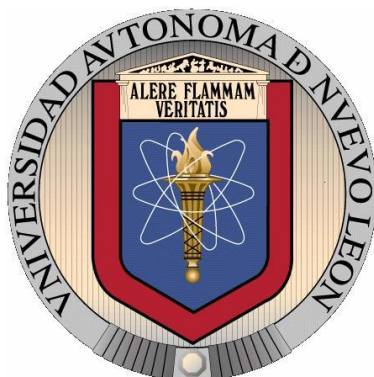


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE  
METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS A PARTIR DE  
*PSEUDOMONAS* AISLADOS DE SUELOS  
MINEROS DE FRESNILLO

Por

MC. MAYELA DE SAN JUAN ROBLES HUÍZAR

Como requisito parcial para obtener el grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad  
en Microbiología.

Julio 2016

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE  
METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS A PARTIR DE  
*PSEUDOMONAS* AISLADOS DE SUELOS  
MINEROS DE FRESNILLO

Comité de Tesis

---

Presidente: Dr. Luis J. Galán Wong

---

Secretario: Dra. Susana de la Torre Zavala

---

Vocal: Dr. Hámlet Avilés Arnaut

---

Vocal: Dra. Katiuska Arévalo Niño

---

Vocal: Dra Lilia Morales

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE  
METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS A PARTIR DE  
*PSEUDOMONAS* AISLADOS DE SUELOS  
MINEROS DE FRESNILLO.

Dirección de Tesis

---

Director: Dr. Luis J. Galán Wong

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme brindado el apoyo económico para poder ver realizada ésta meta.

A Dios, por haberme puesto en este camino y con las personas correctas para decidirme a comenzar ésta etapa que me ha dejado innumerables experiencias no sólo profesionales si no también personales.

Al Dr. Luis J. Galán Wong por su apoyo, durante mi estancia en el Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, NL. México.

A la Dra. Susana de la Torre Zavala y al Dr. Hamlet Avilés Arnaut por haberme permitido realizar éste trabajo de investigación en su laboratorio brindándome su apoyo.

Por último agradezco a todo el personal técnico y estudiantes del L9 por su apoyo, Cristal, Héctor, Faviola, Sam, Tere, Alberto, Isela y Ana quienes hicieron de mi estancia un tiempo muy especial pues cada uno me dejó enseñanzas que no olvidaré.

## **DEDICATORIAS**

A mis Padres, por su apoyo incondicional durante este tiempo que estuve fuera de casa.

A mi Hermana Kenia, a Gabriel y Rubén por abrirme las puertas de su casa por segunda ocasión y todo el apoyo que me brindaron.

A mi hija Kenia Michelle quien, a pesar de la distancia entre ella y yo, fue quien me dio las fuerzas para seguir adelante.

A mi esposo Luis Miguel por ser una luz en mi camino y brindarme todo su apoyo.

# ÍNDICE

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS .....	i
DEDICATORIA .....	ii
INDICE DE TABLAS .....	vii
INDICE DE FIGURAS .....	viii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS .....	ix
RESUMEN .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Control Biológico y bioinoculantes .....	3
2.2 Género <i>Pseudomonas</i> .....	4
2.3 Taxonomía y Genómica del género <i>Pseudomonas</i> .....	5
2.4 Aislamiento .....	8
2.5 Identificación.....	9
2.5.1 Morfología Celular.....	9
2.5.2 Secuenciación de genes de ARN ribosomal .....	11
2.6 <i>Pseudomonas</i> como agentes de control Biológico (BCAs) .....	14
2.6.1 Asociación de <i>Pseudomonas</i> a plantas .....	15
2.6.2 <i>Pseudomonas</i> y suelos supresivos .....	17

2.6.3	Producción de antibióticos de <i>Pseudomonas</i> BCAs .....	18
2.6.4	Mecanismos de regulación de producción de antibióticos en <i>Pseudomonas</i> .....	20
2.6.5	Condiciones de cultivo para la generación de antibióticos en <i>Pseudomonas</i> .....	23
2.7	Fitopatógenos de Interés agrícola.....	24
2.8	Patovariedades de <i>Pseudomonas syringae</i> .....	25
2.8.1	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>Tomato</i> DC3000.....	26
2.8.2	<i>Pseudomonas syringae</i> pv <i>glycinea</i> .....	28
2.8.3	<i>Erwinia spp.</i> .....	29
2.8.4	<i>Agrobacterium (Rhizobium)</i> .....	31
2.8.5	<i>Clavibacter</i> .....	32
2.9	Areas de Muestreo.....	33
2.9.1	Edafología y ubicación del municipio de Fresnillo, Zacatecas .....	33
2.9.2	Toma de muestras .....	35
3.	JUSTIFICACIÓN.....	39
4.	HIPÓTESIS .....	41
5.	OBJETIVOS.....	42
5.1	Objetivo General.....	42
5.2	Objetivos Específicos .....	43
6.	MATERIAL Y MÉTODOS .....	44
6.1	Aislamiento e Identificación primaria de <i>Pseudomonas</i> aisladas de suelos en Fresnillo, Zacatecas .....	44
6.1.1	Toma de Muestras .....	44
6.1.2	Medio de cultivo para Aislamiento primario de <i>Pseudomonas</i> .....	44
6.1.3	Cultivo e identificación macroscópica de aislados de	

<i>Pseudomonas</i> .....	45
6.1.4 Cultivo axénico y almacenamiento de aislados de <i>Pseudomonas</i> .....	45
6.2 Evaluación de actividad antibacteriana de filtrados bacterianos producidos por <i>Pseudomonas</i> aisladas de suelos de Fresnillo, Zacatecas.....	46
6.2.1 Cepas usadas .....	46
6.2.2 Condiciones de activación de <i>P. syringae</i> <i>srv61</i> , <i>P. syringae</i> <i>pv. glycine</i> , <i>P. syringae</i> <i>pv. DC3000</i> y <i>P. tabaci</i> .....	47
6.2.3 Condiciones de activación de <i>E. coli</i> <i>JM103</i> , <i>Erwinia</i> <i>spp.</i> y <i>Agrobacterium</i> <i>spp.</i> .....	47
6.2.4 Producción de metabolitos secundarios de <i>Pseudomonas</i> aisladas de suelos de Fresnillo, Zacatecas .....	48
6.2.5 Determinación de actividad antimicrobiana .....	48
6.3 Identificación molecular de las cepas de <i>Pseudomonas</i> con actividad antibacteriana.....	49
6.4 Optimización de medios de cultivo para la obtención de metabolitos secundarios de <i>Pseudomonas</i> aisladas de suelo de Fresnillo, Zacatecas.....	50
6.4.1 Optimización de medios de cultivo para la generación de metabolitos secundarios de <i>Pseudomonas</i> .....	50
6.4.2 Producción, extracción y purificación de metabolitos secundarios a partir de cultivos de <i>Pseudomonas</i> .....	52
6.5 Determinación de la CMI de los extractos de metabolitos secundarios generados por <i>Pseudomonas</i> aislados de suelos de Fresnillo, Zacatecas .....	53
7. RESULTADOS .....	54
8. DISCUSION.....	67
9. CONCLUSIONES .....	72



10. PERSPECTIVAS .....	74
11. BIBLIOGRAFÍA.....	75
12. RESUMEN BIOGRÁFICO .....	96

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Características del complejo <i>P. fluorescens</i> .....	7
2. Halos de Inhibición de extractos bacterianos generados en medio mínimo de sales .....	58
3. Actividad antibacteriana de metabolitos secundarios presentes en filtrados bacterianos de <i>Pseudomonas</i> MR-IB66 generados en diferentes medios de cultivo.....	64
4. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto concentrado de MR-IB66 en diferentes etapas de la curva de crecimiento .....	66

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Árbol filogenético de diferentes especies de <i>Pseudomonas</i> .....	13
2. Diagrama de dos tipos de resistencia sistémica en plantas .....	25
3. Localización del municipio de Fresnillo en el Estado de Zacatecas.....	35
4. Parque Ecológico “Los Jales” en Fresnillo, Zacatecas .....	36
5. Mina Fresnillo, PLC .....	37
6. Presa de Rivera en la localidad de Concepción, Rivera, Fresnillo .....	37
7. Mapa de localidad de la Estación “San José” en el Municipio de Fresnillo.....	38
8. Aislados de colonias presuntivas de <i>Pseudomonas</i> en agar King B.....	55
9. Fluorescencia característica de cepas de <i>Pseudomonas</i> en caldo King B .....	55
10. Tinción Gram de <i>Psueodmonas</i> en agar King B .....	55
11. Pruba de catalasa realizada a <i>Pseudomonas</i> aisladas de suelos mineros.....	55
12. Halos de Inhibición de metabolitos presentes en filtrados bacterianos de <i>Pseudomonas</i> contra fitopatógenos de interés .....	56
13. Halos de inhibición de filtrados bacterianos obtenidos a diferentes tiempos de la curva de crecimiento del aislado MR-IB66 en 7 medios de cultivo diferentes .....	60
14. Actividad antibacteriana de extractos bacterianos generados por MR-IB66 .....	62

## LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
µg/L	Microgramos por litro
µg/ml	Microgramos por mililitro
µL	Microlitros
µM	Micromolar
2X	Concentración doble
AAI	Identidad de Aminoácidos
ADNr	Ácido Desoxirribonucleico ribosomal
AHL	N-acil homoserin lactona
ARNr	Ácido Ribonucleico ribosomal
ATCC	American Type Culture Collection
AVG	4-formilaminoxivinilglicina
BCAs	Agentes de Control Biológico
CaCl <sub>2</sub>	Cloruro de calcio
Cbs	<i>N</i> -mercapto-4-formilcarbostiril
CDC	Control Disease Center
CLP	Lipopéptido cíclico
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
COR	coronatina

DAPG	2,4-diacetilfloroglucinol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DS	Desviación estándar
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
Est	Estacionario
ET	Etileno
FAO	Food and Agriculture Organization
g	Gramos
GC	Guanina-Citosina
h	Horas
ha	Hectárea
hPa	hectoPascales
IIA	Indol-3-acético
ISR	Resistencia Sistemica Inducida
JA	ácido Jasmónico
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dipotásico
KCl	Cloruro de Potasio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato di hidrógeno de potasio
KHPO <sub>4</sub>	Fosfato monopotásico
KNO <sub>3</sub>	Nitrato de potasio
L	Litros
LB	Luria Bertani
Log	Logarítmica
LPs	lipopéptidos bacterianos
LPSN	List of Procaryotic names with Standing in Nomenclature

M	Molar
MAPG	monoacilfloroglucinol
MDP	Millones de Pesos
MDR	Multidrogoresistente
mg	miligramos
mg/ml	Miligramos por mililitro
MgSo4	Sulfato de magnesio
ml	mililitros
mM	miliMolar
MMS	Medio mínimo de sales
MR-IB66	Aislado de <i>Pseudomonas</i> 66
nm	Nanómetros
NR	No Reportado
PCA	Fenazina 1-ácido carboxílico
PG	Floroglucinol
PGPM	Plant Growth Promoting Microorganism
PGPR	Plant Growth Promoting Rhizobacteria
H	Potencial de Hidrógeno
PHL	Diacetilfloroglucinol
Phl	fenacina
PKS	Policetido sintasa
PLT	Pioluteorina
PLT	Pioluteorina
PPPs	Productos de producción de plantas
pv	Patovariedad
QS	<i>Quorum Sensing</i>

RAM	Resistencia a antimicrobianos
rpm	Revoluciones por minuto
RpoS	RNA polimerasa factor Sigma
SAR	Sistema adquirido de Resistencia
SDS	Dodecilsulfato sódico
spp	especie
srv61	Serovariedad 61
t	Toneladas
T-ADN	Ácido desoxiribonucleico de transferencia
TE	Tris-EDTA
Ti	Inducción de tumores
U/L	Unidades por litro
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
p/p	peso/peso
$\sigma^D$	Factor de control de genes constitutivos
$\sigma^H$	Factor de choque térmico
$\sigma^S$	Factor de fase estacionaria

## RESUMEN

El género *Pseudomonas* es uno de los grupos más diversos y estudiados de las Gamma proteobacterias por su capacidad de generar una amplia variedad de metabolitos secundarios con diferentes aplicaciones biotecnológicas aplicadas al campo, biorremediación, antifúngicos, antibacterianos, antiparasitarios e incluso compuestos antitumorales. En el presente trabajo se logró el aislamiento de 86 cepas presuntivas del género *Pseudomonas* a las cuáles se les evaluó la capacidad de generar metabolitos secundarios con actividad antibacteriana contra fitopatógenos como *Erwinia spp*, *Pseudomonas syringae* pv tomato, *glycinea*, *Agrobacterium*, *Clavibacter* y *E. coli* JM103 en donde se obtuvo como resultado que el aislado 66 (MR-IB66) fue el que presentó actividad antibacteriana contra todos los microorganismos probados con halos de inhibición de hasta 0.9 cm. Además se realizó la optimización de los medios de cultivo usados durante la fermentación con diferentes fuentes de carbono como glucosa, glicerol y sacarosa, lo cual mostró que el aislado MR-IBB 66 durante la curva de crecimiento es capaz de generar metabolitos con actividad antibacteriana contra diferentes fitopatógenos durante la fase logarítmica y estacionaria de la curva de crecimiento, lo que sugiere que es capaz de realizar diferentes procesos de biotransformación que le permiten generar ésta actividad bajo diferentes condiciones nutrimentales. Por lo que al realizar las CMI de los metabolitos generados en cada etapa se concluyó que el medio mínimo de sales con glucosa como principal fuente de carbono es el más efectivo ya que muestra CMI's de 2 a 4 mg/ml comparado con los otros medios. Los resultados obtenidos en el presente trabajo



abren una brecha en cuanto a determinar si los compuestos generados por la *Pseudomonas* aislada de suelos mineros de Fresnillo funcionan como sustrato para ser biotransformado en otro compuesto cuya actividad sea selectiva de un fitopatógeno en especial. Por lo que aún quedan estudios por hacer para identificar los procesos metabólicos realizados por el aislado MR-IB66 en diferentes condiciones nutricionales y así mejorar el proceso de generación de compuestos antibacterianos que puedan ser utilizados como bioinoculantes para el control de fitopatógenos de interés agrícola.

## ABSTRACT

The genus *Pseudomonas* is one of the most diverse and studied groups of Gamma proteobacteria for its ability to generate a wide variety of secondary metabolites with different biotechnological applications applied to the field, bioremediation, antifungal, antibacterial, antiparasitic and even antitumor compounds. In the present work he achieved the isolation of 86 presumptive strains of the genus *Pseudomonas* which were evaluated the ability to generate secondary metabolites with antibacterial activity against phytopathogens such as *Erwinia* spp, *Pseudomonas syringae* pv tomato, glycinea, *Agrobacterium*, *Clavibacter* and *E. coli* JM103 obtaining as a result that isolate 66 (MR-IB66) was the one that presented antibacterial activity against all microorganisms tested with halos of up to 0.9 cm inhibition. In addition, the optimization of the culture media used during fermentation with different carbon sources such as glucose, glycerol and sucrose was performed, which showed that the MR-IBB 66 isolate during the growth curve is capable of generating metabolites with antibacterial activity against different phytopathogens during the logarithmic and stationary phase of the growth curve, which suggests that it is able to perform different biotransformation processes that allow it to generate this activity under different nutritional conditions. Therefore, when performing the MICs of the metabolites generated in each stage, it was concluded that the minimum salt medium with glucose as the main carbon source is the most effective since it shows CMI's of 2 to 4 mg / ml compared with the other media. The results obtained in the present work open a gap in determining whether the compounds generated by *Pseudomonas* isolated from Fresnillo mining soils function as a substrate to be biotransformed in another compound whose activity is selective for a particular phytopathogen. So there are still studies to be done to identify the metabolic processes performed by the isolate MR-IB66 in different nutritional conditions and thus improve the process of generation of antibacterial compounds that can be used as bio-inoculants for the control of phytopathogens of agricultural interest.

## 1. INTRODUCCIÓN

Por un largo periodo, el desarrollo de la microbiología se ha basado en el estudio de cultivos puros y análisis que contribuyen al entendimiento de los microorganismos, sin embargo, una gran variedad de especies microbianas coexiste en su medio ambiente natural permitiéndoles interactuar entre sí, este tipo de interacción confiere la capacidad a algunos microorganismos de sintetizar y secretar metabolitos secundarios que son usados como compuestos antimicrobianos.

El enfoque en las diversas comunidades microbianas de suelo se ha dado primordialmente a la percepción de que la producción de metabolitos con actividad antimicrobiana, les confiere a algunos microorganismos ventaja competitiva en diferentes nichos ambientales, de ésta manera los microorganismos se han utilizado como una fuente de metabolitos bioactivos con propiedades biotecnológica.

En la actualidad existe una demanda continua para el desarrollo y la identificación de nuevos compuestos dirigidos a contrarrestar los efectos del uso de agroquímicos en el campo, así como estrategias de aislamiento de compuestos biológicamente activos a través de filtrados bacterianos, los cuáles son evaluados mediante ensayos *in vitro* seguidos de la purificación e investigación individual de los componentes. Sin embargo, la mayoría de estos filtrados comprenden de una gran variedad de metabolitos bioactivos de forma que

la purificación y estudio individual de cada uno pudiera eliminar la bioactividad que presenta en conjunto con los demás.

Además, la producción de la mayoría de estos compuestos bioactivos no se encuentra de forma natural en el medio ambiente, debido a que son producidos por cambios que afectan la estabilidad del microorganismo, se ha demostrado que algunas fitotoxinas son producidas por *Pseudomonas* hasta que colonizan la planta confiriéndole una ventaja selectiva relacionada con la formación de metabolitos secundarios.

Por lo que en este trabajo además de buscar especies de *Pseudomonas* que produzcan metabolitos con actividad antibacteriana contra diferentes fitopatógenos de interés agrícola también se buscó la optimización de un medio de cultivo para obtener mayor rendimiento en la producción de éstos ya que existe poca información que tome en cuenta la formulación de un medio de cultivo para la mayor producción de metabolitos secundarios a partir de *Pseudomonas* y de ésta manera considerarlos como bioinoculantes que permitan su uso en campo.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 CONTROL BIOLÓGICO Y BIOINOCULANTES

El control biológico se refiere a la inter-relación de diversos factores ambientales que permitan disminuir los efectos desfavorables de organismos perjudiciales e incrementar el crecimiento de organismos útiles como insectos, cultivos y microorganismos (Pal *et al.*, 2006) con el objetivo de disminuir el uso de agroquímicos y por ende los riesgos para la salud humana y el medio ambiente (Cook *et al.*, 1983).

Desde que el control biológico fue desarrollado hace 25 años se ha despertado un gran interés en la aplicación de microorganismos para el manejo de enfermedades de plantas debido a que algunas bacterias no patógenas habitantes del suelo poseen la habilidad de antagonizar los efectos de diversos fitopatógenos y así prevenir la enfermedad considerándose como una alternativa realista para el uso de fungicidas (Walsh *et al.*, 2001).

Fravel (2005) publicó un listado de 14 bacterias y 12 hongos registrados en la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos utilizados para el control de enfermedades de plantas de las cuales seis corresponden a *Bacillus*, cinco a *Pseudomonas*, dos a *Agrobacterium* y uno a *Streptomyces* (Fravel., 2005).

Sin embargo, algunas especies de *Pseudomonas* son particularmente aceptadas como agentes de biocontrol debido a que pueden usar diversos tipos de exudados como fuente de nutrientes, su hábitat natural es en suelos; especialmente en la rizósfera; tienen un amplio rango de crecimiento, son capaces de promover de forma directa el crecimiento de la planta y tienen la habilidad de controlar enfermedades por una gran variedad de mecanismos (Chin-A-Woeng *et al.*, 2003) por lo que es un género de interés con diversas aplicaciones biotecnológicas.

## **2.2 Género *Pseudomonas***

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia de las gamma proteobacterias conformado por más de 100 especies diferentes capaces de utilizar un amplio rango de compuestos orgánicos e inorgánicos que le permiten sobrevivir a diferentes condiciones ambientales (Palleroni, 1992), de manera que han sido aisladas de diferentes fuentes incluyendo agua, suelo, plantas, animales y humanos (Weston *et al.*, 2012)

Desde que el género *Pseudomonas* fue descrito por primera vez, la asignación de los aislados dentro de éste género ha sido contencioso y a la fecha una gran diversidad de cepas se ha relacionado no sólo por sus características fenotípicas sino también por sus características genéticas y metabólicas (Staniel *et al.*, 1996), sin embargo, la resolución de su estructura intragenética mediante el uso de técnicas de hibridación de ADN-ADN, análisis de rRNA y secuenciación de multi-locus ha permitido la reorganización de las especies (Palleroni y Moore., 2004).

En la actualidad sólo el grupo rRNA I incluye al género *Pseudomonas* en las que 128 especies han sido descritas incluyendo las *Pseudomonas* fluorescentes que tienen la capacidad de producir sideroforos como la pioverdina en condiciones de déficit de hierro; veintitrés especies son patógenas de plantas incluyendo *Pseudomonas syringae* con 36 patovarietades, dieciséis especies están asociadas a enfermedades de animales y humanos (Peix *et al.*, 2009) y algunas otras especies como *Pseudomonas aeruginosa* son ubicuas y se asocian tanto a plantas como a animales, mientras que las especies saprófitas son usadas en aplicaciones biotecnológicas para promover el crecimiento y la salud en plantas así como para biorremediación de suelo y agua (Hofte y Altier., 2010).

### **2.3 Taxonomía y Genómica del género *Pseudomonas***

El género *Pseudomonas* es uno de los géneros bacterianos más diversos en el ambiente, de acuerdo a la lista de nombres de procariotes con posición en nomenclatura (LPSN) a la fecha se han reconocido 253 especies y 18 subespecies del género *Pseudomonas* (<http://www.bacterio.net/pseudomonas.html>) lo que refleja un incremento del 19% comparado con el año 2014 (Scales *et al.*, 2014). En julio del 2015 el genoma completo de por lo menos 81 especies diferentes fue agregado al banco de genes (GenBank) junto con otros 152 genomas designados como “especies de *Pseudomonas*” seguidas por el nombre de la cepa (Jun *et al.*, 2016).

La notable diversidad ecológica y biológica de *Pseudomonas* spp. se ve reflejada en su genoma, cuyo tamaño varía de 4.6 a 7.1 M bases y su contenido de GC es de 57.8 a 66.6

% y es relativa al tamaño del núcleo genómico entre especies y solo 2468 genes están conservados entre cepas representadas en cuatro especies de *Pseudomonas*, sin embargo, el porcentaje del proteoma compartido entre las cuatro especies varía del 40 % para *P. fluorescens* Pf-5 (con 6137 genes codificadores de proteínas) al 46 % para *P. putida* KT2440 con 5350 genes codificadores de proteínas (Paulsen *et al.*, 2005)

El núcleo genómico típicamente incluye genes conservados y ARNs que son esenciales para la sobrevivencia del microorganismo, pero la mayoría de los genes en *Pseudomonas* son específicas de la especie o son compartidas por un sub juego de especies (Mathee., *et al.*, 2008).

Estos genes comprenden un genoma flexible a *Pseudomonas* el cual refleja la adaptación de las cepas individuales a un estilo de vida específico por lo que la biosíntesis de metabolitos secundarios está conferida a este repertorio genómico el cual interviene en las interacciones bacterianas con huéspedes animales o de plantas, co-inhabitantes microbianos o predadores en el ambiente, el cual juega un papel importante en la adquisición de nutrientes, factores de virulencia y defensa contra competidores y predadores en ambientes naturales (Gross y Loper 2009).

Estas cuatro especies de *Pseudomonas* que poseen un enorme espectro de síntesis de metabolitos a partir de clusters distribuidos entre cada especie está conformado por *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas entomophila*, *Pseudomonas syringae* y *Pseudomonas fluorescens* la cuál es la especie más estudiada.



En la tabla 1 se muestran las principales características del complejo de *Pseudomonas fluorescens* el cual está conformado al menos por 52 especies separadas incluyendo *P. poae*, *P. synxatha*, *P. tolaasii*, *P. brassicacearum*, *P. chlororaphis* y *P. fluorescens* (Silby *et al.*, 2009; Almeida y Araujo., 2013; Konstantinidis *et al.*, 2006)

**Tabla 1.** Características del complejo *P. fluorescens*

Características Generales
<p><b>Taxonomía</b>  <i>Bacteria, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Pseudomonadales, Pseudomonadaceae, Pseudomonas</i></p>
<p><b>Características Físicas</b>            Bacilos Gram negativos            Móviles, poseen Flagelos polares            No formadores de esporas            Producen un pigmento fluorescente (piocianina) del cual el nombre <i>P. fluorescens</i> es derivado            Produce exopolisacáridos y es formador de biopelículas</p>
<p><b>Características de Crecimiento</b>            Aerobios obligados, pero son capaces de usar nitratos en lugar de oxígeno como último aceptor de electrones durante el proceso de respiración celular            Temperatura óptima de crecimiento oscila de 25-30 ° C para aislados del ambiente y de 34 a 37° C para aislados de mamíferos            Oxidasa y Catalasa positivos            Crece bien en agar soya tripticasa (TSA) y Agar Luria (LA)</p>
<p><b>Actividad hemolítica</b>            No para aislados ambientales            Sí para aislados mamíferos (por ejemplo cepa MFN1032)</p>
<p>Forma colonias pequeñas, blancas y convexas</p>

## 2.4 AISLAMIENTO

El género *Pseudomonas* está conformado por bacilos Gram negativos, móviles, aerobios, quimioorganótrofos y crecen a un pH que oscila entre 4 y 8, su temperatura de crecimiento varía de los 4° a 32° C a partir de muestras de medio ambiente, mientras que en aislados de humanos u otros mamíferos son capaces de crecer hasta por arriba de los 37° C.

Los aislados ambientales se llevan a cabo *in vitro* mediante técnicas estándares de cultivo con medios simples e incubación aerobia a temperaturas de 27 a 32° C por un tiempo de 24 a 48 horas, sin embargo, una de las dificultades en el aislamiento de especies particulares del género, es que comparten la misma fisiología y crecen bajo las mismas condiciones de cultivo, por lo que es necesaria la producción de pigmentos el cual varía por grupos de especies que se pueden identificar con medios de cultivo selectivos como el agar King's A o King's B que son deficientes en hierro y permiten la detección directa mediante la producción de sideroforos fluorescentes, lo que ayuda a diferenciar entre especies; por ejemplo, *P. aeruginosa* produce un pigmento azul verdoso (piocianina) mientras que el pigmento de color amarillo verdoso fluorescente (pioverdina) es característico del complejo de *Pseudomonas fluorescens* (Meyer *et al.*, 2002).

Por otro lado, agregar compuestos como potasio, magnesio y/o cetrimida ayuda a inhibir el crecimiento de microorganismos no pseudomonales que permite el incremento de la selectividad del mismo (Brittan *et al.*, 2014) lo que es un paso crucial para su aislamiento e identificación ya que también permite estudiar sus características metabólicas.

Los medios de cultivo más utilizados para el aislamiento de *Pseudomonas* es el Gould S1 el cual es un medio de enriquecimiento (Gould WD *et al.*, 1985) y el King's B (King EO *et al.*, 1954) aunque no se ha estudiado con exactitud si éstos medios de cultivo reflejan la cantidad de población de *Pseudomonas* presentes en el ambiente (Li L. *et al.*, 2013).

Un medio de cultivo puede hacerse selectivo de *Pseudomonas* al adicionar compuestos como la cetrimida que inhibe el crecimiento de microorganismos no pseudomonales (Britan *et al.*, 2014) o antibióticos como Penicilina G, Novobiocina, ciclohexamida y Trimetoprim los cuales permiten el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* (Sands y Rovira., 1970; Fromin *et al.*, 2001) y por lo tanto son los medios de cultivo recomendados para el aislamiento de *Pseudomonas fluorescens* a partir de muestras de suelo, agua y material orgánico que contenga otro tipo de microorganismos (Schroth *et al.*, 1992).

## **2.5 IDENTIFICACIÓN**

### **2.5.1 Morfología celular**

Las especies de *Pseudomonas* son bacilos alargados o cortos con una longitud máxima de 4 µm, se pueden encontrar solas, en pares o cadenas cortas, aunque esta descripción no siempre corresponde en todas las especies ya que algunas son extremadamente cortas mientras que otras pueden ser extremadamente largas (*P. putida* y *P. syringae*).

Son bacterias Gram negativas y en la mayoría de las especies la pared celular se lisa en presencia de EDTA debido a su alto contenido de fósforo en la membrana externa (Wilkenson., 1970)

La presencia de flagelos es común en las especies de *Pseudomonas* lo que le permite responder a estímulos químicos (quimiotaxis) de manera que aumenta su habilidad de localizar sustratos orgánicos a bajas concentraciones, cabe señalar, que la mayoría de las *P. aeruginosas* poseen un solo flagelo, mientras que especies como *P. alcaligenes*, *P. mendocina*, *P. pseudoalcaligenes* y *P. stutzeri* poseen de dos a tres flagelos. Éste tipo de estructura se ha observado en los polos de la célula, y son los responsables de producir el movimiento tipo swarming. (Shinoda y Okamoto., 1977; Dasgupta *et al.*, 2000).

Por otra parte, una característica común de las *Pseudomonas* fluorescentes es la producción de pigmentos que fluorescen con luz UV a longitudes de onda cortas (254 nm) si el crecimiento se realiza en medios con limitación de hierro. Estos pigmentos son conocidos como sideroforos (Meyer *et al.*, 2002) cuyo valor taxonómico de la expresión depende de la especie y características de cada cepa, como el caso de la piorubina (producida por *P. aeruginosa*, color rojo), oxiclolorafina (*P. aureofasciens*, color naranja), clororafina (*P. chlororaphis*, color verde) y oxiclolorafina (*P. chlororaphis*, color naranja) (Hugh y Gilardi., 1980). De acuerdo a análisis de genotipificación éste tipo de compuestos es de suma importancia para la diferenciación de las especies (Fuchs *et al.*, 2001).

### **2.5.2 Secuenciación de genes de ARN ribosomal**

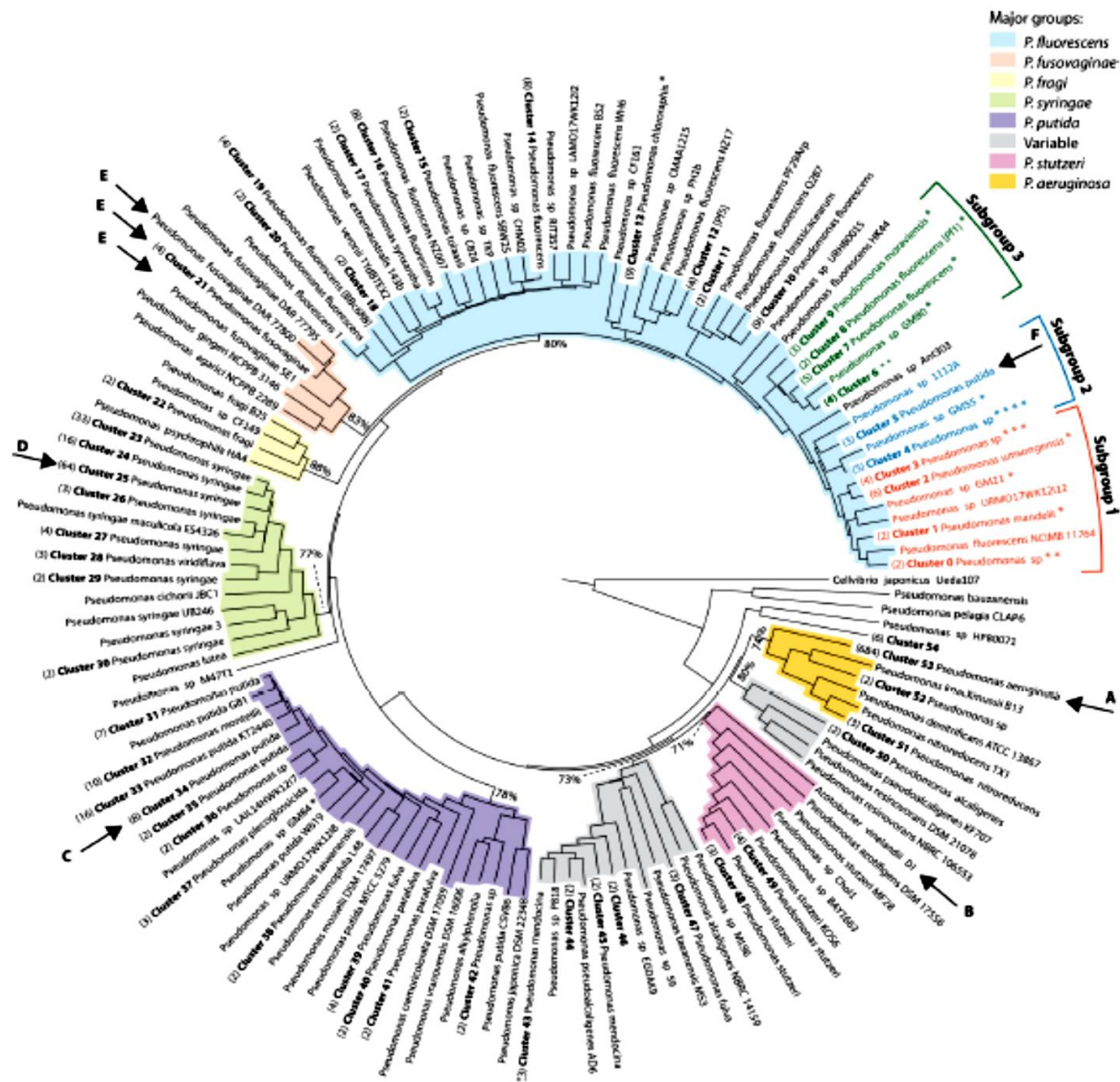
En los últimos años la taxonomía microbiana ha adoptado cierta conexión con los análisis filogenéticos, particularmente aquellos derivados de análisis de secuencias de genes de ARNr como un importante “marco de referencia” en la taxonomía. (Moore *et al.*, 2006)

Los análisis de secuenciación de RNAr-ADNr han sido esenciales para elucidar las relaciones intragenérica de las bacterias, y la determinación de genes mediante análisis del gen 16S de ARNr es de los más recomendados para la descripción de nuevas especies, sin embargo, se ha demostrado que éste tipo de identificación sólo permite demostrar las estructuras evolucionarias dentro del espectro de las especies de *Pseudomonas* (Anzai *et al.*, 2000).

Las similitudes en la secuenciación de genes ARNr y las relaciones filogenéticas pueden ser usadas como herramientas para el diagnóstico e identificación de bacterias en muestras clínicas o ambientales. La alta especificidad de las sondas del ADN y las diferentes regiones de la molécula de ARNr contienen diferentes sitios conservados lo que proporciona blancos para el marcaje de oligonucleótidos para la detección *in vitro* e *in situ* de diferentes niveles taxonómicos de las bacterias (Amann *et al.*, 1995).

Se-Ran Jun *et al.*, (2016) realizaron un análisis de más de 1000 genomas de *Pseudomonas* incluyendo 21 cepas aisladas de la raíz del álamo negro (*Populus deltoides*) y

determinaron que todos los genomas de *P. fluorescens* fueron organizados en 20 distintos cluster (Fig. 1) de manera que se representa su enorme diversidad y heterogeneidad por lo que es necesario realizar la secuenciación de múltiples aislados específicamente de *P. fluorescens* el cual demostró mayor variabilidad genética de manera que se puedan estudiar sus capacidades funcionales desde una perspectiva pangenómica (Se-Ran Jun *et al.*, 2016).



**Fig. 1** Arbol basado en AA de 1.073 genomas de *Pseudomonas* con ramificaciones para más de un genoma. Los cluster genómicos están numerados (negritas), el número de genomas incluidos de cada grupo se muestra en paréntesis y el nombre de la especie dominante aparece después del número del grupo. Los cluster genómicos individuales se identifican con el nombre de la cepa y se clasifican en nueve grupos principales correspondientes a los grupos de especies de *Pseudomonas* codificados en colores. (Se-Jan Run *et al.*, 2016)

## **2.6 *Pseudomonas* COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO (BCAs)**

Las bacterias no patógenas habitantes del suelo con la habilidad de antagonizar diversos fitopatógenos y prevenir enfermedades en plantas son conocidas como agentes de control biológico (BCAs).

*Pseudomonas* poseen muchas características que las hacen adecuadas como BCAs y promotoras de crecimiento en plantas (Weller., 1988), éstas incluyen habilidades como:

- a) capacidad de crecer rápidamente *in vitro* de forma que pueden ser producidas en masa
- b) son capaces de utilizar exudados de raíz y semillas
- c) colonizan y se multiplican en la rizósfera, espermósfera y el interior de la planta
- d) produce una amplia gama de metabolitos bioactivos como antibióticos, sideroforos volátiles, y sustancias de promoción de crecimiento
- e) compiten contra otros microorganismos y
- f) se adaptan a diferentes factores ambientales.

Además, son responsables de la supresión natural de patógenos de suelo (Weller *et al.*, 2002), se ha demostrado que son capaces de provocar una respuesta de resistencia a enfermedades conocido como Resistencia Sistémica Inducida (ISR) lo que incrementa su potencial como productos de protección de plantas (PPPs) (Van Loon *et al.*, 1998; Pieterse y Van Loon., 1999) sin embargo una desventaja es que no son capaces de producir esporas como el caso de *Bacillus* lo que complica su formulación para uso comercial.



### 2.6.1 Asociación de *Pseudomonas* a plantas

La rizósfera se conoce como una “zona” influenciada por plantas (Hiltner, 1904), esta zona alrededor de la raíz es una de las más intensas con actividad antimicrobiana debido a la secreción de compuestos orgánicos y aminoácidos. Las especies de *Pseudomonas* se encuentran entre los colonizadores de suelo más competentes (Lutenberg *et al.*, 2001).

Cuando se habla de una “asociación” a plantas se incluyen microorganismos que son tanto benéficos como patógenos los cuales son capaces de colonizar los mismos nichos ecológicos y poseen mecanismos similares de colonización (Höfte y De Vos., 2006; Preston., 2004)

La colonización de la rizósfera de manera exitosa requiere cumplir con diferentes características como movilidad y quimiotaxis, la presencia de pilis especializados para la adhesión a superficies, la presencia de lipopolisacáridos e integridad de la membrana para una eficiente captación de nutrientes, habilidad de sintetizar vitaminas y macromoléculas, resistencia a toxinas y otro tipo de defensas de la planta. *Pseudomonas* en general, posee todas estas cualidades confieren ventaja selectiva para explotar los recursos naturales de la rizósfera, además de que inhiben la colonización de otros microorganismos en la planta (Bianciotto *et al.*, 1996).

Sin embargo, algunas especies de *Pseudomonas* también pueden afectar el crecimiento de la planta de forma negativa, por ejemplo, a través de la inducción de la herida por congelamiento (Lidow., 1995). Las especies fitopatógenas de *Pseudomonas* son diversos con respecto a su genética, ecología y el tipo de enfermedad que causa. La especie *P. syringae* incluye más de 50 patovarietades la mayoría de las cuales colonizan diferentes tipos de plantas y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza (Lodewyx *et al.*, 2002)

Mientras que las cepas que intervienen en el crecimiento y salud de la planta son conocidas como bacterias promotoras de crecimiento (PGPR) o *Pseudomonas* fluorescentes probióticas de plantas (se hace referencia a las bacterias probióticas y levaduras que se encuentran en el tracto gastrointestinal) (Haas y Keel., 2003; Picard y Bosco., 2008) que incluyen cepas como *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas chlororaphis* (*Pseudomonas aureofaciens*) (Anjaiah *et al.*, 1998; Audenaert *et al.*, 2002).

Uno de los mecanismos por los cuales especies de *Pseudomonas* son considerados como BCAs es que tienen la capacidad de estimular el crecimiento mediante el incremento de la disponibilidad y captación de minerales por la solubilización de fosfato o por inducir el crecimiento de la raíz mediante la producción de fitohormonas (Vessey., 2003), sin embargo, la asociación entre *Pseudomonas* y la planta depende en sí del proceso de colonización el cual puede desarrollarse en la rizósfera, el rizoplano o dentro de la raíz (Weller 1988). Cuando algunas de éstas comunidades crecen debajo del suelo, una gran

diversidad de microorganismos (epífitos) son capaces de interactuar en la superficie de la planta (filósfera) sobretodo en las hojas, por lo que deben estar bien adaptadas a sobrevivir en este ambiente de forma que sobrevivan a las limitaciones de nutrientes y agua (Bailey., 2004).

### **2.6.2 *Pseudomonas* y suelos supresivos**

Un suelo supresivo es aquel en el cual se inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos como hongos o bacterias fitopatógenas de forma que son incapaces de inducir enfermedades en cultivos susceptibles. Éste fenómeno ha sido bien caracterizado y existe fuerte evidencia de que la supresión de enfermedades es el resultado de la presencia de rizobacterias con actividad antimicrobiana (Walsh *et al.*, 2001)

Se han caracterizado dos tipos de supresión de enfermedades. La primera se refiere a la supresión de suelos general y se atribuye a la actividad de la comunidad microbiana, generalmente es asociada a la competencia de recursos disponibles (Mazzola., 2002; Weller *et al.*, 2002) y puede ser potenciada por la adición de materia orgánica (Tomihama *et al.*, 2016); la segunda es la supresión directa y está directamente relacionada a la actividad de un grupo determinado de microorganismos que interfieren en alguna etapa del ciclo de vida de los patógenos de suelo. Este tipo de supresión puede ser transferido a suelos propicios mediante la mezcla de pequeñas cantidades de suelo supresivo (1-10% p/p) con el suelo a mezclar (van der Voort *et al.*, 2016).

Al igual que el sistema inmunológico en animales provee de una respuesta primaria, la respuesta de defensa en el suelo es muy similar y requiere de células especializadas, tiempo y memoria para suprimir a los fitopatógenos presentes (Lapsansky *et al.*, 2016; Raaijmakers y Mazzola., 2016). Diversos estudios han demostrado que microorganismos como *Pseudomonas* tienen la capacidad de generar metabolitos con actividad antimicrobiana que han sido aislados con alta frecuencia de suelos supresivos. Dada la importancia ecológica de la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana no es de sorprender que la eficacia de *Pseudomonas* BCAs como biocontrol esté ligada a la producción de estos compuestos (Vincent *et al.*, 1991).

### **2.6.3 Producción de antibióticos de *Pseudomonas* BCAs**

*Pseudomonas* es un género en el cual muchas especies han sido identificados como productores de metabolitos con actividad antimicrobiana estos incluyen compuestos como fenacinas, pirrolnitrinas, 2,4-diacetilfluoroglucinol (DAPG), pioluteorina (Bloemberg *et al.*, 2000), piocianina, cianuro de hidrógeno y viscosinamida los cuales son de interés para el biocontrol (Haas y Défago., 2005).

Además de otros compuestos como *N*-mercapto-4-formilcarbostiril (Cbs) el cual fue efectivo contra fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fusarium culmorum*, *Cladosporium cucumerinum* y *Colletotrichum lagenarum* (Fakhouri *et al.*, 2001); Lipopéptidos (Yang *et al.*, 2004); 4-formilaminoxivinilglucina (AVG) el cual tiene actividad antimicrobiana *in vitro* contra *Erwinia amylovora* (Halgren *et al.*, 2011);

furanomicina la cual tiene actividad antimicrobiana contra *Bacillus megaterium*, *Dickeya dadantii*, *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas syringae maculicola* M4 y *tomato* DC3000 (Trippe *et al.*, 2013); nunamicina y nunapeptina los cuales han demostrado que poseen actividad antimicrobiana contra *Rhizotocnia solani* y *Phytum aphanidermatum* (Michelsen *et al.*, 2015).

Otro compuesto de interés es el 2,4-diacetilfloroglucinol (DAPG) el cual ha sido de los más estudiados puesto que contribuye al control biológico de enfermedades de plantas, se conoce que es producido por algunas cepas de *Pseudomonas fluorescens* como CHA0 y Pf-5 (Keel *et al.*, 1991; Kidarsa *et al.*, 2011). El DAPG es un factor clave en las propiedades de suelos supresivos contra la enfermedad del trigo (Raaijmakers and Weller., 1998; Keel *et al.*, 1996) debido a que es capaz de suprimir el crecimiento de *Thielaviopsis basicola* (la cual induce podredumbre de la raíz negra del tabaco) y *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici* (enfermedad del trigo) *in vitro*. Además, se ha determinado que la producción de DAPG es proporcional a la densidad de la población por lo que su uso en el control de fitopatógenos depende de la capacidad del microorganismo para instalarse en la raíz ((Raaijmakers *et al.*, 1999; Kidarsa *et al.*, 2011).

Contrario a los lipopéptidos bacterianos (LPs), que son compuestos anfipáticos producidos por bacterias del suelo como actinomicetos, bacilos o *Pseudomonas* y son secretados para cumplir con una gran cantidad de funciones como defensa, incremento en la movilidad celular y formación de biopelículas (Raaijmakers *et al.*, 2010) y representan

una clase prometedora de productos naturales con propiedades antibióticas (Hashizume y Nishimura (2008).

Los LPs de *Pseudomonas* spp fueron clasificados en 9 grupos los cuales han sido probados por su actividad surfactante, o en contextos fitopatógenos, por sus propiedades antifúngicas y su participación en virulencia, así como por su potencial para inhibir el crecimiento de bacterias (Sing y Cameotra., 2004). Los LPs relacionados a dicha actividad son la viscosina (Gerard *et al.* 1997), siringomicina (Scaloni *et al.*, 2004), tolaasina (Bassarello *et al.*, 2004) y siringopeptina (Grgurina *et al.*, 2005) los cuales tienen actividad primordialmente contra microorganismos Gram positivos como *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus* o *Mycobacterium tuberculosis* (Sacchetti *et al.*, 2008).

#### ***2.6.4 Mecanismos de regulación de producción de antibióticos en Pseudomonas***

El control de la expresión de genes a nivel transcripcional es reconocido como el primer mecanismo para la modulación de la producción de metabolitos secundarios. En este sentido, el uso de factores  $\sigma$  ha recibido especial atención. Se ha propuesto que existe un factor de control de genes constitutivos ( $\sigma^D$ ), el factor de choque térmico ( $\sigma^H$ ) y el factor de la fase estacionaria ( $\sigma^S$ ) juegan un papel importante en la regulación de la producción de metabolitos secundarios (Duffy y Defago., 1997; Schinder *et al.*, 1995; Whistler *et al.*, 2000) así como la regulación de la transcripción de metabolitos secundarios mediante activadores/represores. La proteína Ph1F se expresa en el locus Ph1 y reprime la

transcripción del operon *PhIA-D* que codifica proteínas relacionadas directamente en la síntesis de fenacina (Ph1) (Delany *et al.*, 2000).

Otro factor ampliamente estudiado para la producción de metabolitos secundarios es el *quorum sensing* (QS) que se define como control de la expresión de genes dependiente de la densidad celular el cual está presente en cepas como *P. fluorescens* 113 la cual es productora de N-acilhomoserin lactonas lo que sugiere que el QS también es de importancia para el biocontrol de cepas (Laue *et al.*, 2000).

El segundo nivel de control de producción de metabolitos secundarios opera a un nivel post-transcripcional, por lo que hay diferentes enfoques para explorar y explotar las rutas biosintéticas para la generación de nuevos compuestos. Por ejemplo, se busca la expresión heteróloga de fragmentos genómicos obtenidos de microorganismos cultivables y no cultivables (metagenómica) seguidas por ensayos de actividad y perfil metabólico; inactivación de rutas metabólicas mediante la manipulación de genes o retar a microorganismos con condiciones de cultivo específicos u otras señales externas (Gross *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2012).

En *Pseudomonas* se han realizado estudios para descifrar el metaboloma de diversas especies al identificar los clusters genéticos para la generación de metabolitos secundarios. En este orden, el sistema *GacS/GacA* está altamente conservado y conforma el sensor unido a membrana de quinasa GacS que se activa bajo condiciones ambientales aún

desconocidas y lleva a cabo la fosforilación de GacA para controlar la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Pseudomonas* (Haas y Défago., 2005).

En especies como *P. protegenes* Pf-5 este sistema interviene en el proceso de homeostasis de hierro lo que incrementa los niveles de transcripción en la biosíntesis de sideroforos y otros mecanismos de captación de hierro (Hassan *et al.*, 2010). Además, el sistema *GacS/GacA* también regula la expresión de genes relacionados a virulencia, formación de biopelículas, movilidad, *quorum sensing*, respuesta al estrés y supervivencia (Kinscherf y Willis-, 1999; Haas y Keel., 2003; Raaijmakers *et al.*, 2010; Yamazaki *et al.*, 2012).

Sin embargo, éste mecanismo puede no trabajar de la misma manera para las especies de *Pseudomonas*. Cheng *et al.*, (2013) realizaron un estudio con mutantes del sistema *GacS/GacA* en *Pseudomonas fluorescens* SBW25 la cual es bien conocida por su capacidad de producción de metabolitos secundarios como toxinas, antibióticos y sideroforos (Loper *et al.*, 2007) y observaron que al inactivar este sistema se incrementa la actividad antimicrobiana de la cepa (Cheng *et al.*, 2013) esto debido a que cuando hay una mutación en *GacS* se aumenta la expresión de genes *pqq* lo que lleva a un incremento en la producción de ácido glucónico y ácido 2- cetoclugónico. Esto acidifica el medio extracelular que inhibe el crecimiento de otros microorganismos (Cheng *et al.*, 2015).



### 2.6.5 *Condiciones de cultivo para la generación de antibióticos en Pseudomonas*

La producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana obtenidos de las diferentes cepas de *P. fluorescens* en el laboratorio, depende de la formulación del medio de cultivo, así como de las condiciones de incubación a las cuáles las cepas son sometidas.

Comprender los factores ambientales que regulan la biosíntesis de compuestos antimicrobianos es un paso esencial para mejorar la calidad y confiabilidad de la actividad biológica del compuesto. Se ha determinado que las fuentes de carbono encontradas en exudados de raíz de plantas tienen una influencia diferencial en la producción de antibióticos por cada una de las cepas de *P. fluorescens* utilizadas, independientemente de los efectos en el crecimiento bacteriano, por ejemplo, la producción de Pioluteorina (PLT) y el 2,4-diacetil-floroglucinol (DAPG) es estimulada por la presencia de glicerol y glucosa respectivamente, mientras que en presencia de glucosa la producción de Pioluteorina se reprime hasta que ésta fuera eliminada en el medio (Duffy y Défago, 1999).

En otro estudio Slinninger y Shea-Wilbur determinaron que las condiciones de cultivo de *P. fluorescens* 2-79 influían en la producción en masa de la fenacina-1-ácido carboxílico (PCA). Ellos observaron que la acumulación de fenacinas dependía de la temperatura y pH del cultivo, así como de la fuente de carbono y determinaron que el cultivo de *P. fluorescens* 2-79 incubada en un rango de 25-17° C a un pH de 7 y en presencia de glucosa se obtenía mayor biomasa y por lo tanto mayor producción de fenacinas, a diferencia de

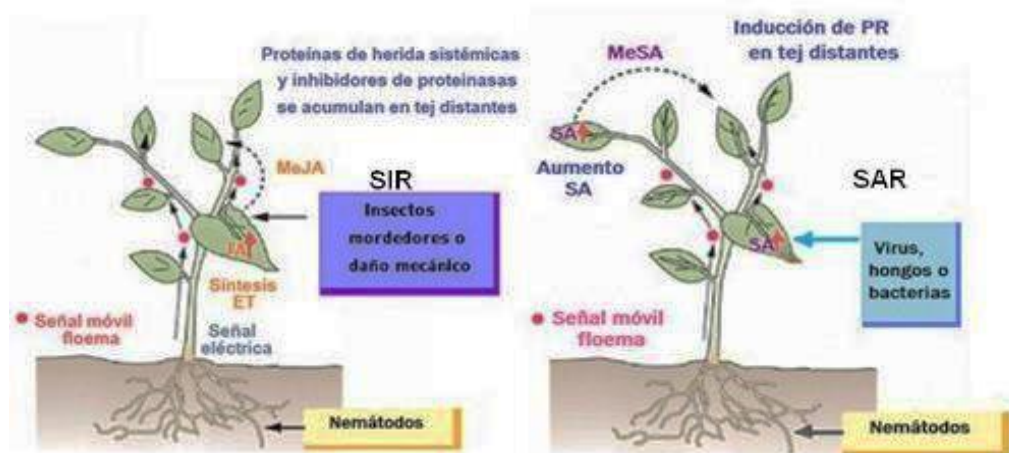
los cultivados con fuentes de carbono como glicerol, xilosa y fructosa. (Slininger y Sheawilbur, 1995)

Por lo que la optimización de un medio de cultivo a partir de diferentes especies de *Pseudomonas* es de gran importancia para optimizar los procesos de generación de compuestos con actividad antimicrobiana.

## **2.7 FITOPATÓGENOS DE INTERÉS AGRÍCOLA**

Durante el ciclo de vida de las plantas éstas son vulnerables a diferentes retos ambientales de estrés biótico y abiótico como la sequía, herbívoros y microorganismos potencialmente patógenos como hongos, nematodos, virus y bacterias, para los cuáles las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de defensa que les permita sobrevivir a este tipo de ataques. Éstos mecanismos incluyen el Sistema Adquirido de Resistencia (SAR) y el Sistema Inducido de Resistencia (SIR) mismos que son activado cuando la planta se encuentra en una situación de estrés la cual puede ser ocasionada por la presencia de microorganismos o compuestos químicos que afecten su equilibrio con el medio ambiente (Fig. 2). (Ponce de León y Montesano, 2013).

Para que la planta pueda desarrollar alguna enfermedad, es necesario que sea susceptible al agente patógeno y que la infección se desenvuelva en un ambiente adecuado de forma que permita la interacción entre ambos y así producir el daño fisiológico (Pesley *et al.*, 2010).



**Fig. 2** Diagrama esquemático que muestra dos tipos diferentes de resistencia sistémica en plantas. El sistema adquirido de resistencia (SAR) es activado bajo el ataque del patógenos, tratamientos foliares con microbios o daño asociado a patrones moleculares y fitohormonas o ciertos xenobióticos (pesticidas). El sistema Inducido de Resistencia (SIR) el cual es dirigido por ácido jasmónico (JA) y Etileno (ET). Ambos mecanismos son cruciales para la defensa contra estrés

La variedad de enfermedades presentes en las plantas está dada porque cada fitopatógeno tiene diferentes mecanismos de acción (Agrios., 2005) lo que ocasiona que la planta reaccione y tenga la necesidad de defenderse. Entre los principales patógenos que disminuyen el rendimiento y demeritan la calidad del producto se encuentran enfermedades inducidas por hongos y bacterias gran interés como algunas especies de *P. syringae*, *Erwinia*, *Agrobacterium* y *Clavibacter*.

## 2.8 PATOVARIEDADES DE *Pseudomonas syringae*

El impacto económico de *P. syringae* ha ido en aumento, con la reaparición de enfermedades viejas incluyendo la enfermedad de la mancha del tomate (Shenge *et al.*, 2007) y el surgimiento de nuevas infecciones de importancia a nivel mundial como la úlcera del castaño de las indias (Green *et al.*, 2010).

Diferentes pato variedades ocasionan problemas a largo plazo a través de la producción de distorsiones y úlceras. Las infecciones anuales de las cosechas son más esporádicas y los brotes son a menudo causadas por la siembra de semillas contaminadas. Muchos reportes destacan la naturaleza del crecimiento de *P. syringae*, sin embargo, es un patógeno notablemente adaptativo que surge en lugares extraños como agua derretida de los polos (Morris *et al.*, 2007). Por lo que éste grupo de bacterias está incluido entre las diez bacterias fitopatógenas de importancia agrícola (Mansfield *et al.*, 2012)

Las patovariedades de *Pseudomonas syringae* representan no solo el grupo primario de bacterias patógenas de plantas, sino también el de hongos y oomicetos (Cunnac *et al.*, 2009; Hann *et al.*, 2010; Oliva *et al.*, 2010) por lo que la búsqueda de nuevas formas de biocontrol para éste tipo de patógenos es de gran importancia. En los siguientes puntos se habla de las características generales de dos pato variedades con las que se trabajó en este estudio

### **2.8.1 *Pseudomonas syringae* pv *Tomato* DC3000**

*Pseudomonas syringae* DC3000 es un patógeno de gran importancia ya que es el agente causal de la enfermedad de la peca bacteriana en tomate y pimiento, además de que infecta especies de *Arabidopsis* y *Brassica* en el laboratorio (Xin y He-, 2013; Zhao *et al.*, 2003).

Esta enfermedad es favorecida por temperaturas bajas y condiciones de humedad alta, actualmente se encuentra distribuida en todas las zonas del mundo en donde se cultiva tomate. Cuando afecta frutos, el moteado intenso origina una fuerte reducción en el rendimiento (Pernezny y Zhan., 2008; Martin *et al.*, 2010).

*P. syringae* pv *tomato* forma lesiones en los foliolos con una coloración entre castaño oscuro a negra, estas lesiones carecen de halo en los estados iniciales de desarrollo y se extienden por toda la hoja, pero es más notable en el envés que en el haz. Las lesiones pueden coalescer de forma que se presenta necrosis en grandes porciones del tejido. Los tallos, peciolo, pedúnculos, pedicelos y sépalos son igualmente afectados. En fruto se forman pequeñas manchas oscuras que raramente son mayores a 1 mm de diámetro, generalmente las lesiones están ligeramente levantadas sobre la superficie y pueden dar la apariencia de estar hinchadas (Pernezny y Zhan., 2008; Kado., 2010)

La bacteria es transmitida por semilla y se disemina por el salpique del agua de lluvia y herramientas de trabajo, especialmente durante los trasplantes. *P. syringae* pv *tomato* puede sobrevivir en los restos de cosecha hasta por 30 semanas. El ciclo de infección de *Pseudomonas syringae* pv *Tomato* DC3000 es típico de bacterias patogénicas foliares. En el desarrollo de la enfermedad muestra dos estilos de vida que están interconectados: el primero corresponde a una fase epífita y posteriormente se desarrolla una fase endófito en el apoplasto (Meloto *et al.*, 2008), usan la N-acil homoserin lactona (AHL) como molécula

de señalización de *quorum sensing* (QS) el cual es un proceso fundamental para el desarrollo de la enfermedad (Betani *et al.*, 2004).

Otro mecanismo de patogenicidad es la presencia de más de trece efectores de tipo III los cuales actúan dentro de las células de la planta para suprimir la muerte celular programada asociada a la inmunidad de forma que se incrementa el crecimiento del patógeno y por ende el desarrollo de la enfermedad (Lin y Martin., 2005).

DC3000 es productora de una toxina conocida como coronatina (COR) el cuál induce la clorosis contribuyendo al crecimiento y formación de lesiones en el tejido de la planta. Diversos estudios han demostrado que COR juega un papel importante en la patogénesis debido a que controla la apertura de estomas durante la infección bacteriana (Bender *et al.*, 1987; Melotto *et al.*, 2008)

### **2.8.2 *Pseudomonas syringae* pv *glycinea***

*P. syringae* es el agente causal del tizón bacteriano de la soya que presenta síntomas como lesiones con agua que desarrollan manchas necróticas dentro de la hoja rodeadas por un halo clorótico. Las bajas temperaturas y un alto porcentaje de humedad favorecen la infección y el desarrollo de la enfermedad (Dunleavy., 1988).

Ataca a todos los órganos verdes de la planta, pero principalmente a las hojas, los síntomas se traducen en pequeñas manchas marrones, granuladas de superficie plana sin protuberancias, generalmente brillantes cuando ocurre el exudado bacteriano. Las manchas coalescen y el limbo foliar se puede resquebrajar lo que deja un “agujero” el cual es un síntoma comúnmente observable en las hojas superiores más sometidas al viento. Las lesiones casi negras, sin elevaciones en el envés, conglomeradas, la rotura de la hoja y su aparición desde la parte media del canopeo, la distinguen de la roya asiática. Es muy difundida en todas las zonas de cultivo y se desconoce su incidencia en el rendimiento (Gomila *et al.*, 2017; Zembek *et al.*, 2018).

Al igual que otras patoviedades *P. glycinea* también produce coronatina lo que permite el aumento de la patogenicidad en plantas de tomate, plantas de col chino entre otras (Tamura., 1998) al inducir clorosis en las hojas, promover la senectud en tabaco, hipertrofia de tejido en tuberculos, inhibición del crecimiento de raíz en trigo, síntesis de etileno en tabaco y síntesis de inhibidores de proteinasas en el tomate (Kenyon y Turner., 1990; Sakai *et al.*, 1979; Palmer y Bender., 1995)

### **2.8.3 *Erwinia spp.***

*Erwinia* es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, la mayoría de sus especies son patógenas de plantas. *E. amylovora* fue la primera bacteria que se demostró que causaba enfermedades en plantas en el año de 1800 (Griffith *et al.*, 2003).

Es el agente causal del tizón del fuego el cual afecta a un amplio rango de huéspedes y es la mayor amenaza a nivel mundial en la producción de manzana y pera (Bonn *et al.*, 2000; Van der Zwet *et al.*, 2012). Esta enfermedad se encuentra ampliamente difundida en cuarenta y seis países distribuidos en todos los continentes. En Norteamérica se conoce desde hace más de 200 años y fue identificada en 1974 en el estado de Chihuahua, pero en el año de 1987 se empezó a considerar como un problema grave ya que se estima que un 10% de las plantaciones de manzana se ven seriamente afectadas (Manriquez *et al.*, 2004)

Las moscas se encargan de llevar la bacteria a las primeras flores y las abejas las diseminan de flor en flor, la lluvia y el viento también ayudan en su diseminación. Una vez infectadas las flores, si se presentan las condiciones adecuadas de la enfermedad se forman gotas de pus que contienen millones de bacterias las cuales entran por las estomas o a través de heridas por fricción, picaduras de insectos o golpes de granizo lo que ayuda a que la bacteria viaje de manera interna hasta el tronco o raíces y así provocar la muerte del árbol ((Manriquez *et al.*, 2004)

Dentro del número limitado de opciones disponibles para el tratamiento es la aplicación profiláctica de antibióticos durante el tiempo de floración suele ser el más efectivo, sin embargo, restricciones reglamentarias, problemas de salud pública y el desarrollo de



resistencia a antimicrobianos por parte de los patógenos limita severamente la perspectiva de usar antibióticos a largo plazo (Duffy *et al.*, 2005; Stockwell y Duffy., 2012).

#### **2.8.4 *Agrobacterium (Rhizobium)***

Actualmente todo el género de *Agrobacterium* ha sido revisado y reordenado en su mayoría en el género *Rhizobium*, algunas de las especies se han clasificado dentro de sus propios géneros creados expresamente para ellos como: *Stappia*, *Ruegeria* o *Pseudobacter*. *A. tumefaciens* ha recibido el nombre de *Rhizobium radiobacter* cambiando simplemente el nombre del género. Es una bacteria Gram negativa que usa la transferencia horizontal de genes para causar tumores en diversas especies de plantas con importancia agrícola y económica incluyendo arbustos ornamentales, viñedos, cerezos, bayas. Nogales y plantas perennes (Subramoni *et al.*, 2014)

La bacteria vive en el suelo y para infectar las raíces de las plantas necesita que éste tenga heridas, a través de las cuáles logra ponerse en contacto con las células de la raíz y transferir parte de su ADN al interior de la planta. *Agrobacterium* puede sobrevivir en suelo durante varios años como saprófito y una vez que infecta a la planta estimula la producción de agallas las cuáles son visibles después de 2 a 4 semanas de infección cuando la temperatura fluctúa entre 20° C y 30° C.

Su patogenicidad es atribuida a su capacidad de percibir señales que activan genes de virulencia responsables de la transferencia e integración de ADN (T-ADN) para la inducción de tumores (Ti). La expresión de T-ADN conduce a la producción de ácido indol-3-acético (IAA), citoquininas y opinas que estimulan el crecimiento de plantas para formar tumores. Así como la activación de sistemas de *quorum sensing* y *quorum quenching* para evadir los mecanismos de defensa de la planta (Subramoni *et al.*, 2014)

### **2.8.5 *Clavibacter***

Ésta bacteria es un fitopatógeno que afecta a cultivos de tomate y papa, *Clavibacter michiganensis* subesp. *michiganensis* el agente causal de la mancha ocular, marchitez bacteriana y ojo de pájaro. Hoy en día se ha convertido en una de las enfermedades más devastadoras del cultivo de tomate en México y el mundo, ya que puede llegar a causar pérdidas de hasta un 70% en la producción si no es tratada adecuadamente. Se encuentra distribuida en todo el mundo y en México se encuentra en la mayoría de los estados que producen tomate, (García., 2016). En 2009 en Sinaloa, ésta enfermedad afectó a 200 ha de jitomate cultivado bajo invernadero lo que causa pérdidas aproximadamente de cuarenta millones de dólares (Cárdenas-Sierra *et al.*, 2011)

Ataca al sistema vascular y al tejido parenquimatoso por lo que sus síntomas dependerán de factores como prácticas culturales, nutrición, edad de la planta, condiciones climáticas y grado de colonización de la bacteria. En plántulas causa marchitez y enanismo, en las hojas inicialmente aparece como áreas húmedas de color verde claro luego se desecan y

toman una apariencia de color pardo. Generalmente son confundidos con una mala aplicación de agroquímicos, mancha bacteriana, tizón temprano o daño por ácaros. En los tallos las lesiones al unirse forman áreas de aspecto harinoso, rugoso, escamoso y de color pardo. Dentro de los tallos se pueden presentar bandas de color café las cuales se pueden romper y formar cavidades con apariencia de cancro. En determinado momento el daño causado al sistema vascular induce la marchitez de la planta y posteriormente a su muerte (García., 2009).

## **2.9 AREAS DE MUESTREO**

### ***2.9.1 Edafología y ubicación del municipio de Fresnillo, Zacatecas***

La ciudad de Fresnillo es la cabecera municipal del municipio de Fresnillo en el estado de Zacatecas en México. Es la ciudad más importante del estado conociéndose como El mineral y la Capital mundial de la Plata debido a que se encuentra la mina de plata de mayor producción en el mundo (Ayuntamiento de Fresnillo, 2017)

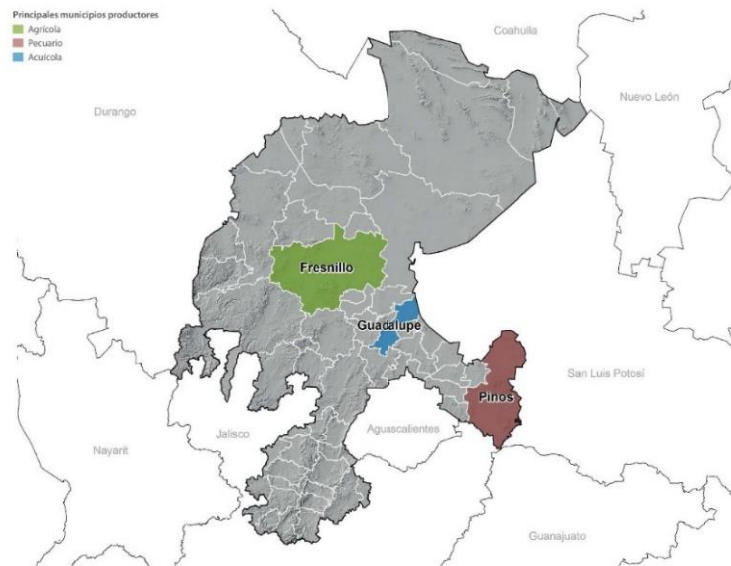
Es uno de los 57 municipios que conforman el estado y colinda al norte con los municipios de Sain Alto, Río Grande y Cañitas de Felipe Pescador; al este con los municipios de Villa de Cos, Pánuco, Calera y Gral. Enrique Estrada; al sur con los municipios de Gral. Enrique Estrada, Calera, Jerez y Valparaíso; al oeste con los municipios de Valparaíso, Sombrerete y Sain Alto. Fresnillo representa el 6.6 % de la superficie total del estado y se localiza en la parte central del mismo (Fig. 3).

Además de las excavaciones de la explotación minera los usos de diferentes tipos de roca que predomina son las que presentan características de tipo sedimental de plantas acumuladas en lugares pantanosos, caliza, yeso, solgema, mineral de hierro, magnesio y silicios arsénicos, traventino conglomerado e ígneas con uso recomendable para materiales de construcción.

Se definen seis unidades de suelo en la periferia las cuales son fluvisol-eutríco, ranker, xerosol-háplico, yermosol-háplico, cambisol-eutríco, litosol-eutríco.

El uso que se le da a la mayoría de los suelos es de actividad agrícola la cual en el estado de Zacatecas es de 7 millones 491 mil toneladas de cosecha durante el año agrícola por lo que Fresnillo es el municipio con mayor superficie sembrada (162, 630 ha) y cosechada (161,849 ha) colocándose en primer lugar por su valor en la producción (Fig. 5). En el año 2017 su valor agrícola fue de 3, 426 MDP (Atlas Agroalimentario, 2017).

La disponibilidad de los productos agrícolas para el año 2017 fueron el Frijol (386,690 t), chile verde (419,808 t), Lechuga (82,706 t), tomate rojo (191,654 t) y maíz forrajero (2, 269, 739 t) y Tomate verde (84,805 t) (Atlas Agroalimentario, 2017).



**Fig. 3** Localización del municipio de Fresnillo en el Estado de Zacatecas. En la figura se representa con color verde la actividad Agrícola, con guinda el sector Pecuario y con azul el sector Acuícola. Fresnillo es el municipio con mayor actividad Agrícola en el Estado

Así como los cultivos perenes como el durazno (25,921 t), Uva mesa (19,714 t), Uva Industrial (24,217 t), manzana (3,611 t) y alfalfa (1,222,730 t).

### 2.9.2 Toma de Muestras

- a) **Parque Ecológico los Jales** Es un área de 29 hectáreas forestada desde el año de 1980 en un esfuerzo por fortalecer la conciencia ambiental y las oportunidades de recreación en El Mineral, se inauguró el 11 de septiembre del 2004 y el objetivo era cubrir la sedimentación de jales (desechos de trabajos realizados por la empresa minera). Se agregaron atractivos al paseo y se cuenta con un lago artificial el cual

es producto del reciclaje del agua utilizada en los procesos cotidianos de la mina (Figura 4).



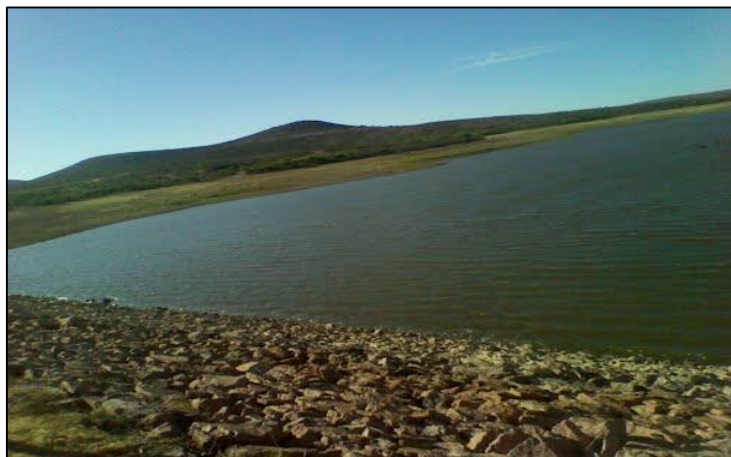
**Fig. 4** Parque Ecológico “Los Jales” en Fresnillo, Zacatecas México

**b) Mina Proaño.** Es una de las minas de plata más grandes y rentables del mundo, se localiza en los suburbios de la ciudad de Fresnillo, Zacatecas; por lo que la mina es conocida como Mina Fresnillo. Produjo el 33% de plata total del grupo en 2015 y genera 20.1% de los ingresos ajustados netos a la Industria. En la parte externa de la mina se construyó un parque ecológico cuya función es apoyar a la rehabilitación de especies animales decomisadas para su posterior liberación, cuenta con una gran variedad de especies entre las que se encuentran el halcón de Harris, coyote, águilas cola roja, gato montés, oso negro, un tigre de bengala y dos leones. Además, se cuenta con un recorrido al interior de la mina que culmina con la subida a un mirador donde se aprecia la ciudad de Fresnillo (Fig. 5)



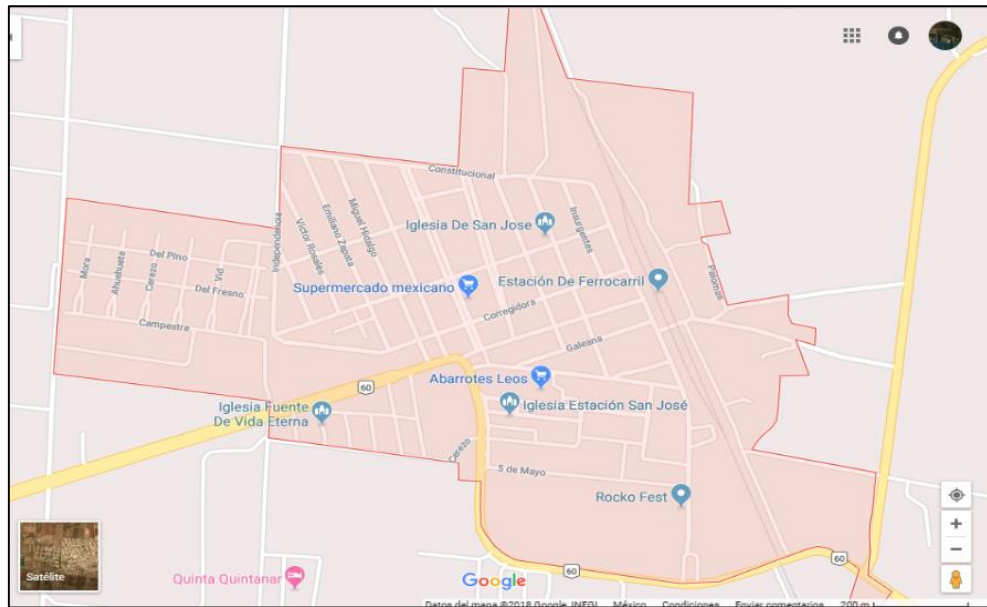
**Fig. 5** Mina Fresnillo, PLC. Recorrido Turístico

c) *Presa de Rivera* La localidad de Concepción Rivera (Fig. 6) está situado en el municipio de Fresnillo (en el estado de Zacatecas). Tiene 420 habitantes y se encuentra a 2215 metros de altitud. Existen cerca de 70 agricultores en la región y los principales productos que siembran son chile y Frijol.



**Fig. 6** Presa de Rivera en la localidad de Concepción Rivera, Fresnillo, Zacatecas

d) **Estación San José.** Localidad situada a 8 km al oriente de la mancha urbana (Fig. 7), su fundación se remonta al año de 1884 cuando la línea férrea llegó a esta región. En el año de 1900 fue inaugurada una línea de tranvías que corría de la estación al centro de Fresnillo y fue el primero en el estado de Zacatecas., hoy en día cuenta con 3487 habitantes.



**Fig. 7** Mapa de Localidad de la Estación San José en el Municipio de Fresnillo



### 3. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día la producción de alimentos se ha convertido en un rubro de seguridad nacional para el mundo. El continuo incremento poblacional y la escasa superficie de tierra cultivable son un reto para la agricultura. Se estima que para el año 2050 la producción global de alimentos debe incrementar en un 70% (Ingram., 2011) lo que exige un manejo eficiente en el control de enfermedades para la producción de cultivos (Oerke *et al.*, 2004)

Aunado a lo anterior, la presencia de plagas y enfermedades es uno de los factores que merman la productividad y calidad de los cultivos. Datos de la FAO sugieren que puede haber más de un 50% de pérdidas si éstas no se controlan oportunamente (FAO., 2018).

Históricamente el control de plagas se ha realizado con el uso de moléculas químicas, lo cual en su momento benefició el desarrollo de la agricultura, sin embargo, actualmente el uso y abuso de ellos han ocasionado reportes de resistencia a prácticamente todos los fungicidas, así como daños en los ecosistemas y la salud humana.

En búsqueda de nuevas alternativas que coadyuven al control de enfermedades se ha retomado el uso de sustancias químicas naturales y de microorganismos, los cuales forman parte del manejo biorracional.

En ese contexto, el uso de enmiendas microbianas representa una opción amigable desde el punto de vista ambiental como alternativa a la aplicación de fertilizantes minerales solubles. Dichas enmiendas se producen a partir de microorganismos con diferentes capacidades promotoras de crecimiento vegetal y que en su conjunto reciben el nombre de microorganismos promotores de crecimiento vegetal (PGPM) los cuales pueden afectar el crecimiento vegetal por un amplio rango de mecanismos como solubilización de fosfato inorgánico, disminución de los niveles de etileno en plantas, fijación de nitrógeno atmosférico, biocontrol de enfermedades de plantas, producción de fitohormonas, sideróforos y ácidos orgánicos de gran utilidad en el sector agrícola (Datta *et al.*, 2011).

Lo anterior es de gran importancia en el estado de Zacatecas ya que la agricultura es una de las principales actividades económicas en el estado, tanto así, que la producción de chile seco, ajo y frijol ocupan el primer lugar en producción a nivel nacional. Seguido de la producción de Lechuga, tomate verde, uva industrial y uva fruta, cebolla, avena forrajera en verde, guayaba, maíz forrajero verde, tuna y zanahoria. Por lo que es imperativo que se busquen alternativas que beneficien ésta producción y que no solamente influyan en la salud del suelo sino también en el control de fitopatógenos que disminuyen la cantidad o calidad de los cultivos.

#### **4. HIPÓTESIS**

Los metabolitos secundarios obtenidos por *Pseudomonas fluorescens* presentadas de suelos del municipio de Fresnillo, Zacatecas presentan actividad antimicrobiana contra diferentes especies de bacterias patógenas de plantas.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL**

Aislar a partir de suelos mineros de Fresnillo, Zacatecas, bacterias del género *Pseudomonas* que produzcan metabolitos secundarios con actividad antibacteriana contra bacterias patógenas de plantas.

## 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar diferentes especies de *Pseudomonas fluorescens* a partir de suelos de Fresnillo, Zacatecas.
2. Evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de filtrados bacterianos producidos por los diferentes aislados de *Pseudomonas fluorescens* obtenidos de suelos de Fresnillo, Zacatecas
3. Identificar mediante la secuenciación 16s las cepas *Pseudomonas fluorescens* obtenidas de suelos de Fresnillo, Zacatecas con actividad antibacteriana
4. Optimizar las condiciones de cultivo para la obtención de metabolitos secundarios de *Pseudomonas fluorescens* con actividad antibacteriana
5. Determinar la concentración mínima inhibitoria de los metabolitos obtenidos a partir de *Pseudomonas fluorescens* aisladas de suelos de Fresnillo, Zacatecas

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 Aislamiento e Identificación primaria de *Pseudomonas* aisladas de suelos en Fresnillo, Zacatecas

#### 6.1.1 Toma de muestras

Las muestras de suelo fueron recolectadas durante el periodo de agosto del 2013 a agosto del 2014 en las diferentes localidades y áreas del municipio de Fresnillo, Zacatecas (Latitud: 23.1719, Longitud: -102.861 23°10' 19" Norte, 102° 51' 41" Oeste). Cada toma se realizó por triplicado y se almacenó en bolsas de plástico estériles para su posterior cultivo.

#### 6.1.2 Medio de cultivo para Aislamiento Primario de *Pseudomonas*

El aislamiento primario de *Pseudomonas* se realizó en agar King's B (Peptona 20g/L; MgSO<sub>4</sub> 1.5 g/L; KHPO<sub>4</sub> 1.5 g/L; Glicerol 10 ml/L; Agar Bacteriológico 15 g/L) el cual es selectivo para especies de *Pseudomonas* presentes en suelo adicionado con ciclohexamida (100 µg/ L); Nistatina (100 µg/ L); Penicilina G (75

U/ L) y Cloranfenicol (50 µg/ L) para inhibir el crecimiento hongos u otros microorganismos presentes en la muestra.

### 6.1.3 *Cultivo e identificación macroscópica de aislados de Pseudomonas*

Para el cultivo de *Pseudomonas* se siguió el protocolo descrito por Li *et al.* (2013) con algunas modificaciones: Se pesó 1 g de suelo y se mezcló con 9 ml de solución salina estéril al 0.5 %, posteriormente se colocó 1 ml de la muestra en placas de plástico estéril con agar King's B suplementado con antibiótico y se distribuyó la muestra con perlas de vidrio previamente estériles, una vez realizado el inóculo, se incubaron a 27° C por 48 horas.

Después del tiempo de incubación se realizó una Tinción Gram a las colonias presuntivas de *Pseudomonas*, y aquellas que se observaron como bacilos Gram negativos se seleccionaron para realizar el cultivo axénico.

### 6.1.4 *Cultivo axénico y almacenamiento de aislados de Pseudomonas.*

Para realizar el cultivo axénico, las colonias de bacilos Gram negativos se sembraron por estría cruzada en agar King's B adicionado con Nistatina y Penicilina G y se incubaron a 27° C durante 48 horas. Posterior a la incubación se tomó una asada del cultivo axénico, se sembró en Caldo King's B y se incubó por un tiempo de 24 horas a 27° C.

Para generar el cepario de los aislados se colocaron en un criovial de 1.5 ml, 800  $\mu$ L de caldo King's B previamente inoculado y 200  $\mu$ L de glicerol estéril, se mezcló ligeramente y se almacenó a  $-20^{\circ}$  C hasta su uso.

## **6.2 Evaluación de actividad antibacteriana de filtrados bacterianos producidos por *Pseudomonas* aisladas de suelos de Fresnillo, Zacatecas.**

### *6.2.1 Cepas usadas*

En éste trabajo se emplearon las cepas de *E. coli* JM103, *Erwinia* spp, *Clavibacter*, *Agrobacterium*, *P. syringae* srv61, *P. syringae* pv. glycine y *P. syringae* pv. DC3000 proporcionadas por la Dra. Susana de la Torre Zavala del Centro de Innovación Biotecnológica del Insitituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Los cultivos de *P. syringae* srv61, *P. syringae* pv. glycine, *P. syringae* pv. DC3000 y *P. tabaci* se mantuvieron en congelación a  $-20^{\circ}$  C en caldo King's B adicionado con glicerol al 20% (v/v) como crioprotector.

Los cultivos de *E. coli* JM103, *Erwinia* sp, *Clavibacter* y *Agrobacterium* se mantuvieron en congelación a  $-20^{\circ}$  C en caldo LB adicionado con glicerol al 20% (v/v) como crioprotector.



6.2.2 *Condiciones de activación de P. syringae srv61, P. syringae pv. glycine, P. syringae pv. DC3000 y P. tabaci*

Para la activación de las cepas, se tomó una asada del medio de reserva y se sembró por estría cruzada en placas de agar King's B. Las placas se incubaron a 27° C por 24-48 horas en condiciones aeróbicas. Posteriormente se sembró una asada del cultivo anterior a tubos con agar King's B en pico de flauta y se incubó a 27° C por 24-48 horas en condiciones aeróbicas y finalmente se mantuvieron a 4° C y se resembraron cada 3 meses.

6.2.3 *Condiciones de activación de E. coli JM103, Erwinia spp. y Agrobacterium*

Para la activación de las cepas, se tomó una asada del medio de reserva y se sembró por estría cruzada en placas de LB. Las placas se incubaron a 27° C por 24-48 horas en condiciones aeróbicas. Posteriormente se pasó una asada del cultivo anterior a tubos con agar LB en pico de flauta y se incubó a 27° C por 24-48 horas en condiciones aeróbicas, finalmente se mantuvieron a 4° C y se resiembran cada 3 meses.

#### 6.2.4 *Producción de metabolitos secundarios de Pseudomonas* aisladas de Suelos de Fresnillo, Zacatecas

Para reactivar los aislados de *Pseudomonas*, se tomó una asada del cultivo mantenido en agar King's B en pico de flauta, y se colocó en un matraz Erlenmeyer (Kimax) de 250 ml que contenía 100 ml de caldo King's B, se incubó en agitación de 120 rpm a 27° C por 24 horas (Shaker Thermo Scientific MaxQ 8000).

Se tomaron 100 µL del cultivo anterior y se inocularon en 100 ml de Medio Mínimo de Sales (MMS) y se siguió la metodología descrita por Trippe *et al*, la cual consistió en Incubar el medio MMS previamente inoculado, en condiciones de agitación a 200 rpm a 27° C por 7 días, después el medio se colocó en tubos Falcon estériles de 50 ml y se centrifugó a 3000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante se pasó a través de un filtro (Corning Sterile Syringe Filter, poro de 0.20µM, Corning Incorporated), se colocó en tubos Falcon estériles y se almacenó a 4° C hasta su uso.

#### 6.2.5 *Determinación de actividad antimicrobiana*

El ensayo de actividad antimicrobiana se realizó de acuerdo al protocolo descrito por García *et al.*, (2005) con algunas modificaciones.

Se preparó un inóculo previamente ajustado a 10<sup>8</sup> UFC/ml de las cepas de *E. coli* JM103, *Erwinia spp.*, *Clavibacter* y *Agrobacterium*, *P. syringae* srv61, *P. syringae*

*pv. glycine*, *P. syringae pv. DC3000* y *P. tabaci* y se realizó el método de difusión en placa, en el cual se agregaron 250 µl de la cepa y 25 ml de Agar Mínimo de Sales y se mantuvo a una temperatura de 45-52° C, posteriormente se realizaron pozos en el agar con ayuda de un tubo Durham estéril invertido (5 mm de diámetro) y a cada pozo se les agregó 150 µl de los sobrenadantes obtenidos. Como control negativo se utilizó caldo mínimo de sales (MMS) y como control positivo carbenicilina y estreptomycin (50 µg/ ml). El sistema fue incubado a 27° C por 48 h en condiciones aerobias. Finalmente se observó el efecto del sobrenadante sobre la cepa mediante la presencia o ausencia de un halo de inhibición y en los casos positivos, se midió el halo. Este ensayo se realizó tres veces con su duplicado.

### **6.3 Identificación molecular de las cepas de *Pseudomonas* con actividad antibacteriana.**

Para la identificación molecular de las diferentes cepas con actividad antibacteriana se extrajo ADN y se siguió el protocolo descrito por Chen y Kuo (1993) para el cual se centrifugó 1.5 ml de medio mínimo de sales M9 previamente inoculado por 3 minutos a 12000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se agregaron 200 µL de Buffer de lisis (Tris-Acetato 40 mM, pH 7.8; acetato de sodio 20 mM, EDTA 1mM y SDS al 1 %). Posteriormente se removieron las proteínas y el lisado celular y se agregó 66 µL de NaCl 5M, se mezcló y se centrifugó a 12000 rpm por 15 min a 4°C (la centrifuga soporta a 10° C). Se pasó el sobrenadante a otro tubo, se agregó fenol-cloroformo en proporción 1:1 y se mezcló ligeramente hasta obtener una solución con apariencia lechosa. Se centrifugó a 12000 rpm por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro

tubo. Al sobrenadante se le agregó en proporción 1:1 cloroformo y se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos. Se precipitó el ADN con etanol absoluto en proporción 1:1 y se almacenó a -20° C por 15 minutos, pasado el tiempo se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos, se retiró el etanol absoluto y se lavó con etanol al 70 %. Después se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos y se retiró el etanol. (Se lavó dos veces con etanol al 70 % y se mantuvo en hielo. Posteriormente se dejó evaporar el etanol y se resuspendió el ADN en 50 µL de buffer Tris-EDTA (TE) y se almacenó a -20° C. Se revisó la eficiencia de la extracción mediante la preparación de un gel de agarosa al 1.5%.

#### **6.4 Optimización de medios de cultivo para la obtención de metabolitos secundarios de *Pseudomonas* aisladas de Suelo de Fresnillo Zacatecas.**

##### *6.4.1 Optimización de medios de cultivo para la generación de metabolitos secundarios de *Pseudomonas*.*

Con base en los reportes acerca de la generación de metabolitos, en la que se determina que las fuentes de carbono y nitrógeno influyen en el metabolismo de *Pseudomonas* para la producción de los mismos, se diseñaron 7 medios de cultivo con el propósito de evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo en la producción de metabolitos bioactivos.

Los medios de cultivo se prepararon de la siguiente manera:

- a) **Medio 1:** 0.2 g/L de KCl, 1 g/L de KNO<sub>3</sub>, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 g/L de peptona, 20 ml/L de glicerol al 20 % y 2 ml/L de MgSO<sub>4</sub> 1M (estéril).
- b) **Medio 2:** 0.2 g/L de KCl, 1 g/L de KNO<sub>3</sub>, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 g/L de peptona, 20 ml/L de Manitol al 20 % (estéril) y 2 ml/L de MgSO<sub>4</sub> 1M (estéril).
- c) **Medio 3:** 20 ml/L de casaminoácidos al 10% (estéril), 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 1M (estéril), 20 ml/L de glicerol al 20% (estéril), 2 ml/L de MgSO<sub>4</sub> 1M (estéril) y 957.9 ml/ L de Sales M9 (estéril)
- d) **Medio 4:** 20 ml/L de casaminoácidos al 10% (estéril), 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 1M (estéril), 20 ml/L de Manitol al 10% (estéril), 2 ml/L de MgSO<sub>4</sub> 1M (estéril) y 957.9 ml/ L de Sales M9 (estéril).
- e) **Medio 5:** 0.2 g/L de KCl, 1 g/L de KNO<sub>3</sub>, 1 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 g/L peptona, 20 ml/L de glucosa al 20 % (estéril) y 2 ml/L de MgSO<sub>4</sub> 1M (estéril).
- f) **Medio 6:** 20 ml/L de casaminoácidos al 10% (estéril), 100 µL de CaCl<sub>2</sub> 1M (estéril), 20 ml/L de glucosa al 20% (estéril), 2 ml/L de MgSO<sub>4</sub> 1M (estéril) y 957.9 ml/ L de Sales M9 (estéril)
- g) **Medio 7 (Medio Mínimo M9):** 700 ml de agua destilada estéril, 200 ml/L de sales de medio mínimo M9 estéril (MP®), 2 ml/L de MgSO<sub>4</sub> 1M (estéril), 20 ml/L de glucosa al 20% (estéril), 100 µL/L de CaCl<sub>2</sub>, 1M (estéril) y se ajusta a 1 L con agua destilada estéril.

El pH de los medios se ajustó a 7 y posteriormente se colocaron 50 ml de cada medio en un matraz Erlenmeyer (Kimax) de 250 ml y se agregó un precultivo de *Pseudomonas* al 1% (v/v) ajustada al 0.5 de McFarland con ayuda de un espectrofotómetro (Synergy 2 Multi-Mode Microplate reader, Biotek) a una DO de 620 nm y se incubó a 27° C por 7 días en agitación a 200 rpm en un Shaker (Thermo Scientific Max Q8000). Se tomaron alícuotas de 500 µL en los días 1, 3, 5 y 7 y se centrifugaron a 3000 g por 5 minutos, se filtró el sobrenadante (Corning Sterile Syringe Filter, poro de 0.20µM, Corning Incorporated), y se realizaron ensayos de actividad antibacteriana por el método del pozo descrito anteriormente y se analizaron los resultados mediante la medición de los halos de inhibición. Éste ensayo se realizó por duplicado con 2 repeticiones.

#### 6.4.2 *Producción, extracción y purificación de metabolitos secundarios a partir de cultivos de Pseudomonas*

Se preparó un precultivo de *Pseudomonas* en caldo King's B como se describió anteriormente y se inoculó el 1% (v/v) en 200 ml del medio 1 al 7, se incubaron en agitación a 200 rpm (Thermo Scientific Max Q8000) a 27° C por 7 días. Se tomó una alícuota del medio en fase logarítmica y fase estacionaria de crecimiento (DO 620 nm, Synergy 2 Multi-Mode Microplate reader, Biotek). La alícuota se centrifugó a 3500 rpm por 25 minutos y se filtró el sobrenadante (Corning Sterile Syringe Filter, poro de 0.20µM, Corning Incorporated), posteriormente se ajustó el filtrado a un pH 2 (Jousset *et al.*, 2006), se le agregó Acetato de Etilo en

proporción 2:1, se dejó en agitación a 120 rpm (Thermo Scientific Max Q8000) toda la noche. Después se incubó a -20° C (Garbeva *et al.*, 2011) y se separó la fracción de acetato de etilo en rotavapor (BM500, Yamato) a 225 hPa a 35-40° C. El extracto obtenido se resuspendió en una solución de DMSO al 3% y se almacenó a -20° C hasta su posterior uso.

### **6.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de metabolitos secundarios generados por *Pseudomonas* aislados de suelos de Fresnillo, Zacatecas.**

La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos de los aislados de *P. fluorescens* se determinó por el método de microdilución en placa. Esta técnica consiste en colocar en cada pozo 150 µL de caldo LB al doble de concentración (2X) para las cepas de *E. coli* JM103, *Erwinia*, *Agrobacterium* y *Clavibacter*, y caldo King's B para *P. syringae* *srv61*, *P. syringae* *pv. glycine*, *P. syringae* *pv. DC3000* y posteriormente se agregaron 150 µL del extracto concentrado de metabolitos secundarios diluidos anteriormente con DMSO al 3% y se realizaron diluciones seriadas.

Posteriormente se inoculó la cepa problema al 1% (v/v) previamente ajustada a cada pocillo y se incubó la microplaca a una temperatura de 28° C por un tiempo de 24 a 48 h. Después del tiempo de incubación, se leyó la microplaca a 620 nm (Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT) y se determinó la concentración mínima inhibitoria de los extractos previamente concentrados.

## **7. RESULTADOS**

### **7.1 Aislamiento e Identificación primaria de *Pseudomonas* aisladas de suelos mineros en Fresnillo, Zacatecas**

La toma de las muestras se realizó en el periodo de agosto del 2013 a agosto del 2014 de forma aleatoria en diferentes puntos representativos de la ciudad de Fresnillo, Zacatecas. Los puntos de muestreo corresponden al Parque Ecológico “Los Jales”, Recorrido de Minera Fresnillo, Presa de Rivera, y comunidades aledañas como Río Florido, El Pardillo, Estación San José, y Plateros.

Como resultado se colectó un total de 120 muestras de suelo y se generó un cepario con los diferentes aislados obtenidos. Para hacer el cepario se seleccionaron las colonias con características macroscópicas de *Pseudomonas* en medio de cultivo King’s B las cuales fueron colonias blancas con pigmentación verde en el medio, y en algunos casos el crecimiento tipo swarming. Posteriormente se realizó la identificación macroscópica mediante la presencia de pigmentación (Fig. 8), fluorescencia en el medio (Fig. 9), microscópica mediante la tinción Gram (Fig. 10) y catalasa positiva (Fig. 11).

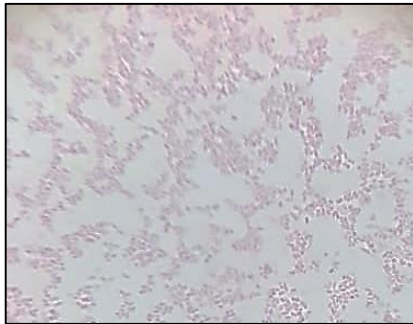




**Fig. 8** Aislados de colonias presuntivas de *Pseudomonas fluorescens* crecidos en agar King B e incubado de 18 a 24 h a 28° C



**Fig. 9** Fluorescencia características de cepas de *Pseudomonas fluorescens* crecida en caldo KB observada a 260 nm.



**Fig. 10** Tinción Gram de cepas de *P. fluorescens* crecidos en agar King B

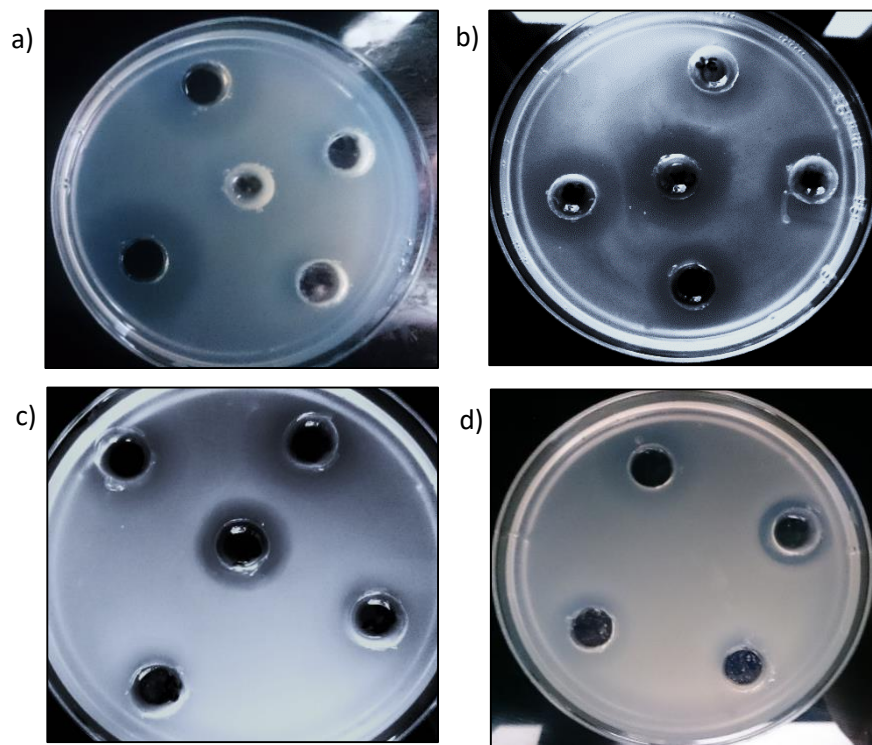


**Fig. 11** Prueba de la catalasa para aislados de *Pseudomonas fluorescens* crecidos en Agar King.

Se descartaron las colonias cuyo Gram fuera diferente a bacilos gram negativos y respuesta a catalasa negativa. Al final se obtuvo un cepario con 88 aislados presuntivos de *Pseudomonas* los cuales se mantuvieron a 4° C hasta su uso.

## 7.2 Determinación de actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios producidos por *Pseudomonas* aisladas de suelos de Fresnillo, Zacatecas.

Se evaluó la actividad antibacteriana de 88 filtrados de cultivo de *Pseudomonas* contra *E. coli* JM103, *Erwinia* sp, *Clavibacter*, *Agrobacterium*, *P. syringae* srv61, *P. syringae* pv. *Glycine* y *P. syringae* pv. DC3000 por la técnica del pozo descrita anteriormente y se determinó que 13 de los filtrados tuvieron mayor actividad antibacteriana contra la mayoría de los microorganismos de prueba con halos superiores a 0.5 cm (Fig. 12)



**Fig. 12** Halos de Inhibición producidos por filtrados de *Pseudomonas* contra fitopatógenos de interés. a) *P. fluorescens* sr61. b) *P. fluorescens* patovar tomato DC3000, c) *Erwinia* sp., d) *P. fluorescens* pv. *Glycinea* en medio MM9 incubadas por 24 h a 28° C.

En la tabla 2 se puede observar que el extracto MR-IB66 tuvo actividad antibacteriana contra 6 de los 7 microorganismos de prueba, se observó que la única cepa resistente a éste extracto fue *P. syringae* pv *tomato* DC3000. Por otro lado *P. syringae* sr61 fue la cepa más susceptible con halos de inhibición de 0.74 cm, seguida de *E. coli* JM103, *Clavibacter* y *P. syringae* pv *glycinea* con halos inhibición de 0.46, 0.46 y 0.47 cm respectivamente, mientras que los halos de inhibición observados en *Clavibacter* y *Erwinia* sp. fueron de 0.36 y 0.20 cm respectivamente.

De igual manera en la tabla 2, se puede observar que los halos de inhibición presentes en *Pseudomonas syringae* pv *glycinea* generados por el filtrado bacteriano MR-IB66 y el del control son muy similares (0.48 cm) lo cual indica que el compuesto presente en éste filtrado es igual de eficaz que el usado comercialmente (estreptomicina).

Aunado a los resultados anteriores, se observó en otro estudio realizado en el laboratorio, que el extracto 66 también presentó actividad antibacteriana contra microorganismos patógenos como *Salmonella* ATCC 19430, *E. coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* PA01.

Por lo que se seleccionó el extracto 66 para realizar el ensayo de optimización del proceso de generación de metabolitos con el objetivo de incrementar la actividad antibacteriana.

Halos de Inhibición (cm) de extractos de <i>Pseudomonas</i>																
Organismo	MR-IB3		MR-IB14		MR-IB16		MR-IB22		MR-IB23		MR-IB29		MR-IB35		MR-IB36	
<i>P. syr sr61</i>	0.80	±0.23	0.64	±0.39	0.52	±0.13	0.52	±0.08	0.94	±0.134	0.80	±0.20	0.72	±0.17	0.84	±0.08
<i>P. syr DC3000</i>	0.64	±0.07	0.62	±0.34	0.60	±0.37	0.62	±0.00	0.74	±0.18	0.82	±0.14	0.60	±0.07	0.60	±0.00
<i>P. syr pv.glycine</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli JM103</i>	0.48	±0.17	0.60	±0.12	0.44	±0.27	0.56	-	0.56	±0.054	0.56	±0.05	0.40	±0.10	-	-
<i>Erwinia spp.</i>	-	-	-	-	0.42	±0.11	0.40	±0.10	-	-	0.42	±0.08	0.42	±0.10	0.40	±0.10
<i>Agrobacterium</i>	0.44	±0.05	-	-	-	-	0.42	±0.00	0.66	±0.26	0.58	±0.08	0.58	±0.13	0.50	±0.00
<i>Clavibacter</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Continuación

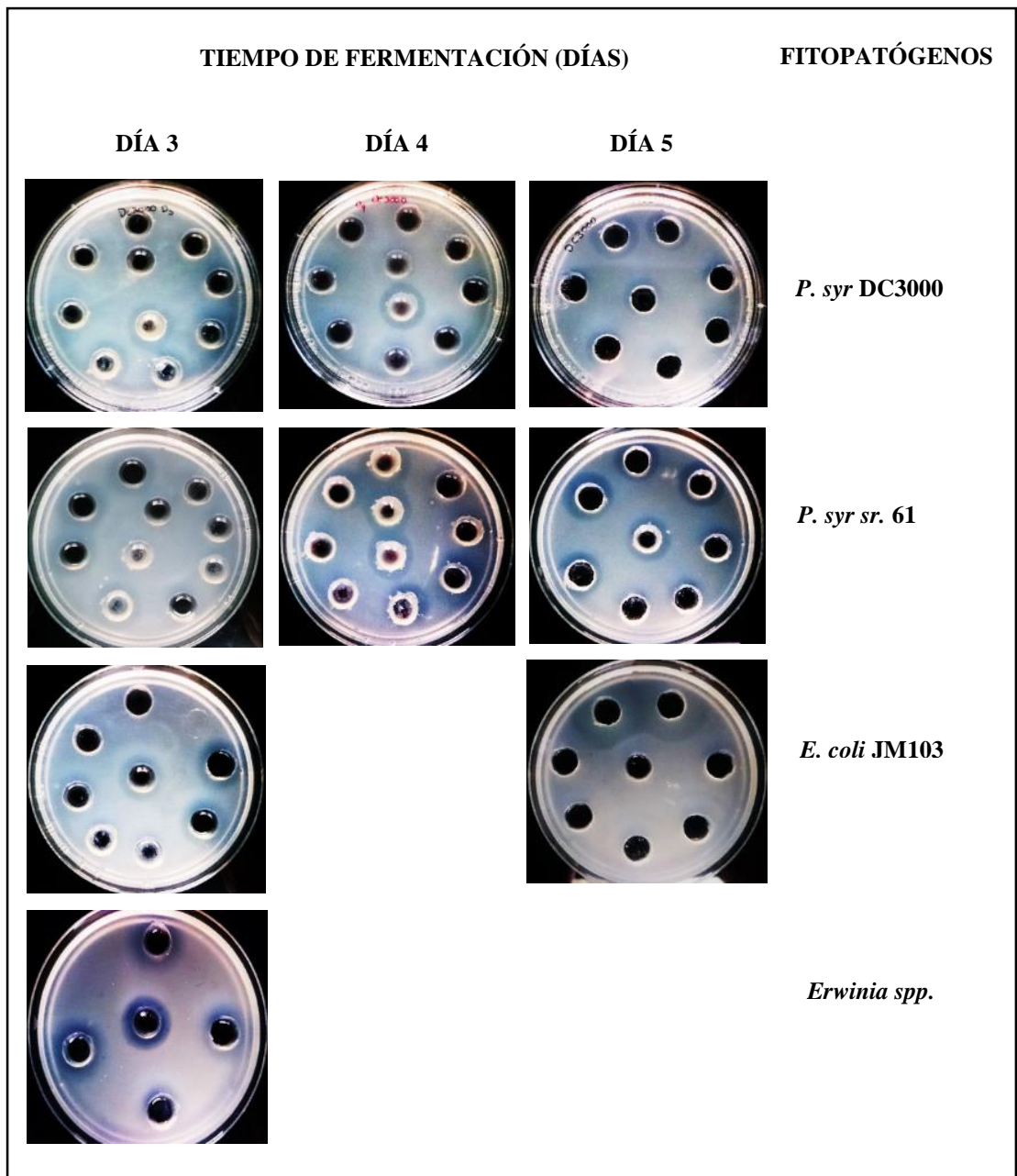
Organismo	MR-IB43		MR-IB66		MR-IB67		MR-IB68		MR-IB73		Control	
<i>P. syr sr61</i>	0.60	±0.07	0.74	±0.16	0.52	±0.04	0.78	±0.13	0.76	±0.19	0.62	±0.08
<i>P. syr DC3000</i>	0.48	±0.27	-	-	0.54	±0.05	0.66	±0.15	0.70	±0.18	1.00	±0.07
<i>P. syr pv.glycinea</i>	-	-	0.47	±0.05	-	-	-	-	-	-	0.48	±0.04
<i>E. coli JM103</i>	0.50	±0.07	0.46	±0.08	0.44	±0.89	0.46	±0.26	0.48	±0.08	1.06	±0.08
<i>Erwinia spp.</i>	0.48	±0.04	0.28	±0.08	0.44	±0.55	-	-	-	-	0.46	±0.05
<i>Agrobacterium</i>	0.58	±0.04	0.36	±0.23	0.50	±0.10	0.58	±0.04	0.56	±0.11	1.00	±0.00
<i>Clavibacter</i>	-	-	0.46	±0.05	-	-	-	-	-	-	1.06	±0.08

Tabla 2. Halos de inhibición de Extractos bacterianos generados en medio mínimo de sales con 20% de glucosa a 27°C por 7 días. Se realizó la prueba del pozo en medio M9 con 100 µL de Fitopatógeno ajustado a 0.5 de McFarland y se incubó por 24 horas a 27°C. Los ensayos se realizaron por duplicado con 3 repeticiones y se realizó ANOVA para comparación de las medias (p<0.05)

### **7.3 Optimización de medios de cultivo para la generación de metabolitos secundarios de *Pseudomonas*.**

Se prepararon seis medios de cultivo con diferente formulación, el medio 1, 2 y 5 tienen como fuente de carbono glicerol al 20%, manitol al 10 % y glucosa al 20% respectivamente. Los medios 3, 4 y 6 se prepararon con la formulación del medio mínimo de sales (MMS) suplementado con casaminoácidos y se evaluó la actividad antimicrobiana de cada uno de los filtrados bacterianos obtenidos de los diferentes medios de cultivo durante 7 días de fermentación.

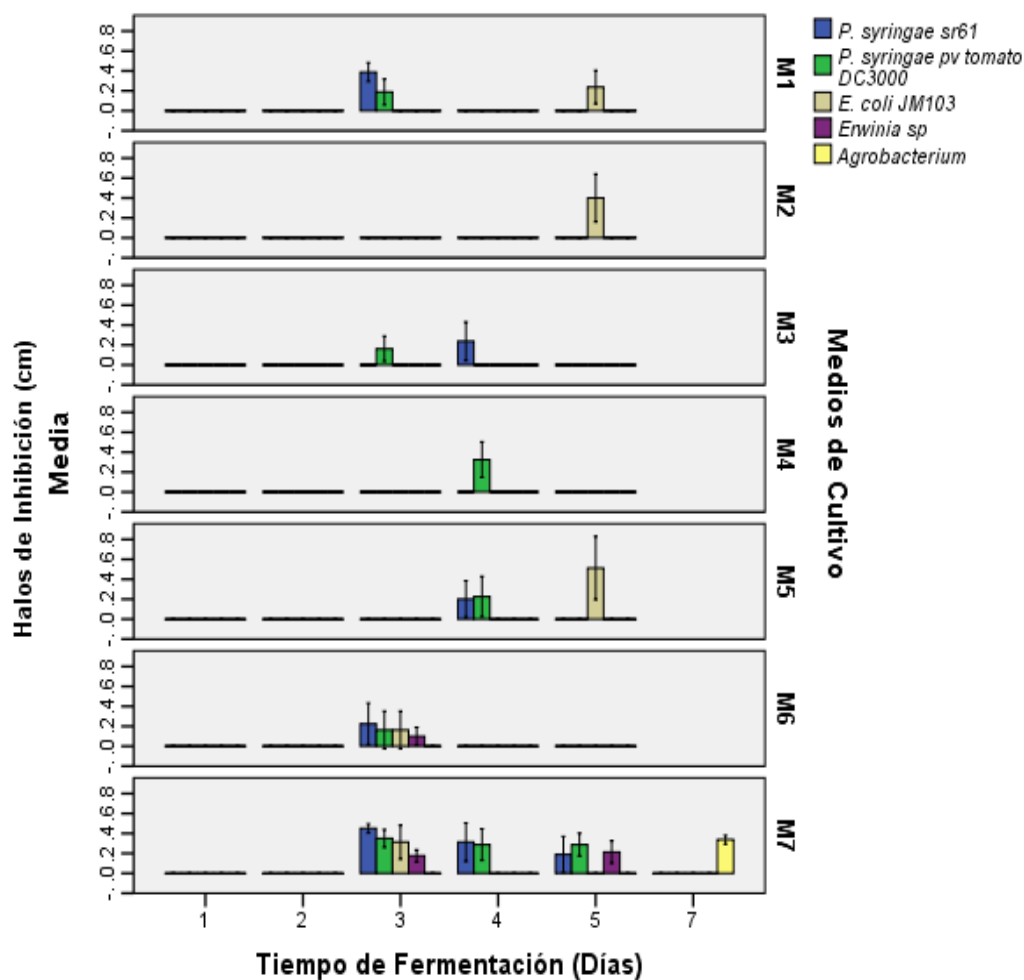
Durante los 7 días de fermentación se realizaron ensayos de actividad antibacteriana y se determinó que los metabolitos secundarios presentes en los filtrados bacterianos obtenidos a diferentes tiempos de la curva de crecimiento muestran cierta afinidad por cada uno de los fitopatógenos analizados (Fig. 13) lo que sugiere que en cada etapa del proceso metabólico del crecimiento de *Pseudomonas* MR-IB66 se generan compuestos selectivos para éstos fitopatógenos.



**Fig. 13** Halos de inhibición de filtrados bacterianos obtenidos a diferentes tiempos de la curva de crecimiento del aislado MR-IB66 en 7 medios de cultivo diferentes. Cada 24 horas se tomaron alícuotas de 2 ml de cultivo, se centrifugaron a 12000 rpm por 5 minutos, se filtró el sobrenadante y se realizó la prueba del pozo en medio M9 y se incubaron por 48 h a 27° C. Cada ensayo se realizó por triplicado.

En la figura 14, se puede observar que la actividad antimicrobiana de cada uno de los medios de cultivo aparece a partir del tercer día de fermentación, los metabolitos generados en el medio 1 (glicerol al 20%) tuvieron actividad antibacteriana contra *P. syr sr61* y *P. syr pv tomato DC3000* con halos de inhibición de 0.38 y 0.18 cm respectivamente y se perdió actividad contra estos dos microorganismos el día 4 y tuvo actividad antimicrobiana contra *E. coli JM103* con halos de inhibición de 0.23 cm. Mientras que los metabolitos generados en el medio 2 (manitol al 10%) presentó actividad antibacteriana contra *E. coli JM103* hasta el quinto día de fermentación con halos de inhibición de 0.4 cm (tabla 3). En el caso de los metabolitos presentes en el medio 5 (glucosa al 20%) se observó que tuvo actividad antibacteriana contra *P. syr sr61* y *P. syr pv tomato DC3000* al cuarto día de fermentación con halos de 0.2 y 0.3 cm respectivamente, ésta actividad desapareció para el quinto día de fermentación y mostró actividad contra *E. coli JM103* con un halo de inhibición de 0.5 cm (tabla 3).

### Actividad Antibacteriana del Filtrado de *Pseudomonas* MR-IB66 Obtenido en Diferentes Medios de Cultivo



Barras de error: 95% CI

Figura 14. Actividad antibacteriana de extracto bacteriano generado por MR-IB66 durante 7 días de fermentación con diferentes medios de cultivo. El ensayo se realizó por triplicado con dos repeticiones.

Como se observa en la figura 13 los medios 3 (glicerol al 20% + casaminoácidos) y 4 (manitol al 10% + casaminoácidos) mostraron poca actividad antibacteriana ya que sólo



*P. syriacus* sr 61 y *P. syriacus* pv *tomato* DC3000 fueron susceptibles al tercer y cuarto día de fermentación. Mientras que el medio 6 (glucosa al 20% +casaminoácidos) presentó actividad antibacteriana contra 4 de las 5 cepas problema al tercer día de fermentación. Para el cuarto y quinto día ya no se observó inhibición por parte de los metabolitos secundarios presentes en el filtrado bacteriano.

Se observó también que en el medio 7 al día 7 de fermentación, se generaron metabolitos con actividad antibacteriana contra *Agrobacterium* siendo la única etapa en la cual éste microorganismo fue susceptible a los metabolitos presentes en ese medio (Figura 14).

Como se puede observar, los halos de inhibición generados por los metabolitos secundarios presentes en el filtrado bacteriano generados en el medio 7 (MM9) tuvieron mayor actividad antibacteriana a partir del tercer día, y dicha actividad se perdió al cuarto día ya que no se observó la presencia de halos de inhibición para *Erwinia* sp. y *E. coli* JM103. Sin embargo, al determinar la actividad antibacteriana de los metabolitos presentes en el filtrado generado por el medio 7 en el quinto día de fermentación se volvió a generar un halo de inhibición de *Erwinia* sp. Al quinto día de fermentación (tabla 3).

**Tabla 3:** Actividad antibacteriana de metabolitos secundarios presentes en filtrados bacterianos de *Pseudomonas* MR-IB66 generados en diferentes medios de cultivo contra microorganismos fitopatógenos de interés. Los ensayos se realizaron por duplicado con tres repeticiones

<i>Medio de Cultivo</i>	Tiempo de fermentación (días)	<i>P. syr sr61</i>	<i>P. syr. pv tomato DC3000</i>	<i>E. coli JM103</i>	<i>Erwinia sp.</i>	<i>Agrobacterium</i>
<b>1</b>	3	0.38 ±0.11	0.18±0.15	0	0	0
	5	0	0	0.23±0.19	0	0
<b>2</b>	5	0	0	0.4±0.28	0	0
<b>3</b>	3	0	0.16±0.15	0	0	0
	4	0	0.32±0.21	0	0	0
<b>4</b>	4	0	0.32±0.21	0	0	0
<b>5</b>	4	0.2±0.22	0.32±0.21	0	0	0
	5	0	0	0.51±0.37	0	0
<b>6</b>	3	0.22±0.25	0.16±0.26	0.16±0.26	0.1±0.11	0
<b>7</b>	3	0.45±0.05	0.35±0.11	0.31±0.2	0.17±0.07	0
	4	0.31±0.22	0.28±0.18	0	0	0
	5	0.18±0.21	0.28±0.13	0	0.21±0.13	0
	7	0	0	0	0	0.33±0.05

#### **7.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos de metabolitos secundarios generados por *Pseudomonas*.**

De acuerdo a los resultados anteriores se definió que los metabolitos secundarios presentes en los filtrados bacterianos obtenidos de los medios de cultivo 1, 5 y 7 tuvieron mayor actividad antibacteriana contra al menos tres de las bacterias probadas por lo que el siguiente paso fue generar filtrados bacterianos en dos etapas de la curva de crecimiento (Fase Log y Fase estacionaria) y se prepararon extractos crudos a los cuales se les determinó la CMI.

Se observó que la actividad antibacteriana de los metabolitos secundarios presentes en el extracto crudo obtenido a partir del filtrado bacteriano generado en el medio 7 se presenta en la fase estacionaria y tienen una CMI que oscila entre los 2 mg/ml a los 4 mg/ml, mientras que los metabolitos presentes en el extracto crudo generado en el medio 1 varía de 2.5 mg/ml a 9 mg/ml y los metabolitos secundarios presentes en extracto crudo obtenido a partir del filtrado bacteriano del medio 5 es de 1.5 mg/ml a 8.5 mg/ml.

**Tabla 4.** Concentración Mínima Inhibitoria del extracto concentrado de MR-IB66 obtenido en 3 medios a diferentes etapas de la curva de crecimiento. Los ensayos se realizaron por triplicado con 2 repeticiones y se realizó la comparación de medias mediante ANOVA con un valor de significancia  $p < 0.05$

<b>CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LOS EXTRACTOS CRUDOS DE LOS CULTIVOS DE <i>P. fluorescens</i> aislados de suelos mineros. (mg/ml)</b>									
	<b>M1 Est.</b>			<b>MEDIO 5 Est.</b>			<b>MEDIO 7 Est.</b>		
<b>CEPA</b>	<b>CMI</b>	<b>DS</b>	<b>Sig.</b>	<b>CMI</b>	<b>DS</b>	<b>Sig.</b>	<b>CMI</b>	<b>DS</b>	<b>Sig.</b>
<b><i>E. coli JM103</i></b>	4	± 0.03	0.00	3	± 0.01	0.00	<b>2</b>	± 0.01	0.00
<b><i>Erwinia</i></b>	4	± 0.01	0.00	3	± 0.03	0.02	<b>2.5</b>	± 0.01	0.00
<b><i>Agrobacterium</i></b>	2.5	± 0.07	0.00	1.5	± 0.08	0.00	<b>2.5</b>	± 0.04	0.00
<b><i>P. syr. pv tomato DC3000</i></b>	9	± 0.02	0.00	7.5	± 0.02	0.00	<b>3.5</b>	± 0.01	0.00
<b><i>P. syr sr61</i></b>	8	± 0.01	0.00	8.5	± 0.01	0.00	<b>3.7</b>	± 0.04	0.01

Con lo anterior, se observó que la CMI generada por los metabolitos presentes en los extractos crudos obtenidos a partir de filtrados bacterianos generados en el medio 7 son mucho menores para *P. syr pv tomato DC3000* y para *P. syr sr61* con concentraciones de 3.5 mg/ml y 3.7 mg/ml en comparación con la concentración obtenida para los medios 1 y 5 ya que se requieren concentraciones mínimas de al menos 8 mg/ml. Lo que sugiere que los metabolitos presentes en el extracto crudo obtenido del filtrado bacteriano generado en el medio 7 son más efectivos contra las 5 cepas probadas.

## 8. DISCUSIÓN

Los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana son producidos por microorganismos que se encuentran en el suelo como un mecanismo de defensa (Raaijmakers y Mazzola, 2012). Uno de éstos microorganismos comprende el género de *Pseudomonas* los cuales son habitantes comunes en el suelo capaces de producir una gran variedad de metabolitos con actividad biológica (Haas y Defago, 2005). La mayoría de estos compuestos han sido aislados a partir de la investigación de extractos crudos con el objetivo de detectar nuevos candidatos con potencial farmacológico (Singh y Pelaez, 2008).

En el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de los metabolitos secundarios presentes en los extractos crudos de los diferentes filtrados bacterianos obtenidos por *Pseudomonas* habitantes de suelos en Fresnillo, las cuales mostraron actividad antibacteriana contra un panel bacterias fitopatógenas como *Pseudomonas syringae* sr61, *tomato* DC3000, *P. syringae* pv *glycine*, *Ewrinia* sp, *Agrobacterium* y *E. coli* JM103 lo que coincide con diversos estudios en los que se ha determinado la actividad antimicrobiana de metabolitos obtenidos a partir de filtrados de *Pseudomonas* (Trippe *et al.*, 2013; Michelsen) pues se sabe que muchas de las cepas de éste género son capaces de biosintetizar metabolitos como antibióticos, lipopéptidos, sideróforos o

cianuro de hidrógeno los cuales son utilizados para control biológico (Gross y Loper, 2009).

La regulación de la biosíntesis de los metabolitos antimicrobianos producidos por microorganismos del suelo ha sido ampliamente estudiada (Ramos JL, 2004). Factores ambientales como el pH, Temperatura, fuentes de carbono y nitrógeno, así como diversos predadores son capaces de modificar la biosíntesis de éstos metabolitos (Bender *et al*, 1999; Mukherjee y Das, 2005; Mazzola *et al*, 2009) por lo que es de gran importancia conocer si los procesos de obtención utilizados *in vitro* son capaces de incrementar o eliminar la acumulación de éstos en el medio.

Se ha determinado que el pH, la temperatura y las fuentes de carbono son capaces de modificar la producción de metabolitos con actividad antibacteriana de algunas cepas de *P. fluorescens* (Slininger y Shea-Wilbur, 1995) además de algunos otros compuestos como fósforo inorgánico (Pi) y fuentes Nitrógeno como la lisina o la valina (Siddiqui y Shaukat, 2004). Al probar los medios de cultivo utilizados en este trabajo con fuentes de carbono como glucosa, glicerol y manitol, se pudo observar que efectivamente la actividad antibacteriana de nuestro extracto se modifica no sólo para la selectividad de los metabolitos presentes, sino además se ve alterada la fase de expresión de los mismos durante la curva de crecimiento lo que nos indica que el estado nutricional del medio juega un papel importante en la biosíntesis de los metabolitos generados por el aislado MR-IB66.

En este caso los factores que influyen directamente sobre una mayor respuesta a las diferentes condiciones de fermentación fue la presencia de glucosa y casaminoácidos en un medio mínimo. Estos resultados son similares a los descritos por Duffy y Défago en los que se determinó que la glucosa y el glicerol solos o en combinación suplementados en un medio rico, incrementan la producción de antibióticos por *P. fluorescens* CHA0 después de dos días de incubación (Duffy y Défago, 1999). Por otra parte, se ha determinado que modificaciones en las fuentes de carbono influyen la acidificación del medio durante el crecimiento bacteriano (Dekleva y Strohl, 1987) que afecta de forma indirecta la producción de metabolitos secundarios, sin embargo, en este estudio no se observó algún cambio en el pH durante el proceso de fermentación.

En nuestros resultados se observó también que los metabolitos secundarios encontrados en el filtrado bacteriano de *Pseudomonas* MR-IB66 tienen un efecto antibacteriano contra otras especies de *Pseudomonas* como *syringae* pv tomato DC3000 y sr61. Éste resultado muy similar al reportado por Trippe y colaboradores en el 2013 en el cual reportan que los metabolitos presentes en el filtrado generado por *P. fluorescens* SBW25 es capaz de inhibir el crecimiento de *P. syringae* tomato DC3000 y *maculicola* M4 (Trippe *et al*, 2013) lo que sugiere un efecto antagónico específico contra estas cepas.

Por otro lado, además de la influencia de nutrientes en el medio de cultivo para la generación de metabolitos bioactivos, se ha reportado que la regulación de la producción de antibióticos está dada por dos factores de respuesta al estrés (RpoS y proteasa Lon) y

la fase estacionaria de crecimiento que influencia la producción de antibióticos como 2,4-diacetilfloroglucinol, pirrolnitrina y pioluteorina (Sarniguet *et al.*, 1995; Whistler *et al.*, 2000). Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que se observó que la actividad antibacteriana del filtrado bacteriano de MR-IB66 comenzó en la fase estacionaria en todos los medios, sin embargo, se observó también que dicha actividad modificaba su especificidad conforme pasaba el tiempo de fermentación, esto pudiera ser debido a dos factores, el primero es que el metabolito bioactivo presente se degrada, o el segundo, que éste metabolito modifica el metabolismo celular de MR-IB66 lo que cambia su especificidad. En un estudio realizado por Brodhagen y colaboradores (2004) observaron que las concentraciones de pioluteorina presentes en los extractos de los sobrenadantes disminuían conforme pasaba el tiempo de incubación y que además la presencia de éste por vía exógena reprime la producción de 2,4 diacetilfloroglucinol en *P. fluorescens* Pf-5 contribuyendo a la regulación de por lo menos dos rutas metabólicas dentro de la célula bacteriana (Brodhagen *et al.*, 2004), lo que confirma los resultados observados para otra cepa relacionada *P. fluorescens* CHA0 (Schnider-Keel *et al.*, 2000).

Por lo que para poder asegurar si el metabolismo de MR-IB66 se ve influenciado por los productos presentes en el filtrado bacteriano se debe identificar el compuesto activo durante el avance de la curva de crecimiento y determinar si es capaz de inducir o inhibir la producción de antibióticos en el medio. Sin embargo, no hay que dejar de lado que la mayoría de los extractos crudos están compuestos por múltiples metabolitos cuya actividad es el resultado de la sinergia entre dos o más metabolitos presentes, por lo que la purificación e investigación de los metabolitos individuales no reflejará la



bioactividad de aquellos que trabajan en sinergia con los demás compuestos (Michelsen *et al.*, 2015)

## 9. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se lograron aislar por lo menos 13 cepas identificadas como *Pseudomonas fluorescens* y que son capaces de generar metabolitos con actividad antibacteriana, sin embargo, el aislado MR-IB66 fue el que presentó actividad antibacteriana contra la mayoría de las cepas probadas.

Lo anterior representa un gran potencial biotecnológico debido a que el hábitat de donde fueron aislados no se había estudiado con anterioridad, lo que abre las puertas para continuar con el estudio de éste tipo de suelos y seguir con la búsqueda de microorganismos que sean capaces de generar metabolitos secundarios con aplicaciones biotecnológicas, sobretodo para su aplicación en campo.

El hecho de que el aislado MR-IB66 presentara diferente actividad biológica al someterlo a condiciones variantes de fermentación nos habla de la gran capacidad metabólica que tiene nuestro microorganismo y que por lo mismo fue capaz de mostrar actividad antibacteriana de forma selectiva hacia algunos de los fitopatógenos probados, sobretodo, contra diferentes patovares de *Pseudomonas syringae* lo que nos sugiere que éstos metabolitos pudieran ser generados como un mecanismo de defensa ante la

presencia de éstos microorganismos. Sin embargo, aún faltan estudios que nos permitan confirmar esta hipótesis.

## 10. PERSPECTIVAS

Identificar los compuestos bioactivos producidos por *Pseudomonas fluorescens MR-IB66*, detectar su abundancia en la cinética de crecimiento y determinar si éstos compuestos funcionan de manera sinérgica o si existe un solo compuesto activo responsable de ésta actividad.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

A. Halgren, M. Azevedo<sup>1</sup>, D. Mills<sup>2</sup>, D. Armstrong, M. Thimmaiah<sup>3</sup>, K. McPhail and G. Banowetz. 2011. Selective inhibition of *Erwinia amylovora* by the herbicidally active germination-arrest factor (GAF) produced by *Pseudomonas* bacteria *Journal of Applied Microbiology* 111, 949–959

A. Scaloni, M. Dalla Serra, P. Amodeo, L. Mannina, R.M. Vitale, A.L. Segre, O. Cruciani, F. Lodovichetti, M.L. Greco, A. Fiore, M. Gallo, C. D'Ambrosio, M. Coraiola, G. Menestrina, A. Graniti, V. Fogliano. 2004. Structure, conformation and biological activity of a novel lipodepsipeptide from *Pseudomonas corrugata*: cormycin A, *Biochem. J.* 384, 25–36.

Aagot, N., O. Nybroe, P. Nielsen, and K. Johnsen. 2001. An altered *Pseudomonas* diversity is recovered from soil by using nutrient-poor *Pseudomonas*-selective soil extract media. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5233–5239.

Alexandre Jousset, Enrique Lara, Luis G. Wall, and Claudio Valverde. 2006. Secondary Metabolites Help Biocontrol Strain *Pseudomonas fluorescens* CHA0 to Escape Protozoan Grazing. *Applied and Environmental Microbiology* p. 7083-7090.

Almeida LA, Araujo R. 2013. Highlights on molecular identification of closely related species. *Infect. Genet. Evol.* 13:67–75.

Amann, R. I., W. Ludwig, and K.-H. Schleifer. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59:143–169.

Anjaiah, V., Koedam, N., Nowak-Thompson, B., Loper, J.E., Hoffte, M., Tambong, J.T., Cornelis, P., 1998. Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn5 derivatives toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. *Mol. Plant Microbe Interact* 11, 847-854.

Anzai, Y., H. Kim, J.-Y. Park, H. Wakabayashi, and H. Oyaizu. 2000. Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:1563–1589.

J.-L. Ramos (ed.), *Pseudomonas*. Kluwer Academic/Plenum approaches, pp. 3–44.

Atlas Agroalimentario 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Primera Edición. Descargado de <https://www.gob.mx/siap/prensa/atlas-agroalimentario-2017>.

Audenaert, K., Pattery, T., Cornelis, P., Hoffte, M., 2002. Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 1147-1156.

Bailey, M. J. 2004. Life in the phyllosphere. *In: J. L. Ramos (Ed.) Pseudomonas*. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York, NY. 431–456.

Bender CL, Stone HE, Sims JJ, Cooksey DA. 1987. Reduced pathogen fitness of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* Tn5 insertions defective in coronatine production. *Physiol Mol Plant Pathol* 30: 273–283

Bennasar Antoni, Magdalena Mulet, Jorge Lalucat and Elena García-Valdes 2010. PseudoMLSA: a database for multigenic sequence analysis of *Pseudomonas* species. *BMC Microbiology.* 10:118.

Bertani I, Sevo M, Kojic M, Venturi V. 2003. Role of GacA, LasI, RhlI, ppk, PsrA, vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in *Pseudomonas*. *Archives of Microbiology* 180: 264–271.

Bertani, I., and V. Venturi. 2004. Regulation of the N-acyl homoserine lactone-dependent quorum-sensing system in rhizosphere *Pseudomonas putida* WCS358 and cross-talk with the stationary-phase RpoS sigma factor and the global regulator GacA. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:5493–5502

Bloemberg, G. V., Wijfjes, A. H. M., Lamers, G. E. M., Stuurman, N. & Lugtenberg, B. J. J. 2000. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**, 1170–1176.

Bonn, W.G.; van der Zwet, T. 2000. Distribution and economic importance of fire blight. In *Fire Blight: The Disease and Its Causative Agent, Erwinia Amylovora*; Vanneste, J.L., Ed.; CAB International: Wallingford, CT, USA; pp. 37–53.

Brianciotto, V., S. Minerdi, S. Perotto, and P. Bonfante. 1996. Cellular interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and rhizosphere bacteria. *Protoplasma* 193:123–131.

Brittan S. Scales, Robert P. Dickson, John J. LiPuma, Gary B. Huffnagle. 2014. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. Volume 27 Number 4 *Clinical Microbiology Reviews* p. 927–948

Brodhagen, M., Henkels, M.D. and Loper, J.E. (2004) Positive regulation and signaling properties of pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1758–1766.

C. Bassarello, S. Lazzaroni, G. Bifulco, P. Lo Cantore, N.S. Iacobellis, R. Riccio, L. Gomez-Paloma, A. Evidente. 2004. Tolaasins A-E five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*, J. Nat. Prod. 67, 811–816

C. Pieterse, S. Van Wees, E. Hoffland, J.A. Van Pelt, L.C. Van Loon. 1995. Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression, Plant Cell 8:1225–1237.

Carol L. Bender, Francisco Alarcón-Chaidez and Dennis C. Gross. 2004. *Pseudomonas syringae* Phytotoxins: Mode of Action, Regulation, and Biosynthesis by Peptide and Polyketide Synthetases. Microbiology and Molecular Biology Reviews, p. 266–292.

Charlotte F. Michelsen, Helle Jensen, Vincent J. Venditto, Rosanna C. Hennessy and Peter Stougaard. 2015. Bioactivities by a crude extract from the Greenlandic *Pseudomonas* sp. In5 involves the nonribosomal peptides, nunamycin and nunapeptin PeerJ, DOI 10.7717/peerj.14767 395.

Cheryl A. Whistler, Virginia O. Stockwell and Joyce Loper. 2000. Lon Protease influences antibiotic production and UV tolerance of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. App. And Env. Microbiol. Vol. 66. No. 7. p 2718-2725

Chin-A-Woeng, T.F.C., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J., 2003. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. New Phytol 137, 503-523.

Cunnac, S., Lindeberg, M. and Collmer, A. 2009 *Pseudomonas syringae* type III effectors: repertoires in search of functions. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 53–60.



Dasgupta, N., S. K. Arora, and R. Ramphal. 2000. FleN, a gene that regulates flagellar number in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 182:357–364.

Delany I, Sheehan MM, Fenton A, Bardin S, Aarons S, O’Gara F. 2000. Regulation of production of the antifungal metabolite 2,4-diacetylphloroglucinol in *Pseudomonas fluorescens* F113: genetic analysis of phlF as a transcriptional repressor. *Microbiology* 146:537-546.

Dietmar H. Pieper, Juan-Luis Ramos and Norberto J. Palleroni. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas* Prokaryotes 6:646–703

Duffy BK, Défago G. 1997. Zinc improves biocontrol of *Fusarium* Crown and root rot of tomato by *Pseudomonas fluorescens* and represses the production of pathogen metabolites inhibitory to bacterial antibiotic biosynthesis. *Phytopathology* 87:1250-1257.

Duffy, B.; Schärer, H.-J.; Bünter, M.; Klay, A.; Holliger, E. 2005. Regulatory measures against *Erwinia amylovora* in Switzerland. *EPPO Bull.* 35, 239–244.

Duffy, B.K and Défago, G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 2429-2438.

Dunleavy, J. M. 1988. Bacterial, fungal, and viral diseases affecting soybean leaves. P 40-46 in: *Soybean Diseases of the North Central Region*. T. D. Wyllie and D. H. Scott, eds. American Phytopathological Society, St. Paul, MN. E.-C. Oerke, H.W. Dehne. 2004. Safeguarding production losses in major crops and the role of crop protection, *Crop Prot.* 23 275–285.

Eduard R.B. Moore, Brian J. Tindall, Vitor A. P. Martins Dos Santos, Fravel, D.R., 2005. Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 337-359.

Fromin, N., W. Achouak, J. M. Thiéry, and T. Heulin. 2001. The genotypic diversity of *Pseudomonas brassicacearum* populations isolated from roots of *Arabidopsis thaliana*: Influence of plant genotype. *FEMS, Microbiology Ecology*, 37(1): 21-29

Fuchs, R. 2001. Siderotyping a powerful tool for the characterization of the pyoverdines. *Curr. Top. Med. Chem.* 1:31–57.

G.N. Agrios, 2005. *Plant Pathology*, 5th eds., Department of Plant Pathology. University of Florida, United States of America. p 922

G.V. Bloemberg, B.J. Lugtenberg. 2004. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria, *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:43–350.

García S, Alarcón G, Gómez M, Heredia N. 2005. Extracts of *Haematoxylon brasiletto* inhibit growth, verotoxin production, and adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *J Food Prot.* 68(7):1346-51.

Gould, W.D., Hagedorn, C., Bardinelli, T.R. and Zablutowicz, R.M. (1985) New selective media for enumeration and recovery of fluorescent pseudomonads from various habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 28-32

Green, S., Studholme, D.J., Laue, B.J., Dorati, F., Lovell, H., Arnold, D., Cottrell, J.E., Bridgett, S., Blaxter, M., Huitema, E., Thwaites, R., Sharp, P.M., Jackson, R.W. and Kamoun, S. 2010. Comparative genome analysis provides insights into the evolution and adaptation of *Pseudomonas syringae* pv. *aesculi* on *Aesculus hippocastanum*. *PLoS ONE*, 5-10224.

Griffith, C.S.; Sutton, T.B. 2003. Peterson, P.D. *Fire Blight: The Foundation of Phytobacteriology*; APS Press: St. Paul, MN, USA

Gross H, Loper JE. 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* 26:1408–1446.

Gross H, Stockwell VO, Henkels MD, Nowak-Thompson B, Loper JE & Gerwick WH (2007) The genomisotopic approach: *a systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters*. *Chem Biol* 14: 53–63.

Gross Harald and Loper E. Joyce. 2009 Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Nat. Prod. Rep.* 1408-1446.

Guillot, E. and Leclerc, H. 1993. Bacterial flora in natural mineral waters: characterization by ribosomal ribonucleic acid gene restriction patterns. *Systematica Applied Microbiology* 16, 483-493.

H. Hashizume, Y. Nishimura. 2008. Cyclic lipopeptide antibiotics, in: Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 35, Elsevier, Amsterdam, pp. 693–751.

Haas D, Defago G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:307–319.

Haas, D., and Keel, C. 2003. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease. *Annu Rev Phytopathol* 41: 117–153.

Hann, D.R., Gimenez-Ibanez, S. and Rathjen, J.P. 2010. Bacterial virulence effectors and their activities. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13, 388–393.

Hassan, K.A., Johnson, A., Shaffer, B.T., Ren, Q.H., Kidarsa, T.A., Elbourne, L.D.H., *et al.*, 2010. Inactivation of the GacA response regulator in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 has far-reaching transcriptomic consequences. *Environ Microbiol* **12**: 899–915.

Henge, K.C., Mabagala, R.B., Mortensen, C.N., Stephan, D. and Wydra, K. 2007. First report of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* in Tanzania. *Plant Dis.* 91, 462.

Hiltner, L. 1904. Über neuer Erfahrungen und Probleme aufdem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründung und Brache. *Arb. Dtsch. Landwirtsch. Ges. Berl.* 98:59–78.

Höfte, M., De Vos, P., 2006. Plant Pathogenic *Pseudomonas* Species. *In*: Gnanamanickam, S.S. (Ed.), *Plant-associated Bacteria*. Springer, The Netherlands, pp. 507-533.

Hugh, R., and G. L. Gilardi. 1980. *Pseudomonas*. *In*: E. H. Lennette, A. Balows, W. H. Hausler Jr., and J. P. Truant (Eds.) *Manual of Clinical Microbiology*, 3rd ed. ASM

I. Grgurina, M. Bensaci, G. Pocsfalvi, L. Mannina, O. Cruciani, A. Fiore, V. Fogliano, K.N. Sorensen, J.Y. Takemoto. 2005. Novel cyclic lipodepsipeptide from *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strain 508 and syringopeptin antimicrobial activities, *Antimicrob. Agents Chemotherap.* 49, 5037–5045.

J. Gerard, R. Lloyd, T. Barsby, P. Haden, M.T. Kelly, R.J. Andersen. 1997. Massetolides A-H, antimycobacterial cyclic depsipeptides produced by two *Pseudomonads* isolated from marine habitats, *J. Nat. Prod.* 60, 223–229.

J. Ingram. 2011. A food systems approach to researching food security and its interactions with global environmental change, *Food Secur.* 3:417–431

J.C. Sacchettini, E.J. Rubin, J.S. Freundlich. 2008. Drugs versus bugs: in pursuit of the persistent predator *Mycobacterium tuberculosis*, *Nature Rev. Microbiol.* 6, 41–52.

J.M. Raaijmakers, I. de Bruijn, O. Nybroe, M. Ongena. 2010. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics, *FEMS Microbiol. Rev.* 34.1037–1062.

Jun S-R, Wassenaar TM, Nookaew I, Hauser L, Wanchai V, Land M, Timm CM, Lu T-YS, Schadt CW, Doktycz MJ, Pelletier DA, Ussery DW. 2016. Diversity of *Pseudomonas* genomes, including *Populus*-associated isolates, as revealed by comparative genome analysis. *Appl Environ Microbiol* 82:375–383.

K. Mathee, G. Narasimhan, C. Valdes, X. Qiu, J. M. Matewish, M. Koehrsen, A. Rokas, C. N. Yandava, R. Engels, E. Zeng, R. Olavarietta, M. Doud, R. S. Smith, P. Montgomery, J. R. White, P. A. Godfrey, C. Kodira, B. Birren, J. E. Galagan and S. Lory, 2008 *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 3100–3105.

K.K. Pal, B.M. Gardener. 2006. Biological control of plant pathogens, *Plant Health Instr.* 2:1117–1142.

Kado, C, I. 2010. *Plant bacteriology*. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, U.S.A. 336 p.

Keel, C., Maurhofer, M., Oberhansli, Th., Voisard, C., Haas, D., and Défago, G. 1991. Role of 2,4-diacetylphloroglucinol in the suppression of take-all of wheat by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *In: Biotic Interactions and Soil-Borne*

Diseases. A. B. R. Beemster, G. j. Bollen, M. Gerlagh, M. A. Ruissen, B. Schippers, and A. Tempel, eds. Elsevier, Amsterdam. p. 335-338

Keel, C., Weller, D.M., Natsch, A., De´fago, G., Cook, R.J., Thomashow, L.S., 1996. Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 552-563.

Kenyon, J. S., and Turner, J. G. 1990. Physiological changes in *Nicotiana tabacum* leaves during development of chlorosis caused by coronatine. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37:463-477.

King EO, Ward MK, Raney DE. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* 44:301–307.

Kinscherf, T.G., and Willis, D.K. 1999. Swarming by *Pseudomonas syringae* B728a requires *gacS* (*lemA*) and *gacA* but not the acyl-homoserine lactone biosynthetic gene *ahll*. *J Bacteriol* **181**: 4133–4136.

Konstantinidis KT, Ramette A, Tiedje JM. 2006. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:7286

Kristin Trippe, Kerry McPhail, Donald Armstrong, Mark Azevedo and Gary Banowetz. 2013. *Pseudomonas fluorescens* SBW25 produces furanomycin, a non-proteinogenic amino acid with selective antimicrobial properties *BMC Microbiology*, 13:111

Lapsansky, E. R., Milroy, A. M., Andales, M. J., and Vivanco, J. M. 2016. Soil memory as a potential mechanism for encouraging sustainable plant health and productivity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 38, 137–142.

Laue BE, Jiang Y, Chhabra SR, Jacob S, Stewart GSAB, Hardman A, Downie JA, O’Gara F, Williams P. 2000. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the Rhizobium small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl) homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology*, 146:2469-2480.

Li L, Al-Soud WA, Bergmark L, Riber L, Hansen H.H, Magid J, Sorensen SJ. Investigating the diversity of *Pseudomonas* spp. In soil using culture dependent and independent techniques. *Curr. Microbiol* 2013.

Lin N-C, Martin GB 2005. An *avrPto/avrPtoB* Mutant of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato DC3000* Does Not Elicit Pto-Mediated Resistance and Is Less Virulent on Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18: 43–51.

Loper, J.e, Kobayashi, D.Y., and Paulsen, I.T. 2007. The genomic sequence of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5: insights into biological control. *Pythopathology* 97:233-238.

Lugtenberg, B. J. J., L. C. Dekkers, and G. V. Bloemberg. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39:461–490.

Mansfield, J.; Genin, S.; Magori, S.; Citovsky, V.; Sriariyanum, M.; Ronald, P.; Dow, M.; Verdier, V.; Beer, S.V.; Machado, M.A.; *et al.* 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13, 614–629.

Margarita Gomila, Antonio Busquets, Magdalena Mulet, Elena García-Valdés and Jorge Lalucat 2017. Clarification of Taxonomic Status within the *Pseudomonas syringae* Species Group Based on a Phylogenomic Analysis Front Microbiol; 8: 2422.

Mark Mazzola, Irene de Bruijn, Michael F. Cohen and Jos M. Raaijmakers. 2009. Protozoan-Induced Regulation of Cyclic Lipopeptide Biosynthesis Is an Effective Predation Defense Mechanism for *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Environ. Microbiol. 75:21:6804-6811

Martin, H., J. Thomas, and D. Persley. 2010. Tomato. p. 245-274. In Persley *et al.*, (ed.) Diseases of vegetable crops in Australia. CSIRO Publishing.

Mazzola, M. 2002. Mechanisms of natural soil suppressiveness to soilborne diseases. Antonie Van Leeuwenhoek 81, 557–564.

Melotto M, Underwood W, He SY (2008a) Role of stomata in plant innate immunity and foliar bacterial diseases. Annu Rev Phytopathol 46:101–122

Meyer, J.-M., V. A. Geoffroy, N. Baida, L. Gardan, D. Izard, P. Lemanceau, W. Achouak, and N. J. Palleroni. 2002. Siderophore typing, a powerful tool for the identification of fluorescent and nonfluorescent pseudomonads. Appl. Environ. Microbiol. 68:2745–2753.

Monica Höfte, Nora Altier. 2010. Fluorescent pseudomonads as biocontrol agents for sustainable agricultural systems Research in Microbiology 161, 464-471

Moore ERB, Tindall BJ, Dos Santos VAPM, Pieper DH, Ramos JL, Palleron NJ. 2006. Nonmedical: Pseudomonas, p 646–703. In Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer K-H, Stackebrandt E (ed), Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, vol 6, 3rd ed. Springer, New York, NY.



- Morris, C.E., Kinkel, L.L., Xiao, K., Prior, P. and Sands, D.C. 2007. Surprising niche for the plant pathogen *Pseudomonas syringae*. *Infect. Genet. Evol.* 7, 84–92.
- Nielsen, T.H., Christophersen, C., Anthoni, U. & Sørensen, J. 1998a A promising new metabolite from *Pseudomonas fluorescens* for biocontrol of *Pythium ultimum* and *Rhizoctonia solani*. In: *Molecular Approaches in Biological Control* (eds Duffy, B.K. Rosenberger, U. & Défago, G), pp. 51–55. IOBC/WPRS Bullentin no. 21 (9), INRA-Centre de Recherches de Dijon. F-21034 Dijon Cedex, France.
- Oliva, R., Win, J., Raffaele, S., Boutemy, L., Bozkurt, T.O., Chaparro-Garcia, A., Segretin, M.E., Stam, R., Schornack, S., Cano, L.M., van Damme, M., Huitema, E., Thines, M., Banfield, M.J. and Kamoun, S. 2010. Recent developments in effector biology of filamentous plant pathogens. *Cell. Microbiol.* 12, 705–715.
- Owens, J. D., and R. M. Keddie. 1969. The nitrogen nutrition of soil and herbage coryneform bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 32:338–347.
- P. Singh, S.S. Cameotra 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences, *Trends Biotechnol.* 22:142–146.
- Palleroni, N. J. 1992. Present situation of the taxonomy of aerobic pseudomonads. In: E. Galli, S. Silver, and B. Witholt (Eds.) *Pseudomonas: Molecular Biology and Biotechnology*. ASM Press. Washington, DC. 105–115.
- Palleroni, N.J. and Moore, E.R.B. (2004) Taxonomy of pseudomonads: experimental
- Palmer, D. A., and Bender, C. L. 1995. Ultrastructure of tomato leaf tissue treated with the pseudomonad phytotoxin coronatine and comparison with methyl jasmonate. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8:683-692.

Paolina Garbeva, Mark W Silby, Jos M Raaijmakers, Stuart B Levy and Wietse de Boer. 2011. Transcriptional and antagonistic responses of *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 to phylogenetically different bacterial competitors. *The ISME Journal*, 5, 973–985.

Patrycja Zembek, Aleksandra Danilecka, Rafał Hoser, Lennart Eschen-Lippold, Marta Benicka, Marta Grech-Baran, Wojciech Rymaszewski, Izabela Barymow-Filoniuk, Karolina Morgiewicz, Jakub Kwiatkowski, Marcin Piechocki, Jaroslaw Poznanski, Justin Lee, Jacek Hennig and Magdalena Krzymowska. 2018. Two Strategies of *Pseudomonas syringae* to Avoid Recognition of the HopQ1 Effector in *Nicotiana* Species. *Front Plant Sci.* 2018; 9: 978

Paulsen I. T., Caroline M Press, Jacques Ravel, Donald Y Kobayashi, Garry S a Myers, Dmitri V Mavrodi, Robert T DeBoy, Rekha Seshadri, Qinghu Ren, Ramana Madupu, Robert J Dodson, A Scott Durkin, Lauren M Brinkac, Sean C Daugherty, Stephen A Sullivan, Mary J Rosovitz, Michelle L Gwinn, Liwei Zhou, Davd J Schneider, Samuel W Cartinhour, William C Nelson, Janice Weidman, Kisha Watkins, Kevin Tran, Hoda Khouri, Elizabeth A Pierson, Leland S Pierson III, Linda S Thomashow, Joyce E Loper.,2005. Complete genome sequence of the plant comensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nature Biotechnology* 23, 873-878

Peix, A., Ramirez-Bahena, M.H., Velazquez, E., 2009. Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infect. Genet. Evol.* 2009.08.001.

Pernezny, K. and Zhang, S. 2008. Bacterial speck of tomato. Publication PP-10. Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.

Picard, C., Bosco, M., 2008. Genotypic and phenotypic diversity in populations of plant-probiotic *Pseudomonas* spp. colonizing roots. *Naturwissenschaften* 95, 1-16.

Ponce de León, M. Montesano. 2013. Activation of defense mechanisms against pathogens in mosses and flowering plants, *Int. J. Mol. Sci.* 14:3178–3200.

Press. Washington, DC. 288–317.

Preston, G. M. 2004. Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **359**, 907–918.

Publishers, New York.

R.J. Cook, K.F. Baker, 1983. *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*, American Phytopathological Society.

Raaijmakers JM, Bonsall RF, Weller DM: Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2,4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology* 1999, 89:470-475.

Raaijmakers, J. M., and Mazzola, M. 2016. Soil immune responses. *Science* 352, 1392–1393.

Raaijmakers, J. M., and Weller, D. M. (1998). Natural plant protection by 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. in take-all decline soils. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 144–152.

Ramos Juan-Luis y Filloux Alain. 2010. *Pseudomonas* Volume 6: Molecular Microbiology, Infection and Biodiversity. (eds) Springer: Dordrecht Heidelberg London New York, pp 202.

Sakai, R., Nishiyama, K., Ichihara, A., Shiraishi, K., and Sakamura, S. 1979. Studies on the mechanism of physiological activity of coronatine: Effect of coronatine on cell wall extensibility and expansion of potato tuber tissue. *Ann. Phytopathol. Soc. Japón.* 45:645-653.

Sands, D. C., and A. D. Rovira. 1970. Isolation of fluorescent pseudomonads with a selective medium. *Appl. Microbiol.* 20:513–514.

Sarniguet A, Kraus J, Henkels MD, Muehlchen AM, Loper JE. 1995. The sigma factor sigma s affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:12255–12259.

Schnider U, Keel C, Blumer C, Troxler J, Défago G, Haas D. 1995. Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J Bacteriol*, 177:5387-5392.

Schnider, U. *et al.* 1995. Amplification of the housekeeping sigma factor in *Pseudomonas fluorescens* CHA0 enhances antibiotic production and improves biocontrol abilities. *J. Bacteriol.* **177**, 5387–5392.

Schnider-Keel U, Seematter A, Maurhofer M, Blumer C, Duffy B, Gigot-Bonnefoy C, Reimann C, Notz R, Defago G, Haas D, Keel C. 2000. Autoinduction of 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHA0 and repression by the bacterial metabolites salicylate and pyoluteorin. *J. Bacteriol.* 182:1215–1225.

Schroth, M., D. C. Hildebrand, and N. Panopoulos. 1992. Phytopathogenic pseudomonads and plant-associated pseudomonads. *In*: A. Balows, H G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (Ed.) *The Prokaryotes*, 2nd ed. Springer-Verlag. New York, NY. 3:3104–3131.

Shinoda, S., and K. Okamoto. 1977. Formation and function of *Vibrio parahemolyticus* lateral flagella. *J. Bacteriol.* 129:1266–1271.

Shu-Wei Yang, Ling Xu, Ronald Mierzwa, Ling He, Joseph Terracciano, Mahesh Patel, Vincent Gullo, Todd Black, Wenjun Zhao, Tze-Ming Chan and Min Chu 2004. Two novel antibiotics, Sch 419558 and Sch 419559, produced by *Pseudomonas fluorescens*: effect on activity by overexpression of RpoE *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 3333–3338.

Silby MW, Cerdeno-Tarraga AM, Vernikos GS, Giddens SR, Jackson RW, Preston GM, Zhang XX, Moon CD, Gehrig SM, Godfrey SA, Knight CG, Malone JG, Robinson Z, Spiers AJ, Harris S, Challis GL, Yaxley AM, Harris D, Seeger K, Murphy L, Rutter S, Squares R, Quail MA, Saunders E, Mavromatis K, Brettin TS, Bentley SD, Hothersall J, Stephens E, Thomas CM, Parkhill J, Levy SB, Rainey PB, Thomson NR. 2009. Genomic and genetic analyses of diversity and plant interactions of *Pseudomonas fluorescens*. *Genome Biol.* 10: R51.

Singh, S. and F. Pelaez, 2008. Biodiversity, chemical and drug discovery. *Progr. Drug Res.*, 65: 143-174.

Slininger PJ., Shea-Wilbur MA., 1995. Liquid-culture pH, temperature, and carbon (not nitrogen) source regulate phenazine productivity of the take-all biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1995 Oct;43(5):794-800.

Slininger, P.J. & Shea-Wilbur, M.A. *Appl Microbiol Biotechnol* (1995) 43: 794.  
Stockwell, V.O.; Duffy, B. 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *Rev. Sci. Tech.*, 31, 199–210.

Stockwell V.O and Stack J.P., 2007. Using *Pseudomonas spp* for integrated biological control. *Phytopathology*, 97:244-249

Subhash Yadav, Shivani Yadav, Rajeev Kaushik, Anil K. Saxena and Dilio K. Arora. 2013. Genetic and functional diversity of *fluorescent Pseudomonas* from rhizospheric soils of wheat crop. J. Basic Microbiol. 00, 1–13.

Sujatha Subramoni<sup>1</sup>, NaeemNathoo, EugeneKlimov and Ze-Chun Yuan. 2014 *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. Frontiers in plant science 5:322

Tamura, K., Zhu, Y., Sato, M., Teraoka, T., Hosokawa, D., and Watanabe M. 1998. Roles of coronatine production by *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* for pathogenicity. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64:299-302.

Teresa A. Kidarsa, Neal C. Goebel, T. Mark Zabriskie and Joyce E. Loper. 2011. Phloroglucinol mediates cross-talk between the pyoluteorin and 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthetic pathways in *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Molecular Microbiology, 81(2), 395–414.

Tomihama, T., Nishi, Y., Mori, K., Shirao, T., Iida, T., Uzuhashi, S., *et al.*, 2016. Rice bran amendment suppresses potato common scab by increasing antagonistic bacterial community levels in the rhizosphere. Phytopathology 106, 719–728.

Ultan F Walsh, John P Morrissey and Fergal O’Gara. 2001. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation Environmental biotechnology, 289-295

Van der Voort, M., Kempenaar, M., van Driel, M., Raaijmakers, J. M., and Mendes, R. 2016. Impact of soil heat on reassembly of bacterial communities in the rhizosphere microbiome and plant disease suppression. Ecol. Lett. 19, 375–382.

Van der Zwet, T.; Orolaza-Halbrendt, N.; Zeller, W. 2012. *Fire Blight: History, Biology, and Management*; APS Press: St. Paul, MN, USA

Van Loon, L. C. & Bakker. 2003. P. A. H. M. in *Root Ecology*. Springer-Verlag, Berlin. 297–330

Van Loon, L. C., Bakker, P., and Pieterse, C. M. J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 36:453-483.

Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant. Soil.* 255, 571-586.

Vincent, M. N. *et al.* 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 2928–2934.

Vincent, M. N., Harrison, L. A., Brackin, J. M., Kovacevich, P. A., Mukerji, P., Weller, D. M., and Pierson, E. A. 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborne *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:2928-2934.

Walid Fakhouria, Frank Walkera, Bernhard Voglerb, Wolfgang Armbrusterc, Heinrich Buchenauer. 2001. Isolation and identification of N-mercapto-4-formylcarbostyryl, an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytochemistry* 58, 1297–1303.

Walsh, U., J. P. Morrissey, and F. O’Gara. 2001. *Pseudomonas* for control of phytopathogens: From functional genomics to commercial exploitation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12:289–295.

Weller, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 26:379-407.

Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., McSpadden Gardener, B. B., and Thomashow, L. S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 40:309-348.

Weston DJ, Pelletier DA, Morrell-Falvey JL, Tschaplinski TJ, Jawdy SS, Lu TY, Allen SM, Melton SJ, Martin MZ, Schadt CW, Karve AA, Chen JG, Yang X, Doktycz MJ, Tuskan GA. 2012. *Pseudomonas fluorescens* induces strain-dependent and strain-independent host plant responses in defense networks, primary metabolism, photosynthesis, and fitness. *Mol Plant Microbe Interact* 25:765–778.

Whistler CA, Stockwell VO, Loper JE. 2000. Lon protease influences antibiotic production and UV tolerance of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Appl Environ Microbiol*, 66:2718-2725

Widmer F, Seidler RJ, Gillevet PM, Watrud LS, Di Giovanni GD 1998. A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 64:2545–255.

Wilkenson, S. G. 1970. Cell walls of *Pseudomonas* species sensitive to ethylene-diamine-trea-acetic acid J. Bacteriol. 104:1035–1044.

Xin X-F, He SY 2013. *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000: A Model Pathogen for Probing Disease Susceptibility and Hormone Signaling in Plants. *Annual Review of Phytopathology*, Vol 51 51: 473–498.

Xu Cheng, Irene de Bruijn, Menno van der Voort, Joyce E. Loper and Jos M. Raaijmakers. 2013. The Gac regulon of *Pseudomonas fluorescens* SBW25 *Environmental Microbiology Reports* 5(4), 608–619.



Xu Cheng, Menno van der Voort and Jos M Raaijmakers. 2015. Gac-mediated changes in pyrroloquinoline quinone biosynthesis enhance the antimicrobial activity of *Pseudomonas fluorescens* SBW25. *Environmental Microbiology Reports* 7(1), 139-147.

Yamazaki, A., Li, J., Zeng, Q., Khokhani, D., Hutchins, W.C., Yost, A.C., *et al.* 2012. Derivatives of plant phenolic compound affect the type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa* via a GacS–GacA two-component signal transduction system. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 36–43.

Zhao, Y. Thilmony, R. Bender, C. L., Schaller, A. , He, S. Y. and Howe, G. A. (2003), Virulence systems of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* promote bacterial speck disease in tomato by targeting the jasmonate signaling pathway. *The Plant Journal*, 36: 485-499.

## **RESUMEN BIOGRÁFICO**

**Mayela de San Juan Robles Huízar**

**Candidata para el grado de:**

**Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología**

Tesis: EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE METABOLITOS SECUNDARIOS OBTENIDOS A PARTIR DE *PSEUDOMONAS* AISLADOS DE SUELOS MINEROS DE FRESNILLO

Campo de estudio: Biotecnología vegetal y compuestos antibacterianos.

Datos Personales: Nacida en Fresnillo, Zac. el 16 de diciembre de 1983, hija de Rubén Robles González y Hortensia Huízar Vázquez.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Zacatecas (UAZ), grado obtenido Químico Farmacéutico Biólogo en 2007. Maestra en Ciencias con acentuación en Microbiología (UANL) 2010.

Experiencia Profesional: Practicante del Laboratorio de Análisis de Alimentos de la UAZ 2005. Practicante de Laboratorio Clínico del IMSS, 2006. Estancia de tiempo completo en la Unidad de Investigación Médica de Zacatecas del IMSS 2007-2008 en el cual se realizaron análisis de epidemiología molecular y diagnóstico de *M. tuberculosis*. Realización de tesis “EFECTO DE EXTRACTOS DE PRODUCTOS NATURALES PARA CONTROLAR LA PRESENCIA DE *Campylobacter jejuni* y *Salmonella* spp. EN CARNE MOLIDA DE POLLO” en el laboratorio de bioquímica y genética de microorganismos de la UANL, 2008-2010.

Experiencia laboral: Profesor de Tiempo Completo en la Universidad Politécnica de Zacatecas en la Coordinación de Ingeniería en Biotecnología (2010 a la fecha). Profesor de asignatura en la Universidad Interamericana para el Desarrollo (UNID) campus Fresnillo, en la coordinación de Licenciatura en Enfermería (2016-2018)