategias de manejo *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* en jitomate. *Colegio de postgraduados*. Tesis profesional. México. P 88.

Vacheron, J., Desbrosses, G., Lara, M., Touraine, B., Moënne, Y., Mueller, D., Legendre, L., Wisniewski, F. & Prigent, C. (2013). Plant growth promoting rhizobacteria and root system functioning. *Frontier in Plant Science*. Francia. 356 (*4*). pp 1 – 19.

Vandenbergh, P. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*. Florida. 12. pp 221 – 238.

Visser, R., Holzapfel, W., Bezuidenhout, J. & Kotzé J. (1986). Antagonism of lactic acid bacteria against phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. South Africa. pp 552 – 555.

Wang, H., Yan H., Shin, J., Huang, L., Zhang, H. & Qi W. (2011). Activity against plant pathogenic fungi of *Lactobacillus plantarum* IMAU10014 isolated from Xinjiang Koumiss in China. *Ann Microbiology*. Milan. 61. pp 879 – 885.

Yim, K., Lee, H., Kim, J., Lee, S., Cho, J. & Cha, J. (2012). Characterization of phenotypic variants of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* isolated of *Capsicum anunnuum*. *Eur. J. Pathology*. Corea. 133. pp 559 – 575.

Zhang, Y., Lubberstedt, T., Xu, M. (2013). The Genetic and Molecular Basis of Plant Resistance to Pathogens. *Journal of Genetics and Genomics*. EEUU. 40. pp 23 – 35.

ANEXOS

Anexo 1. Medio MRS Man Rogosa Sharp (MRS).

Peptona: 10.0 g.

Glucosa: 20.0 g.

Extracto de carne: 8.0 g

Citrato de triamonio: 2.0 g.

Extracto de levadura: 4.0 g.

Acetato de sodio tri hidratado: 5.0 g.

Fosfato de potasio dihidratado: 2.0 g.

Sulfato de magnesio heptahidratado: 0.2 g.

Sulfato de manganeso tetra hidratado: 0.05 g.

Composición aproximada para 1000 mL de Agua destilada.

Anexo 2. Medio Papa Dextrosa agar (PDA)

Infusión de papa (Solidos): 4.0 g.

Dextrosa: 20.0 g.

Agar: 15. 0 g.

Composición aproximada para 1000 mL de Agua destilada.

Anexo 3. Medio 802 para el cultivo de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Peptona 10.0 g.

Extracto de levadura 2.0 g.

Sulfato de magnesio heptahidratado 1.0 g/L

Agar 15.0 g.

Composición aproximada para 1000 mL de Agua destilada.

Anexo 4. Medio NBY, para crecimiento de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Caldo nutritivo 8 g/L.

Glucosa 2.5 g/L.

Extracto de levadura 2 g/L

Fosfato de potasio di básico 2 g/L

Fosfato de potasio monobásico 0.5 g/L

Sulfato de magnesio heptahidratado 0.05 g/L

Composición aproximada para 1000 mL de Agua destilada.

Anexo 5. Curva de calibración para la cuantificación de ácido láctico.

Curva de calibración, para la determinación y cuantificación de ácido láctico (Figura 34), utilizando como solvente para el reactivo derivado del benceno, en alcohol metanol, lecturas a 472. 4 nm.

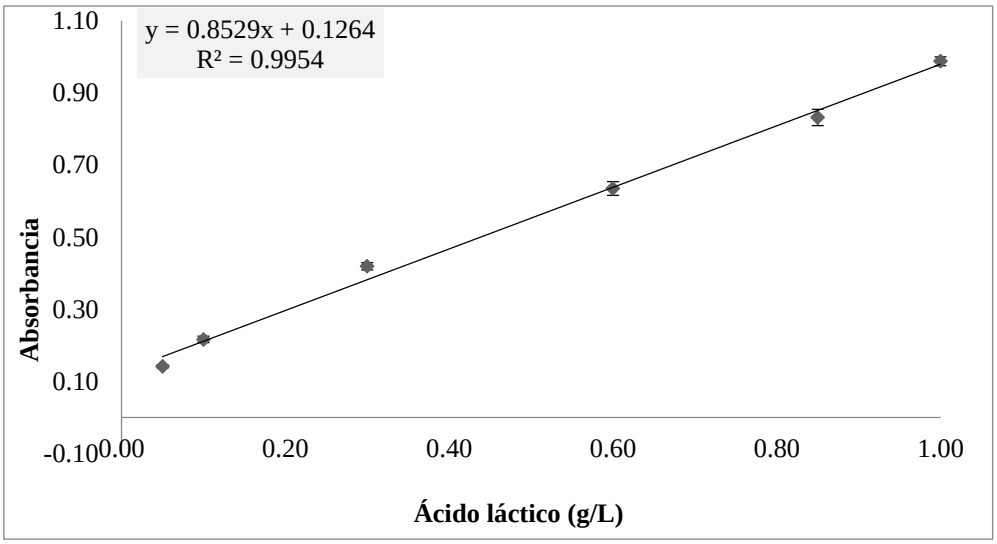


Figura 40. Curva de calibración para cuantificación de ácido láctico.

Anexo 6. Protocolo y curva de calibración para la cuantificación de indoles totales.

Soluciones estándar de ácido 3-indol acético (Sigma Aldrich®).

Preparar una solución de 0.1 g/L (100 µg/mL), disolviendo el ácido 3-indol acético, en agua destilada empleando un matraz aforado (solución madre) cuyo volumen sea el necesario para la preparación de las soluciones consecutivas. Esta solución debe de ser homogénea en su totalidad no deberá presentar solidos suspendidos, la homogeneidad de la solución es de alta importancia por la sensibilidad de la técnica, si se presenta esta situación, el gradiente de color será afectado y la cuantificación será errónea (Figura 35).

A partir de la solución madre preparar en matraces aforados, las soluciones de las concentraciones deseadas (menor a la solución madre), aforar al volumen de marcado por el matraz, empleando agua destilada y disolver perfectamente.

Composición del reactivo de Salkowski.

- 250 mL de agua destilada.
- 150 mL de H_2SO_4 a 18 M.
- 7.5 mL de $FeCl_3$ al 0.5 M.

Protocolo.

1. Obtener los medio de cultivo de las especies *Lactobacillus* spp.
2. Centrifugar a 6000 rpm durante 15 minutos
3. Recuperar el sobrenadante sin llevarse parte del pellet (si ocurre lo anterior, repetir la centrifugación).
4. Diluir la muestra en agua destilada.
5. Tomar 1 mL de muestra.
6. Adicionar 4 mL de reactivo de Salkowski.
7. Tapar tubos y permanecer 20 minutos a temperatura ambiente.
8. Ajustar la longitud de onda del espectrofotómetro a 535 nm.
9. Realizar la lectura a 535 nm (Figura 36 y 37).

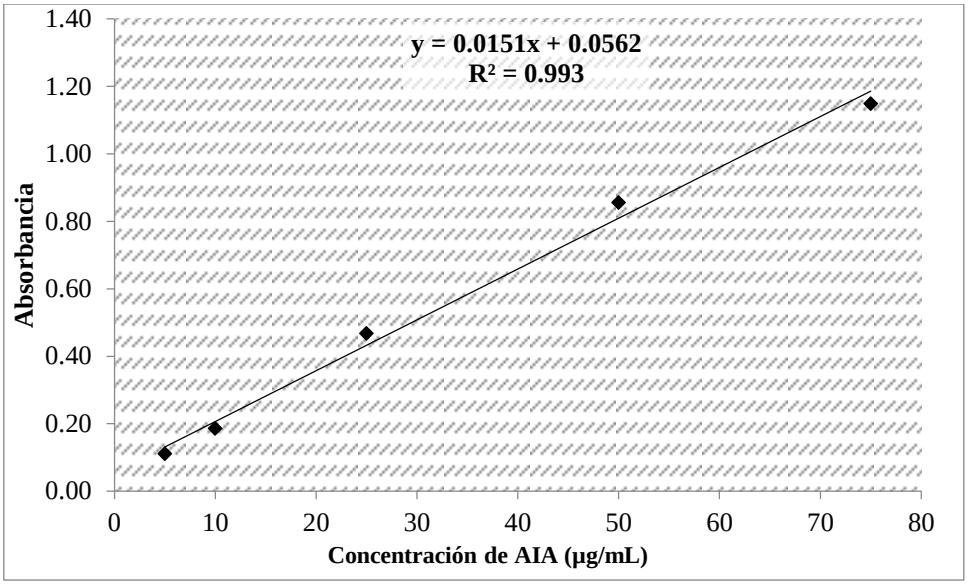


Figura 41. Curva de calibración para la determinación de indoles totales.

Figura 42. Determinación de indoles totales en los medios de fermentaciones.

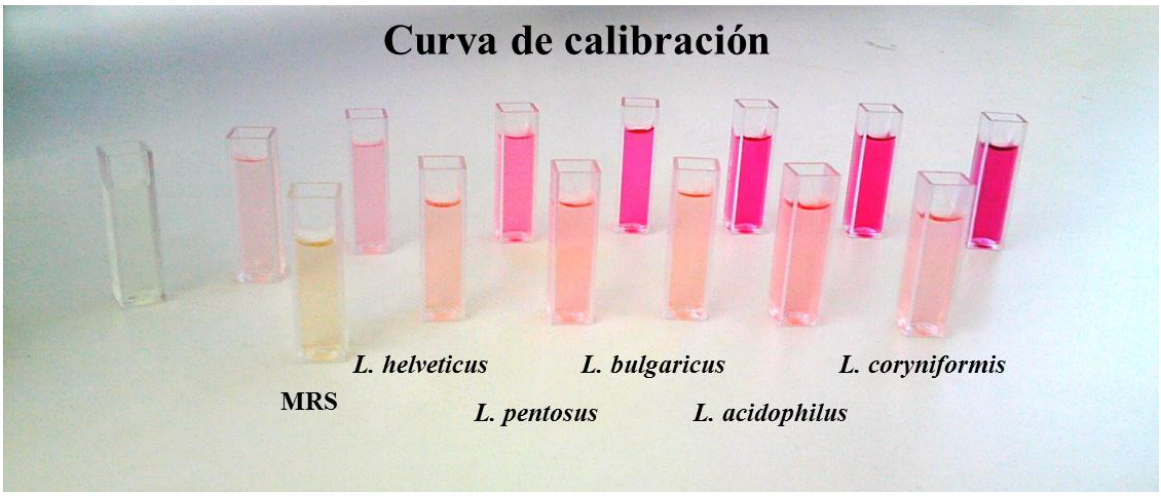


Figura 43. Determinación de indoles totales en los sobrenadantes libres de células.

Anexo 7. Buffer de Fosfatos pH 7.2.

Formulación para 1 L.

Cloruro sódico 8.5 g.

Fosfato di potásico 1.1 g.

Fosfato mono potásico 0.32 g

PH 7.2 ± 0.1

Anexo 8. Técnica de azucares por ácido dinitrosalicílico (DNS).

1. Dilución de la muestra o estándar en agua destilada (Si es necesario).
2. Tomar 0.5 mL de muestra a un tubo limpio.
3. Agregar 0.75 mL de reactivo de DNS.
4. Introducir los tubos de reacción en un baño de agua en ebullición por cinco minutos.
5. Después de este tiempo dar un choque térmico con agua helada (≈ 10 °C).
6. Bajar temperatura a 20 °C.
7. Calibrar el espectrofotómetro a 490 nm.
8. Leer su absorbancia, a 490 nm en espectrofotómetro.

Curva de calibración para la determinación de glucosa por la técnica de DNS (Figura 38), empleando glucosa anhidra como como estándar, la medición de absorbancia se realizó a 490 nm.

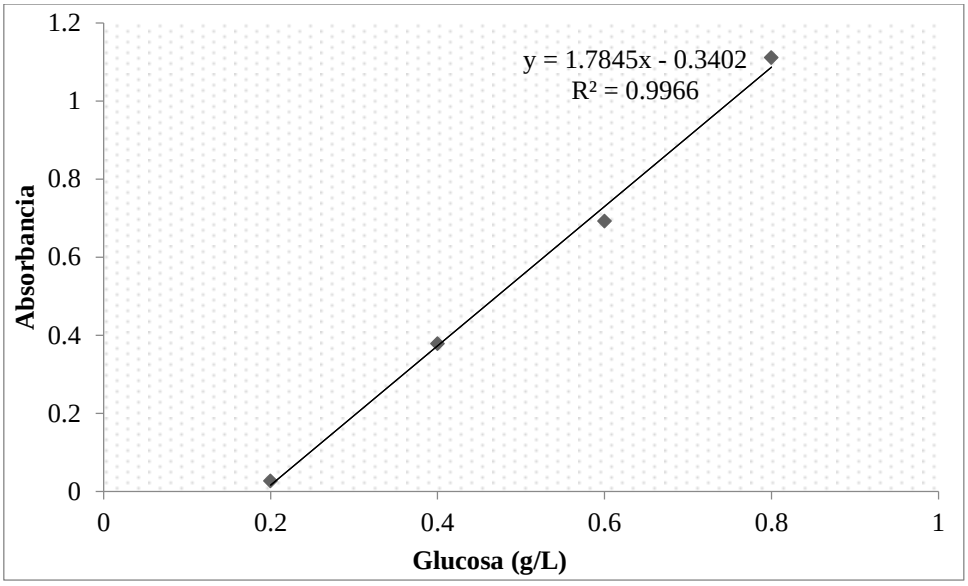


Figura 44. Curva de calibración para la cuantificación de glucosa

Anexo 9. Composición del sustrato para pruebas de germinación y biocontrol.

- Agrolita 20 %.
- Peat moss 40 %
- Vermiculita 20 %
- Humus 20 %

Anexo 10. Composición de solución nutritiva.

Solución nutritiva para desarrollo vegetativo, empleada en las pruebas de actividad promotora de crecimiento y biocontrol.

- Ácido nítrico: 17 ml
- Ácido fosfórico: 4.9
- Nitrato de calcio: 43 g
- Nitrato de potasio: 8.1 g
- Sulfato de potasio: 29.6 g
- Sulfato de magnesio: 32 g
- Fosfato mono amónico: 2.3 g
- Mezcla de micronutrientes: 2.5 g
- Volumen total de solución nutritiva: 200 L

Anexo 11. Protocolo de DAS ELISA (ELISA DOBLE), para detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Agdia®).

Reactivos:

- Buffer de carbonatos para anticuerpos (1X).
  - Disolver en 1000 mL de agua destilada
  - Carbonato de sodio (anhidro) 1.59 g.
  - Bicarbonato de sodio 2.93 g

    Ajustar pH a 9.6. Almacenar a 4 °C.

- Buffer PBST (Buffer de Lavados) (1X)
  - Disolver en 1000 mL de agua destilada.
  - Cloruro de sodio 8.0 g.
  - Fosfato de sodio, di básico (anhidro) 1.15 g.
  - Fosfato de sodio, monobásico (anhidro) 0.2 g.
  - Cloruro de potasio 0.2 g.
  - Tween-20 0.5 g

    Ajustar pH a 7.4.

- Buffer ECI (1X)
  - Agregar a 1000 mL de 1X PBST
  - Seroalbumina (BSA) 2.0 g.
  - Polivinilpiroolidona (PVP) MW 24-40,000 20.0 g.

    Ajustar a pH de 7.4. Almacenar a 4 °C.

- Buffer PNP
  - Disolver en 800 mL de agua destilada
  - Cloruro de magnesio hexahidratado 1.0 g.
  - Dietanolamina 97.0 mL.

Ajustar pH a 9.8 con ácido clorhídrico. Ajustar volumen final a 1000 mL con agua destilada. Almacenar a 4 °C.

- Buffer general de extracción (GEB 1X)
  - Disolver en 1000 mL de 1X de PBST
  - Sulfito de sodio (anhidro) 1.3 g.
  - Polivinilpiroolidona (PVP) MW 24-40,000 20.0 g.
  - Albumina de huevo en polvo. Grado II 2.0 g.
  - Tween-20 20 g.

    Ajustar pH a 7.4. Almacenar a 4 °C.

Nota técnica: Esta prueba usa un buffer especial. Favor de emplear el Buffer ECM para diluir el conjugado enzimático en lugar del Buffer ECI.

Este buffer contiene Leche descremada en polvo como fuente de proteína para el bloqueo. Prepare únicamente lo necesario para el día de prueba.

- Buffer ECM
  - Agregar a 1000 mL de 1X de PBST
  - Leche descremada en polvo 0.4 g.
  - Agitar por 30 minutos.

    Ajustar pH a 7.4. Almacenar a 4 °C

PROTOCOLO.

I. Preparación de la cámara húmeda.
   a. Se preparó una cámara húmeda, al humedecer toallas de papel, se introdujeron dentro de una bolsa de plástico de cierre hermético.

II. Preparación del anticuerpo de captura.

   Nota. Todos los anticuerpos y conjugados enzimáticos deben ser preparados en un contenedor hecho de un material como polietileno o cristal, que no produzca unión con los anticuerpos. No use poli estireno.

a. El anticuerpo de captura fue proveído como una solución concentrada y debe ser diluida con el buffer de carbonato antes del uso. El ratio recomendado de anticuerpo y buffer está marcado en la etiqueta.

   Prepare el volumen de carbonato necesario para la prueba. Se necesitan 100 µL de buffer de carbonato y anticuerpo para pozo de prueba.

   Ejemplo 1. Si la dilución marcada en el recipiente de anticuerpo de captura es 1:200, y necesitas preparar 10 mL de solución de anticuerpos, tú debes mezclar 10 mL de buffer de carbonatos con 50 µL de concentrado de anticuerpo de captura. Mezclar la preparación y usar inmediatamente.

   Ejemplo 2. Si la dilución marcada en el recipiente de anticuerpo de captura es 1:100, y tú necesitas preparar 10 mL de solución de anticuerpos, tú debes mezclar 10 mL de buffer de carbonatos con 100 µL de concentrado de anticuerpo de captura. Mezclar la preparación y usar inmediatamente.

b. Se pipeteo 100 µL de la solución de anticuerpos preparados en cada pozo.
c. Se incubo la placa dentro de la cámara húmeda por 15 horas en refrigeración (4 °C).
d. Se vacío la placa directo al desagüe. Se llenaron los pozos completamente con 1X PBST y se vaciaron nuevamente. Este paso se repitió dos veces más.

III. Manejo de las muestras.

a. Se colectaron muestras de tallo y hojas de las plantas que fueron inoculadas y de aquellas que se les aplico únicamente PBS.
b. Las muestras fueron maceradas con mortero y pistilo estériles (121 °C durante 20 min), utilizando el buffer de extracción GEB en una relación 1:10 (Peso del tejido en g: Volumen del buffer en mL), solo se necesitan 100 µL de muestra por pozo.

IV. Distribución de muestras.

a. Se colocaron 100 µL de la muestra preparada y cada una fue distribuida de acuerdo al diagrama.
b. Se agregaron 100 µL de control positivo en pozos de prueba y 100 µL de buffer de extracción en pozos como control negativo del procedimiento.

V. Incubación de la placa de ELISA.

a. Se colocó la placa dentro de la cámara húmeda por dos horas a 1 °C de temperatura.

VI. Preparación del conjugado enzimático

a. Se preparó esta solución 10 minutos antes de su uso.

b. Se empleó el conjugado enzimático de fosfatasa alcalina que es suplido como un concentrado y debe ser diluido en buffer ECM, el ratio de dilución está marcado en la etiqueta del frasco que lo contiene. Tomar en consideración los ratios de dilución antes mencionados (Anticuerpos), recordando que son necesarios 100 µL de conjugado por pozo de prueba.

c. Preparada la solución junto con el conjugado, la mezcla se agita bien para obtener una mezcla homogénea.

VII. Lavado de pozos.

a. Cuando la incubación de dos horas termino, se lavaron los pozos, primeramente vertiendo su contenido en la tarja, después se llenaron los pozos con PBST 1X y nuevamente se vaciaron, esto se repitió siete veces más.

b. Después del lavado, la placa se invirtió para ser sacudida sobre papel absorbente y eliminar los residuos de humedad, así como restos de tejido.

VIII. Incorporación del conjugado enzimático.

a. Se vertieron 100 µL de conjugado enzimático por pozo de prueba.

b. Se incubo la placa nuevamente dentro de la cámara húmeda por dos horas a temperatura ambiente.

IX. Preparación de la solución PNP.

a. Se preparó un volumen de suficiente de solución PNP, considerando que cada tableta de PNP (ACC 00404), sirve para preparar 5 mL de solución, con una concentración de 10 mg/mL.

b. Cerca de 15 minutos antes del cumplimiento de las dos horas de incubación, se midió el volumen de PNP 1X y se colocó el número de tabletas necesarias, cuidando de no tocar con la piel las tabletas.

Nota. El contenedor con la solución de PNP, fue cubierta con papel aluminio para evitar degradación por la exposición a la luz y así evitar un falso negativo o falso positivo en la prueba.

X. Lavado de placa.

a. Como anteriormente se realizó, se lavaron los pozos con PBST 1X, para esta ocasión fueron ocho veces el lavado.
b. Se inspeccionaron los pozos, para evitar la presencia de burbujas, si se presentan se eliminan con la punta de una micropipeta.

XI. Adición de sustrato PNP.

a. Se pipetearon 100 µL de la solución PNP, en cada pozo de prueba.
b. Se incubo la placa dentro de una cámara húmeda por 60 minutos y se protegió de la luz al ser cubierta con aluminio para evitar la incidencia de la luz en la reacción.

XII. Evaluación de la prueba.

a. Se examinan visualmente los pozos.
b. Los pozos que desarrollan color indican un resultado positivo (Presencia del patógeno). Mientras que aquellos pozos que no hay un cambio en el color indican un resultado negativo (Ausencia del patógeno).

   Nota. Los resultados son válidos únicamente si el control positivo presenta un cambio en el color y el control negativo del procedimiento (Pozos con buffer de extracción) no desarrollaron color.