



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera
División de Estudios de Posgrado

Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera

Tesis

Efecto de los metabolitos de *Bacillus* spp. para el control de
hongos xilófagos

Presenta:

Q.F.B. Vanessa Ruby García Ortiz

Para obtener el título de
Maestra en ciencias y Tecnología de la Madera

Asesor: Dr. Crisanto Velázquez Becerra
Laboratorio de Microbiología de la Madera
Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera

Morelia Michoacán, Abril de 2018

Agradecimientos

A la coordinación de la Maestría en Ciencias y Tecnología de la Madera por la aceptación al programa.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología 2016-2018 por el apoyo de beca.

Al Dr. Crisanto Velázquez Becerra por su asesoría en la tesis en el Laboratorio de Microbiología de la Madera de la Facultad de Ingeniería y tecnología de la Madera de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Dr. José Cruz de León por su apoyo en el Laboratorio de Conservación y Preservación de la Madera de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Dr. Eduardo Valencia Cantero por su colaboración en el Laboratorio de Ecología Microbiana del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Dr. Mauro Manuel Martínez Pacheco por su colaboración en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez por su apoyo en el laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.



ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes.....	3
2.1. Degradación de la madera por hongos xilófagos	3
2.2. Tratamiento para el biodeterioro de la madera causado por hongos xilófagos.....	4
2.3. Control biológico	6
3. Justificación	9
4. Hipótesis	9
5. Objetivo general.....	9
5.1. Objetivos específicos	9
6. Materiales y métodos.....	10
6.1. Aislamiento de hongos xilófagos de madera de <i>Pinus</i> spp.	10
6.2. Identificación molecular de hongos xilófagos aislados de madera de <i>Pinus</i> spp.....	11
6.3. Actividad enzimática de 6 hongos xilófagos aislados de madera de <i>Pinus</i> spp.....	13
6.3.1. Obtención de los extractos enzimáticos	13
6.3.2. Actividad óxido-reductora	13
6.3.3. Actividad celulolítica	14
6.4. Identificación de las cepas bacterianas antagónicas de <i>Trametes versicolor</i> bajo condiciones <i>in vitro</i>	14
6.5. Evaluación de la actividad antagónica de <i>Bacillus</i> spp. y sus metabolitos en madera de baja durabilidad expuesta a hongos xilófagos.	15
6.5.1. Antagonismo de <i>Bacillus</i> spp. frente a los hongos xilófagos aislados.15	
6.5.2. Extracción de metabolitos de <i>Bacillus</i> spp.....	15
6.5.3. Determinación del efecto antagónico de los metabolitos de <i>Bacillus</i> spp. frente a hongos xilófagos aislados.....	16
6.5.4. Bioensayo <i>in vitro</i> de los metabolitos de <i>Bacillus</i> spp. en madera de <i>P. pseudostrobus</i> expuesta a hongos xilófagos.	16
7. Resultados y discusión	18

7.1. Aislamiento e identificación de hongos xilófagos	18
7.2. Actividad enzimática de los hongos xilófagos	22
7.3. Identificación de las cepas bacterianas antagónicas de <i>Trametes versicolor</i> bajo condiciones <i>in vitro</i>	23
7.4. Actividad antagónica de <i>Bacillus</i> spp. frente a hongos xilófagos	25
7.5. Evaluación del efecto de los metabolitos de <i>Bacillus</i> spp. en madera de <i>P. pseudostrobis</i>	30
8. Conclusiones	41
9. Recomendaciones	41
10. Bibliografía.....	42
11. Anexos.....	52
11.1. Cuento de esporas.....	52
11.2. Cuantificación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico.....	52
11.3. Determinación de proteína.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sitio de colecta de los aislados fúngicos 10

Figura 2. Método de excavación en placa 16

Figura 3. Bioensayo *in vitro* de los metabolitos de *Bacillus* spp. en madera de *P. pseudostrobilus* expuesta a hongos xilófagos..... 17

Figura 4. Hongos aislados de tocones de árboles de *Pinus* spp..... 19

Figura 5. Hongos aislados de madera aserrada de *Pinus* spp..... 19

Figura 6. Árbol filogenético basado en las secuencias parciales de los genes 18S de los hongos xilófagos aislados..... 20

Figura 7. Clasificación taxonómica de los aislados fúngicos de la localidad de San Miguel del Monte, Morelia Michoacán, México 21

Figura 8. Diámetro del crecimiento micelial de *Trametes versicolor* en confrontación directa con bacterias antagonistas. 24

Figura 9. Efecto antagónico de la cepa *Bacillus* spp. SS frente a los aislados fúngicos de tocones de *Pinus* spp..... 27

Figura 10. Efecto antagónico de la cepa *Bacillus* spp. SS frente a aislados fúngicos de madera aserrada de *Pinus* spp. 29

Figura 11. Interacción de *Trametes versicolor* y el extracto bacteriano de *Bacillus* spp. SS con diferentes solventes. 31

Figura 12. Diámetro del crecimiento micelial de los hongos aislados de tocones de *Pinus* spp. a diferentes tratamientos. 36

Figura 13. Diámetro del crecimiento micelial de los hongos aislados de madera aserrada de *Pinus* spp. a diferentes tratamientos. 38

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Actividad enzimática de hongos aislados de la localidad de de San Miguel del Monte, Morelia, Michoacán México 23

Cuadro 2. Inhibición del crecimiento micelial (cm) de aislados fúngicos de tocones de *Pinus* spp. por las cepas SS, BS-MIA02 y BM2 de *Bacillus* spp. 26

Cuadro 3. Inhibición del crecimiento micelial (cm) de aislados fúngicos de madera aserrada *Pinus* spp. por las cepas SS, BS-MIA02 y BM2 de *Bacillus* spp. 28

Cuadro 4. Inhibición del crecimiento micelial de aislados fúngicos de tocones de *Pinus* spp. por el extracto metabólico de *Bacillus* spp. SS. 33

Cuadro 5. Inhibición del crecimiento micelial de los aislados fúngicos de madera aserrada de *Pinus* spp. por el extracto metabólico de *Bacillus* spp. SS. 33

Cuadro 6. Porcentaje de colonización de hongos xilófagos en madera de *P. pseudostrobus*. 40

Resumen

La madera es de naturaleza orgánica y por ende es susceptible al biodeterioro causado por hongos xilófagos que liberan enzimas capaces de dañar la celulosa hemicelulosa y lignina, lo que genera pérdidas económicas importantes. Para evitar este biodeterioro se emplean fungicidas de origen químico; sin embargo, la mayoría de estos productos causan efectos negativos al ambiente y salud humana. Como alternativa de tratamiento, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del extracto metabólico de *Bacillus* spp. en madera de baja durabilidad y expuesta a hongos xilófagos. Para ello se realizó el aislamiento e identificación de hongos xilófagos; se determinó la actividad enzimática de 6 aislados fúngicos; posteriormente se seleccionaron *in vitro* cepas de *Bacillus* spp. antagonistas de *Trametes versicolor* y se evaluó la actividad antagónica de *Bacillus* spp. y de sus metabolitos en madera de baja durabilidad expuesta a hongos xilófagos. Los resultados mostraron que los aislados fúngicos pertenecen a los géneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium* y *Trichoderma*. En cuanto a la actividad enzimática, *Fusarium* mostró una elevada actividad celulolítica con 2.3 U / μg ; mientras que la mayor actividad óxido-reductora se encontró en *Mucor* con 421.7 U / μg , lo que indica la capacidad de los hongos para liberar enzimas involucradas en la degradación de madera; el ensayo de antagonismo mostró que todas las cepas bacterianas inhibieron crecimiento micelial de *T. versicolor* destacando *Bacillus* spp. SS con 2.50 cm valores con diferencia estadística significativa en comparación con el control. En la evaluación antifúngica de los metabolitos de *Bacillus* spp. en madera, se observó la inhibición del crecimiento de estos organismos xilófagos y sólo colonizaron la madera *T. versicolor* y *F. verticillioides* en un 55.95 % y 1.34 % respectivamente. De acuerdo con los resultados en el presente estudio los metabolitos del género *Bacillus* podrían ser una alternativa de tratamiento biológico para el control de hongos xilófagos.

Palabras clave: Protección de madera, Hongos xilófagos, *Bacillus* spp, Fungicidas Metabolitos.

Abstract

The wood is of an organic nature and therefore is susceptible to biodeterioration caused by xylophagous fungi that release enzymes capable of damaging hemicellulose cellulose and lignin, leading to significant economic losses. To prevent this biodeterioration, fungicides of chemical origin are used. To avoid this biodeterioration, fungicides of chemical origin are used; however, most of these products cause negative effects on the environment and human health. As an alternative treatment, the aim of this work was to evaluate the effect of the metabolic extract of *Bacillus* spp. in wood of low durability and exposed to fungi xylophages. To this end, the isolation and identification of xylophagous fungi was carried out; the enzymatic activity of 6 fungal isolates was determined; *Bacillus* spp. strains were subsequently selected *in vitro*. Antagonists of *Trametes versicolor* and the antagonistic activity of *Bacillus* spp. and its metabolites in low durability wood exposed to xylophagous fungi was evaluated. The results showed that the fungal isolates belong to the genera *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium* and *Trichoderma*; Regarding the enzymatic activity *Fusarium* showed a high cellulolytic activity with 2.3 U / μg ; while the highest oxide-reducing activity was found in *Mucor* with 421.7 U / μg , which indicates the ability of fungi to release enzymes involved in wood degradation; the antagonism test showed that all bacterial strains inhibited mycelial growth of *T. versicolor* highlighting the strain *Bacillus* spp. SS with 2.50 cm values with statistically significant difference compared to the control. In the antifungal evaluation of the metabolites of *Bacillus* spp. in wood, the growth inhibition of these xylophagous organisms was observed and only *T. versicolor* and *F. verticillioides* colonized the wood by 55.95 % and 1.34 % respectively. According to the results in the present study, the metabolites of the *Bacillus* genus could be an alternative biological treatment for the control of xylophagous fungi.

Key words: Wood protection, Xylophagous fungi, *Bacillus* spp.

1. Introducción

La madera es un material susceptible al biodeterioro y su protección con agentes químicos es efectiva, sin embargo producen efectos negativos en el ambiente y el humano, por ello se buscan tecnologías ecológicas como el control biológico, que es una alternativa ambientalmente sostenible al uso de compuestos tóxicos para proteger a la madera. La protección química de la madera contra hongos xilófagos consiste en una serie de acciones encaminadas a reducir o eliminar el deterioro (Mai *et al.*, 2004), aplicando sustancias químicas de las que se debe tomar en cuenta su principio activo con el fin de prolongar la vida útil de la madera al hacerla resistente (Cruz de León, 2010). Los preservantes convencionales generalmente se basan en biocidas como sulfato de cobre, óxido de cobre, arsénico, naftenato de cobre, cobre-8-hidroxiquinolinato, 2-fenilfenol, pentaclorofenol y otros compuestos fenólicos, carboxamidas, compuestos de tributilestaño, isotiazolonas, compuestos de amonio cuaternario o tiazoles azaconazol, propiconazol, tebuconazol (Ávila, 2008; Cruz de León 2010; González-Laredo 2015), éstos compuestos químicos para la protección de la madera son efectivos pero incurren en ciertos riesgos ambientales y para la salud (Crawford *et al.*, 2000; Peylo y Willeitner 2001; Humphrey 2002). Es por ello que se buscan alternativas de tratamiento como el control biológico que es el uso de organismos y/o de metabolitos o subproductos que son antagonistas naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos (Susi *et al.*, 2011). En la literatura se reportan numerosos estudios de metabolitos de origen bacteriano utilizados como control biológico, entre los más estudiados se encuentran microorganismos pertenecientes a los géneros *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Trichoderma* y *Bacillus* (Whipps, 2001); este último es considerado como excelente candidato para el desarrollo de bioproductos aplicables para el control de enfermedades de origen fúngico (Reinoso *et al.*, 2012). Se ha demostrado su potencial como control biológico de hongos fitopatógenos (Hu *et al.*, 2008; Caldeira *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2015), entre los mecanismos a través de los cuales evitan el establecimiento y desarrollo de organismos fitopatógenos se encuentra la producción de metabolitos como los lipopéptidos, estructuralmente consisten en un péptido cíclico unido a una cadena

de ácido graso β -hidroxi o β -amino, clasificándose en 3 diferentes familias iturinas, fengicinas y surfactinas, su actividad antimicrobiana tiene lugar por su interacción con la membrana citoplasmática de células bacterianas o fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los organismos fitopatógenos (Scharf *et al.*, 2014). El interés de emplear alternativas al tratamiento en la protección de la madera ha ido en aumento debido a los problemas ambientales y de eliminación de los conservantes químicos, por tanto el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto del extracto metabólico de *Bacillus* spp. en madera de baja durabilidad expuesta a hongos xilófagos; lo que representaría una alternativa de tratamiento al biodeterioro de la madera causado por hongos.

2. Antecedentes

2.1. Degradación de la madera por hongos xilófagos

La madera es una materia prima natural, biodegradable y renovable, utilizada como un elemento básico en la construcción, en la industria del papel y en la producción de combustible (Mai *et al.*, 2004). En México *Pinus pseudostrobus* Lindl. es una de las especies forestales de mayor importancia (Silva, 2008; Cruz de León, 2010) se utiliza para la restauración de suelos degradados (Conafor, 2006), es buen productor de resina ampliamente aprovechada en los estados del centro y sur del país, la buena calidad de la madera le permite el uso en aserrío, triplay, chapa, para cajas de empaque, molduras, construcción, fabricación de ventanas y muebles, artesanías, ebanistería y pulpa para papel (Silva, 2008; Flores, 2011). Sin embargo tiene sus limitaciones debido a su naturaleza orgánica, la más importante es la susceptibilidad de sufrir ataque por hongos que liberan enzimas capaces de degradar los componentes estructurales de la madera (lignina, celulosa y hemicelulosa) alterando así las propiedades físico-mecánicas, estéticas, higroscópicas, químicas y anatómicas (Winandy y Rowell, 2005) estos organismos reciben el nombre de hongos xilófagos que a su vez se clasifican en hongos de pudrición café o cubica, blanca y suave e incluyen a aquellos cuya acción tienen por efecto modificar exclusivamente el aspecto de la madera y especialmente su color denominados hongos cromógenos (Zanni, 2008).

Los hongos de pudrición café remueven selectivamente celulosa y hemicelulosa de la madera por hidrólisis, esta alteración la causan principalmente *basidiomicetes* de los géneros *Lentinus* y *Phellinus* entre otros; atacan principalmente maderas blandas como el *Pinus* spp., el *Cupressus sempervirens* y el *Abies alba*, aunque puede también ocurrir en latifoliadas (Guillén *et al.*, 2005). Mientras que los hongos de pudrición blanca degradan preferentemente la lignina tanto en coníferas como latifoliadas, provocan la formación de un residuo de color blanco debido a la acumulación de celulosa y hemicelulosas, la degradación de la lignina ocurre a través de oxidaciones que conducen a su progresiva despolimerización (Tapia *et al.*, 2014); son el más importante grupo de organismos responsables de

degradación de la madera y pertenecen a la clase *basidiomicete* entre ellos se encuentra a *Trametes versicolor* (Quintero, 2011). Los hongos de pudrición blanda se desarrollan en el lumen y el interior de la pared celular secundaria de la madera realizando daño, es causada por hongos *ascomicetes* y *deuteromicetes* principalmente de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* (García, 2015). Este tipo de pudrición disminuye la fuerza estructural de la madera, haciéndola suave o flexible (Carrillo-Parra *et al.*, 2014) y los hongos cromógenos se alimentan de azúcares libres y de fácil transformación, no degradan la pared celular; se identifican por producir coloraciones como negra, azul, roja, castaña, amarilla, marrón y gris, siendo la más importante en la madera de *Pinus* spp. la mancha azul o de savia, caracterizada por la tonalidad azul oscuro causada por hongos *ascomicetes* principalmente del género *Trichoderma* (González-Laredo *et al.*, 2015).

2.2. Tratamiento para el biodeterioro de la madera causado por hongos xilófagos

El tratamiento más eficaz para la madera afectada por hongos xilófagos implica inicialmente, la eliminación de la humedad, tanto propia como de su entorno dejándola por debajo del 15-16 %, aun cuando en estos casos no es suficiente (pudrición seca).

En el caso de los hongos cromógenos se procede a descender por debajo del 16 % la humedad de la madera así como aplicar soluciones de productos químicos a fin de hacer desaparecer la coloración inadecuada y aplicar sobre la madera ya sin coloración inicial, una solución de protector químico.

Si la madera está afectada por hongos de pudrición se deberá identificar el hongo presente con el fin de identificar su peligrosidad, reconocer la madera afectada, determinando el grado de ataque, así como el grado de durabilidad natural ante los hongos. Se deberá realizar el saneamiento de la madera y el entorno, a fin de lograr la eliminación o descenso de humedad de la madera y su entorno; ventilación de las áreas en que exista madera con pudrición y eliminación de la madera afectada por pudrición. La impregnación química de la madera se aplica como tratamiento

preventivo de madera sana localizando las zonas de potencial actuación futura de hongos de pudrición; como tratamiento curativo de la madera afectada debiendo sustituir la madera afectada por otra sana previamente impregnada químicamente en todo su volumen (Rodríguez, 1998).

Las sustancias químicas que se emplean para estos tratamientos son básicamente sales solubles en agua, de las cuales las más conocidas para los hongos son el bórax y el ácido bórico. Mezclas de cobre-cromo-arsénico (CCA), mezclas CCA con productos a base de sales (sulfato de cobre, dicromato de sodio pentóxido de arsénico) o a base de óxidos (óxido de cobre, trióxido de cromo, arsénico pentóxido). También se encuentran los disueltos en compuestos orgánicos que son una gran gama de biocidas (fungicida e insecticidas), dentro de las que se encuentran los compuestos nitrados, clorados (fenoles clorados, naftalenos clorados, bencenos clorados), compuestos organometálicos (organomercuriales, naftalenos metálicos, órgano-estañosos), compuestos organonitrogenados (superficiales y totales) y derivados de azoles (Ávila, 2004; Cruz de León 2010; Carrillo-Parra *et al.*, 2014). La mayoría de estos activos formulados a base de metales pesados causan daño a corto plazo en el ambiente y salud humana (Schmidt, 2007). Tal es el caso del pentaclorofenol (PCF) de alta toxicidad para humanos que aumenta por la presencia de impurezas como las clorodibenzodioxinas y los clorodibenzofuranos. El PCF tiene graves efectos a largo plazo: es mutágeno, causa alteraciones en los sistemas inmunológico y endocrino, aumenta la susceptibilidad a infecciones y altera las funciones reproductivas (Castillo y Bárcenas, 1998).

En un estudio, Decker *et al.*, 2002 reportan que la exposición prolongada a metales pesados transportados por el aire puede ocurrir como resultado del contacto en interiores y exteriores al polvo de madera tratada con sales CCA. Por lo tanto, los trabajadores están expuestos a los metales pesados comúnmente utilizados en la madera tratada sales CCA esto es importante, ya que la exposición a la forma hexavalente de cromo está asociada con efectos perjudiciales para la salud, incluidas las perforaciones del tabique nasal y un mayor riesgo de cáncer nasal.

2.3. Control biológico

Se ha comprobado que el empleo del control biológico en el campo agrícola es efectivo; sin embargo, en el ámbito forestal la información es escasa para combatir hongos cromógenos y nula para hongos de pudrición en madera. Existen diversas investigaciones que emplean el uso de bacterias del género *Bacillus* y/o sus metabolitos para inhibir el desarrollo de hongos tal como lo reportan:

Feio *et al.*, (2004) reportaron que el crecimiento de *Fusarium oxysporum* Schltdl. fue inhibido por *Bacillus subtilis* 335 en medio de cultivo de glucosa extracto de levadura (GEL) en los días 11 y 14. El crecimiento de *F. oxysporum* fue inhibido significativamente por una solución al 50 % de GEL inoculada con cultivo de *B. subtilis* 335 de 11 días en bloques de *Pinus pinaster* Ait. Mientras que en el medio malta de levadura (ML) inoculado con *B. subtilis* C186 de 12 h demostraron que puede prevenir el crecimiento de varios hongos, aislados de *Pinus* spp. como: *Aureobasidium* sp., *Ceratocystis* sp., *Cytospora pini* Desm., *Ophiostoma* sp., *Penicillium* sp. y *Trichocladium* sp. Los estudios preliminares indicaron que los metabolitos activos contienen funciones amina; sin embargo, serán necesarios más estudios para determinar las estructuras de los compuestos activos.

Touré *et al.*, (2004) evaluaron el potencial de la cepa *Bacillus subtilis* GA1 para reducir la infección posterior a la cosecha causada por *Botrytis cinerea* en *Pyrus malus* L. tratando frutos artificialmente heridos con suspensiones de endosporas. La cepa GA1 fue muy eficaz para reducir la incidencia de la enfermedad durante los primeros 5 días después de la inoculación de patógenos y se mantuvo un nivel de protección del 80 % durante los siguientes 10 días. El tratamiento de frutos con un extracto de sobrenadante de cultivo GA1 también ejerció un fuerte efecto preventivo sobre el desarrollo de moho gris. Un análisis adicional de este extracto reveló que la cepa GA1 produce una amplia variedad de isómeros lipopeptídicos antifúngicos de las familias iturina, fengicina y surfactina. Como evidencia de la implicación de tales compuestos en la reducción de la enfermedad se originó a partir de la recuperación de fengicinas de sitios protegidos de fruta colonizados por células bacterianas.

Caldeira *et al.*, (2007) evaluaron la actividad antifúngica del sobrenadante libre de células de *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051. Entre los hongos contaminantes de la madera, *Rhizopus* sp. L-122 y *Trichoderma harzianum* CCMI 783 fueron particularmente sensibles, presentando un 99.8 % y un 74.7 % de inhibición, respectivamente. *Aspergillus niger* CCMI 296, *Trichoderma pseudokoningii* CCMI 304 y *Trichoderma koningii* CCMI 868, mostraron una menor sensibilidad al sobrenadante, por debajo del 50 % de inhibición. *Penicillium expansum* CCMI 625 no fue sensible al sobrenadante. Los hongos fitopatógenos mostraron diferentes niveles de sensibilidad *Botrytis cinerea* CCMI 899 y *Cephalosporium* sp. F25 fueron sensibles a los sobrenadantes de los cultivos de *B. amyloliquefaciens* CCMI 1051 con niveles de inhibición superiores al 70 %. Solo *Fusarium solani* F4 mostró una tasa de inhibición por debajo del 50 %.

Tao *et al.*, (2011) investigaron la actividad antifúngica y el mecanismo de la fengicina producida por *Bacillus subtilis* fmbJ en presencia y ausencia de surfactina comercial contra *Rhizopus stolonifer*. La concentración inhibitoria mínima (CIM) de fengicina sin surfactina comercial añadida fue de 0.4 mg / mL mientras que la CMI de fengicina con surfactina comercial añadida fue de 2.0 mg / mL. La fengicina actuó en la membrana celular y los órganos celulares e inhibió la síntesis de ADN. El efecto antimicótico de la fengicina se redujo después de añadir surfactina comercial por lo que sugieren que la membrana celular fúngica puede ser el objetivo primario de la acción de la fengicina y la surfactina comercial puede reducir la actividad antifúngica de la fengicina.

Sarti y Miyazaki, en 2013 evaluaron la respuesta inhibitoria de *B. subtilis* ATCC6633, *B. amylolyticus*, *B. subtilis* var. natto, *B. subtilis* var. natto domesticado, en los hongos *Fusarium solani* y *Pythium* sp. Los tratamientos de inoculación fueron: 1) semillas de *Glycine max* inoculadas con *Bradyrhizobium japonicum* y 2) semillas de *Glycine max* coinoculadas con *B. japonicum* y *B. subtilis*. Las plantas crecieron en cámara de cultivo termostaticada a 30 °C, humedad relativa 60 % y fotoperíodo 16/8 luz-oscuridad durante 35 días. Las pruebas *in vitro* de la cepa *B. subtilis* ATCC6633 redujeron el crecimiento micelial de *Fusarium solani* 50 % y *Pythium* sp. 47 % respecto a los controles. La coinoculación de *B. japonicum* y *B. subtilis* estimuló el

crecimiento de la planta completa. La cepa de *B. subtilis* ATCC6633 sintetizó metabolitos de naturaleza proteínica y otros con capacidad biosurfactante. Cuando la bacteria se cultivó en medio mínimo salino, glicerol 1 % y concentraciones de ácido L-glutámico entre 40 y 55 mM, se obtuvo la concentración mayor de metabolitos de naturaleza proteínica (35 mg proteína mL) y la mayor formación de biopelícula.

Zhang *et al.*, (2014) aislaron una cepa de *B. subtilis* B37 que fue eficaz para el biocontrol en la mancha de savia del *Populus alba* L. *B. subtilis* B37 fue cultivada durante 2 días y produjo una cantidad significativa de β -1,3-glucanasa, inhibiendo eficazmente el crecimiento de *Ceratocystis adiposa* Hz91, *Lasiodiplodia theobromae* YM0737, *Lasiodiplodia theobromae* Fx46, y *Fusarium* sp., hongos de la mancha de savia del álamo YM05. Encontraron que *B. subtilis* puede producir una pequeña cantidad de proteasas, pero no encontraron quitinasas.

Torres *et al.*, (2017) evaluaron la capacidad de *B. amyloliquefaens* PGPBacCA1 para proteger las semillas de sus patógenos naturales, así como inhibir *Fusarium solani* y *Sclerotinia sclerotiorum* Sacc, hongos fitopatógenos, además de evaluar la naturaleza química de los metabolitos responsables de la actividad antifúngica y los cambios en la morfología de estos hongos debido al efecto antifúngico. Obteniendo que *B. amyloliquefaciens* PGPBacCA1 impidió el desarrollo de los hongos endófitos del frijol negro, mientras que sólo *Cladosporium* spp. sobrevivió en la variedad blanca. *B. amyloliquefaciens* PGPBacCA1, por cultivos mixtos, fue capaz de inhibir el desarrollo de los siguientes hongos fitopatógenos: *Sclerotium rolfsii* 35 %, *Sclerotinia sclerotiorum* 76.5 %, *Rhizoctonia solani* 73 %, *Fusarium solani* 56.5 % y *Penicillium* spp. 71.5 %. Un análisis UV-MALDI TOF MS mostró que *B. amyloliquefaciens* PGPBacCA1 produce diferentes homólogos de los lipopéptidos surfactina, iturina y fengicina en presencia de *S. sclerotiorum* y *F. solani*. Un análisis de microscopía óptica de barrido confirmó los efectos antifúngicos de los lipopéptidos, que también causaron daño a *Fusarium* y *Sclerotinia*.

3. Justificación

La mayoría de los fungicidas para proteger a la madera actualmente utilizados, son formulados a base de metales pesados los cuales causan daño a corto plazo por alterar negativamente el ambiente y salud humana, por lo que una alternativa ecológica es el uso de metabolitos bacterianos del género *Bacillus*, para fortalecer la protección de la madera de baja durabilidad.

4. Hipótesis

Algunos metabolitos producidos por *Bacillus* spp. pueden ser utilizados en la protección de madera de baja durabilidad susceptible al deterioro por hongos xilófagos.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto del extracto metabólico de *Bacillus* spp. en madera de baja durabilidad expuesta a hongos xilófagos.

5.1. Objetivos específicos

- 1) Aislar e identificar hongos xilófagos de la localidad de San Miguel del Monte.
- 2) Determinar la actividad enzimática de 6 hongos xilófagos.
- 3) Identificar las cepas bacterianas antagónicas de *Trametes versicolor* bajo condiciones *in vitro*.
- 4) Evaluar la actividad antagónica de *Bacillus* spp. y de sus metabolitos en madera de baja durabilidad expuesta a hongos xilófagos.

6. Materiales y métodos

6.1. Aislamiento de hongos xilófagos de madera de *Pinus* spp.

El área de estudio se ubica en la localidad de San Miguel del Monte Morelia, Michoacán, México, sus coordenadas geográficas son 19° 38' 39,24" de latitud norte y los 101° 9' 6,28" de latitud oeste; dadas las condiciones ecológicas existentes en dicha localidad contribuyen al desarrollo de una gran diversidad de especies de hongos en particular los xilófagos, en el presente trabajo sólo se estudiaron las especies encontradas en tocones y madera aserrada de *Pinus* spp. (Figura1).

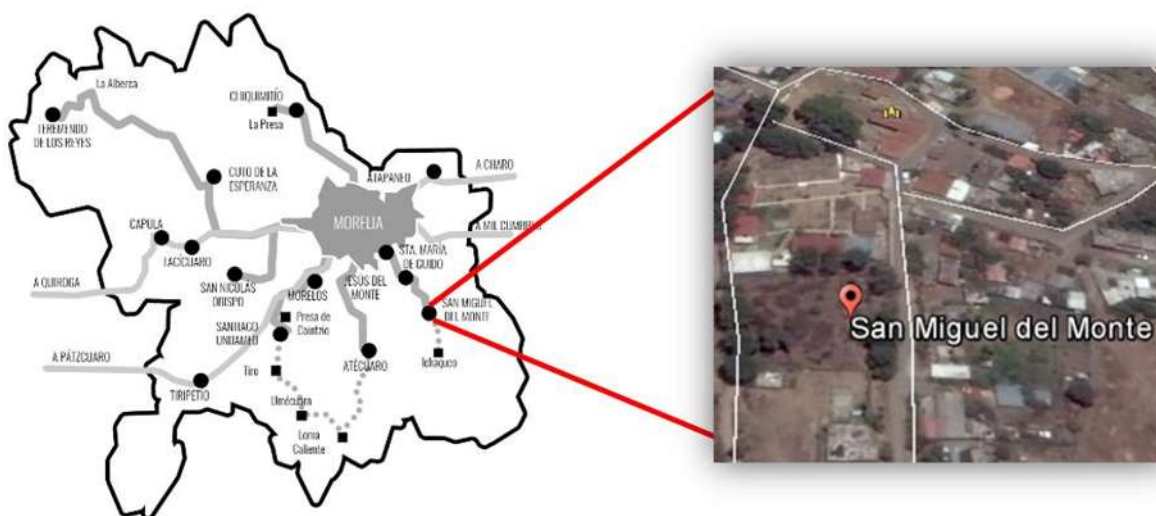


Figura 1. Sitio de colecta de los aislados fúngicos.

Se tomaron muestras de los hongos presentes en madera derribada y aserrada a partir del corte de los carpóforos en contacto con el tronco. A continuación, las muestras fueron trasladadas al laboratorio de Microbiología de la Madera de la Facultad de Ingeniería en Tecnología de la Madera (FITECMA-UMSNH), donde se procedió al aislamiento de los hongos xilófagos. Se trabajó en campana de flujo laminar (Novatech, México) y se realizó una desinfección del carpóforo con hipoclorito de sodio (5 %), alcohol etílico (70 %) y agua destilada estéril, se sembró un trozo de éste en agar papa dextrosa (PDA) con la siguiente composición (g / L):

extracto de papa 4.0; glucosa 20.0; agar 15.0 agua destilada 1L; pH 5.6 ± 0.2 y se incubo a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 días, se dejó un control el cual consiste en medio PDA sin inocular (Nazareno *et al.*, 2002), se realizaron subcultivos hasta obtener cultivos axénicos.

6.2. Identificación molecular de hongos xilófagos aislados de madera de *Pinus* spp.

La biología molecular ofrece herramientas para complementar los inconvenientes que genera el estudio morfológico descriptivo de los hongos entre la cual destaca la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rodríguez *et al.*, 2004).

Se extrajo el ADN genómico de 5 aislados fúngicos de acuerdo a la metodología descrita por Raeder y Broda (1985):

1. Se pesaron 100 mg de micelio y se colocó en un tubo de 1.5 mL, se agregaron 0.4 g de perlas de vidrio, 200 μL de buffer de lisis (0.2 M Tris-HCl pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.01 M EDTA, 1 % de SDS) y 200 μL de fenol: cloroformo: isoamímilo (25:24:1).
2. El contenido se mezcló en vórtex durante 6 min.
3. Se adicionaron 300 μl de fenol:cloroformo:isoamílico y 300 μl de buffer de lisis. Las muestras se mezclaron en vórtex durante 30 s.
4. Se centrifugaron a 14 000 r.p.m. durante 30 s.
5. La fase superficial se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se agregaron 300 μL de cloroformo:isoamílico (24:1). Se agitó en vórtex durante 10 s.
6. Se centrifugaron las muestras a 14 000 r.p.m. durante 30 s.
7. La primera fase se transfirió a un tubo limpio de 1.5 mL y se le agregaron 2.5 volúmenes de isopropanol. Las muestras se mantuvieron en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min.
8. Se centrifugaron a 14 000 r.p.m. durante 5 min.
9. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó con 500 μL de etanol al 70 % y se centrifugó durante 3 min a 14 000 r.p.m.
10. Se decantó el etanol y la pastilla fue secada en campana de flujo laminar

11. Las muestras fueron resuspendidas en 30 μ L de agua desionizada estéril. El ADN genómico fue visualizado en gel de agarosa (1 %) mediante electroforesis, con el fin de corroborar su integridad. Después las muestras fueron cuantificadas en NANODROP 2000c (Thermo Scientific®). Para la identificación de los aislados fúngicos se llevó a cabo mediante PCR del gen ribosomal 18S, usando los oligonucleótidos NS1 Y NS6 (White *et al.*, 1990). La reacción PCR se llevó a un volumen final de 50 μ L: 20 ng de ADN (2 μ L), 3 μ L de NS1 (10 μ M), 3 μ L de NS6 (10 μ M), 25 μ L de PCR Master Mix 2x (Promega®) y 17 μ L de agua libre de nucleasas. Se utilizó el siguiente programa de amplificación, 35 ciclos de amplificación con las siguientes rampas de temperatura: 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, y 72 °C por 1 min., además de un ciclo final de extensión a 72 °C durante 3 min. Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa (1 %) mediante electroforesis, con el fin de corroborar la amplificación y el tamaño de la banda esperado (~1 400 pb). Una vez corroborada la amplificación, el producto de PCR se purificó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Los genes ribosomales 18S amplificados y purificados, fueron enviados para su secuenciación (método Sanger) al Laboratorio Nacional de Genómica para su Biodiversidad (Langebio, www.langebio.cinvestav.mx). Las secuencias obtenidas fueron ensambladas empleando el software CodonCodeAligner (CodonCodecorp., www.codoncode.com/aligner). Una vez ensambladas, las secuencias fueron comparadas con secuencias depositadas en la base de datos del GenBank, usando la herramienta básica de búsqueda de alimentos locales (BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), con el fin de encontrar las secuencias homologas más cercanas, los grupos taxonómicos fueron ampliados descargando secuencias pertenecientes a cada grupo de hongos. Todas las secuencias fueron cargadas al software MEGA7 (www.megasoftware.net), donde fueron alineadas usando ClustalW. Obteniendo el alineamiento, se procedió a la generación de un árbol filogenético, utilizando el método de máxima parsimonia y una prueba de soporte de la tipología de 1000 seudorréplicas (bootstrap), esto con el fin de asignar las secuencias a grupos taxonómicos específicos.

6.3. Actividad enzimática de 6 hongos xilófagos aislados de madera de *Pinus* spp.

6.3.1. Obtención de los extractos enzimáticos

Para los extractos enzimáticos se tomó una concentración de 5×10^5 esporas por cada hongo aislado a ensayar y se inocularon en 250 mL de medio mínimo líquido con la siguiente composición (g / L): 1.4 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.3 urea, 2.0 KH_2PO_4 , 0.3 CaCl_2 , 0.3 $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.005 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0016 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.014 $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.002 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25 $\mu\text{L/L}$ solución de vitaminas 100 X y celulosa microcristalina al 1 % como fuente de carbono (Mandels, 1975). Las fermentaciones se realizaron por triplicado durante tres días en agitación continua a 150 r.p.m. y temperatura ambiente. Se realizó un muestreo al final de la incubación y se centrifugaron a 10 000 r.p.m. durante 5 min, el sobrenadante se utilizó para la cuantificación de actividad óxido-reductora, actividad celulolítica y proteínas extracelulares. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

6.3.2. Actividad óxido-reductora

La cuantificación óxido-reductora se llevó a cabo mediante la medición de la cantidad de 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP) reducido. Se monitoreo el descenso de la absorbencia de la mezcla de reacción a 600 nm por 3 min. La composición de la mezcla de reacción contenía: 150 μL de DCPIP 2 mM, 1.700 μl de Celobiosa 2.5 Mm disueltos en amortiguador de fosfatos 10 Mm a pH 6.3. La reacción fue iniciada agregando 150 μL del extracto enzimático. Se utilizó el valor de la pendiente para determinar la actividad enzimática. El coeficiente de extinción molar (ϵ) del DCPIP es usado a una lectura de 600 nm a 25°C y una presión de 1.012 atmosferas; $\epsilon = 1.5712 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La actividad enzimática fue calculada como: [(valor de la pendiente) (volumen de la reacción) / $\epsilon \cdot$ longitud de la cubeta] \div mg de proteína y es expresada como actividad específica = mol/min•mg proteína (Calderón *et al.*, 2011).

6.3.3. Actividad celulolítica

La actividad de endocelulasa (endo- β -1,4-glucanasa) se determinó como indicador de actividad celulolítica mediante el método modificado de Ghose, (1987). En un tubo de ensaye de 10 mL se colocaron 400 μ L de amortiguador de Citrato 50 mM y adicionaron 500 μ L de disolución de carboximetilcelulosa (CMC) al 1 %. Posteriormente se colocó 100 μ L de extracto crudo enzimático (previamente centrifugado a 10 000 r.p.m. por 4 min). Se agitó e incubó en termo baño a 50 °C por 30 min, después de la incubación se detuvo la reacción con 1 mL de 3,5-ácido dinitrosalicílico (DNS) se agitaron y se colocaron en baño de agua en ebullición durante 15 min, se dejó enfriar y cuantificó la actividad en espectrofotómetro a 540 nm. Los ensayos se realizaron por triplicado (Breuil y Saddler, 1985). Los datos obtenidos fueron correlacionados con una curva de calibración de glucosa realizada mediante el método de DNS. La actividad enzimática fue reportada como U / mg.

6.4. Identificación de las cepas bacterianas antagónicas de *Trametes versicolor* bajo condiciones *in vitro*.

Las bacterias *Bacillus megaterium* (UMCV I) y *Stenotrophomonas maltophilia* (UMCV IV) y el hongo *Trametes versicolor* fueron proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología de la Madera (FITECMA-UMSNH), del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH fueron proporcionadas las bacterias *Bacillus* spp (BA, SS y BM) y de la empresa Microvida Innovación Agrícola S.A. de C.V., la bacteria *Bacillus* spp. (BS-MIA02). Se activaron en agar nutritivo (AN) con la siguiente composición (g / L): pluripeptona 5.0; extracto de carne 3.0; cloruro de sodio 8.0; agar 15.0; pH 7,3 \pm 0,2 y se incubaron a 30 °C durante 48 h. Para determinar el efecto antagónico se realizaron ensayos *in vitro* siguiendo la metodología de cultivo dual descrita por Reyes *et al.*, 2012; Mejía-Bautista *et al.*, 2016. Para ello se emplearon los cultivos de las siguientes cepas bacterianas UMCV I, UMCV IV, BA, SS, BM y BS-MIA02, a partir de las cuales se trazaron dos estrías equidistantes (2 cm) del centro de las cajas de Petri con medio PDA/AN relación 1:1, en el centro se sembró *T. versicolor* y se incubaron a 28 °C por 10 días. Se

realizaron cinco repeticiones por cada cepa bacteriana, como control se sembró en el centro de las cajas Petri *T. versicolor* en el medio AN/PDA sin la bacteria.

6.5. Evaluación de la actividad antagónica de *Bacillus* spp. y sus metabolitos en madera de baja durabilidad expuesta a hongos xilófagos

6.5.1. Antagonismo de *Bacillus* spp. frente a los hongos xilófagos aislados

Primero se determinó el efecto antagónico frente a los hongos xilófagos aislados, se realizaron pruebas *in vitro* siguiendo la metodología de cultivo dual descrita por Reyes *et al.*, 2012; Mejía-Bautista *et al.*, 2016. Para ello se utilizaron las cepas bacterianas del género *Bacillus* spp. BM, SS y BSMIA02 con mayor potencial antagónico contra *T. versicolor*.

6.5.2. Extracción de metabolitos de *Bacillus* spp.

Para el cultivo de las bacterias se utilizó el medio Luria-Bertani (LB) con la siguiente composición (g / L): 10.0 de pluripeptona, 5.0 de extracto de levadura y 5.0 de NaCl por litro y pH 7.0. Posteriormente para el proceso de fermentación se utilizó el medio modificado 3s con la siguiente composición (g / L): 30.0 de pluripeptona, 10.0 de glucosa, 1.0 de KH₂ PO₄ y 0.5 de MgSO₄ 7 H₂O, pH 6.8 y se incubó durante 18 h a 37 °C y 180 r.p.m.; posteriormente 1.0 mL del pre-cultivo se inoculó en 100 mL del medio 3s, dejándolo en agitación constante durante 24 h, 37 °C y 150 r.p.m. (Yesid, 2012). La extracción de los metabolitos se realizó con diferentes solventes: agua destilada (EMB/A), acetona (EMB/B), acetato de etilo (EMB/C) y metanol (EMB/D); se adicionó por separado 45.0 mL de cada solvente al producto obtenido por fermentación en Shaker, esta mezcla se dejó en agitación constante durante 1 hora a 150 r.p.m. El extracto bacteriano obtenido se centrifugó a 5000 r.p.m. durante 10 min a 4 °C, el sobrenadante se filtró utilizando una membrana de nitrocelulosa con tamaño de poro 0.45 µm (Mizumoto *et al.*, 2006; Dimkić *et al.*, 2017), se realizaron 5 repeticiones por cada tratamiento.

6.5.3. Determinación del efecto antagónico de los metabolitos de *Bacillus* spp. frente a hongos xilófagos aislados

Para determinar el efecto antagónico se utilizó el método de excavación en placa según (Mitidieri, 1998; Ariza y Sánchez 2012), en una caja con PDA se realizaron cinco perforaciones de 5 mm, una en el centro de la caja y las restantes en las orillas con disposición equidistante donde se colocó 100 μ L del extracto bacteriano y se colocó un propágulo de 5 mm de cada hongo xilófago aislado con 7 días de crecimiento en 4 puntos de la caja Petri (Figura 2). Se realizaron cinco replicas para cada ensayo.



Figura 2. Método de excavación en placa.

6.5.4. Bioensayo *in vitro* de los metabolitos de *Bacillus* spp. en madera de *P. pseudostrobilus* expuesta a hongos xilófagos

Se utilizaron muestras de madera de *P. pseudostrobilus* libres de deterioro biológico con dimensiones de 2.5 \times 0.5 \times 0.5 cm, las cuales se esterilizaron en autoclave 30 min a 120 $^{\circ}$ C y 15 lb. Se sumergieron en 100 mL del filtrado obtenido en la extracción de los metabolitos de *Bacillus* spp. SS por un periodo de 24 h a temperatura ambiente. Pasado ese lapso, las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 h. Luego, las muestras se colocaron cajas de Petri adicionado con el

medio PDA y se conformaron los siguientes tratamientos: 1) control (los hongos xilófagos en el medio PDA); 2) madera-hongo (muestras de madera y hongos xilófagos en ausencia de metabolitos de *Bacillus* spp. SS 3) madera-hongo-metabolitos (muestras de madera hongos xilófagos y metabolitos de *Bacillus* spp.) (Orozco-Mosqueda *et al.*, 2015) como se muestra en la figura 3. Este experimento se realizó a 28 °C en oscuridad por un período aproximado de 10 días con 10 repeticiones. El efecto de los metabolitos de *Bacillus* spp. SS en la madera de *P. pseudostrobus* expuestas a hongos xilófagos se evaluó mediante la medición del diámetro del crecimiento micelial de los xilófagos (Ezziyani *et al.*, 2004) y las muestras de madera fueron analizadas con el programa informático Image Processing and Analysis in Java ImageJ con el cual se determinó el porcentaje del área colonizada por los hongos xilófagos mediante análisis de color.

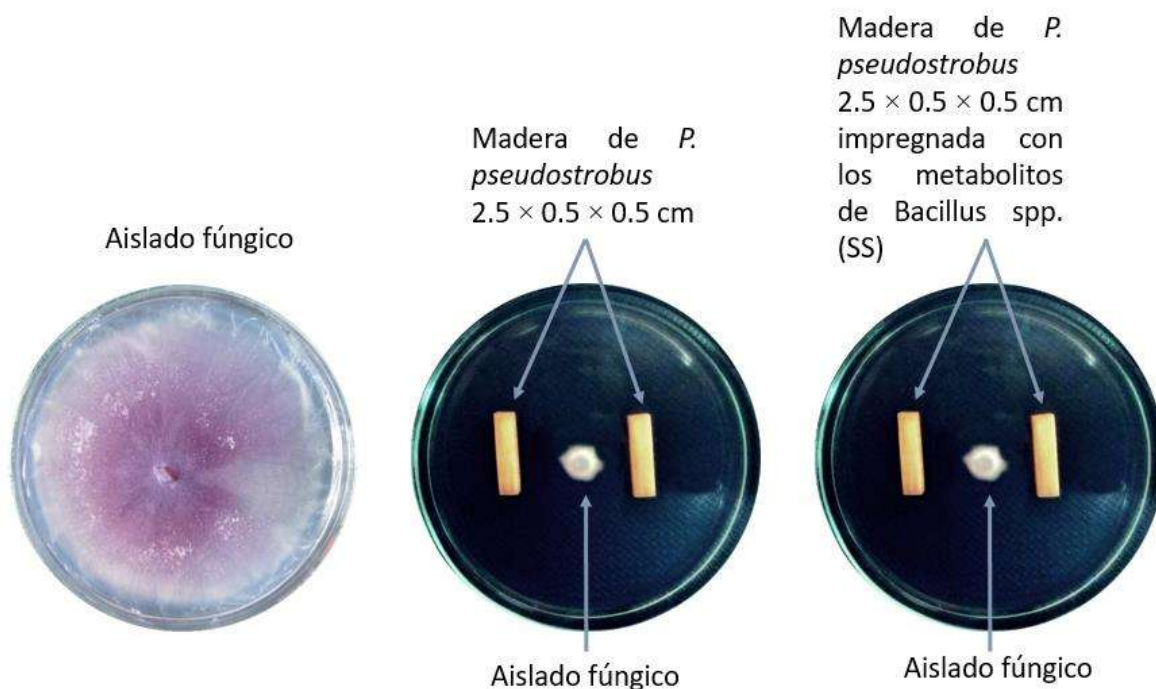


Figura 3. Bioensayo *in vitro* de los metabolitos de *Bacillus* spp. en madera de *P. pseudostrobus* expuesta a hongos xilófagos.

7. Resultados y discusión

7.1. Aislamiento e identificación de hongos xilófagos

Se consiguió coleccionar un total de 15 organismos de tocones y madera aserrada de *Pinus* spp. sin embargo, se logró el aislamiento 8 hongos de tocones como se muestra en la figura 4, a los hongos se les asignaron las siguientes claves: MA corresponde a *Rhizopus* sp. MA1 a *Fusarium verticillioides*, MB a *Rhizopus* sp., B1 a *Mucor* sp., F2 y H corresponden a *Trichoderma* sp; mientras que en madera aserrada únicamente se lograron aislar 5 hongos (Figura 5) a los cuales se les asignaron las claves: PP1 que corresponde a *Trichoderma reesei* PP2 PP2, PP3, PP4 y PP5 al género *Trichoderma*. Por su parte, la identificación molecular a partir de los genes ribosomales 18S mostraron la identidad de 11 aislados fúngicos de los cuales 6 son aislados de tocones y 5 de madera aserrada (Figura 6) correspondientes a la división *Ascomycota*: *Fusarium verticillioides*, *Trichoderma reesei* *Trichoderma* sp. y a la división *Zygomycota*: *Rhizopus* y *Mucor*, en la figura 7 se muestra su clasificación taxonómica. Se reporta que los hongos degradadores de madera pertenecen principalmente a la división *Ascomycota* y *Basidiomycota* de las clases *Basidiomycetes* y *Ascomycetes* así como sus formas imperfectas (Zanni, 2008), se vuelven metabólicamente más activos a mayor temperatura y con humedad adecuada, lo que lleva a los correspondientes aumentos en el crecimiento, producción de enzimas y tasas de descomposición de la madera (A'Bear *et al.*, 2014, Crowther *et al.*, 2015). Sin embargo, se encontraron hongos en la madera pertenecientes a la división *Zygomycota*, por tanto se sugiere que también están involucrados en la degradación de la madera. Autores como Valenzuela y Barrera (2001) también han reportado estos géneros fúngicos, aislados de aserrín de *Pinus radiata* mientras que Jankowiak *et al.*, (2018) reporta una alta presencia de *Trichoderma* y *Mucor* en madera de *Pinus* spp., la existencia de estos organismos en la madera provoca deterioro en varios niveles, e.g. disminuyen la calidad de madera aserrada, originan un cambio en la coloración original resultando una madera “azulada a negruzca” siguiendo un patrón conforme a la disposición radial de las células parenquimáticas (Encinas *et al.*, 2002; Jankowiak *et al.*, 2018).



Figura 4. Hongos aislados de tocones de árboles de *Pinus* spp.



Figura 5. Hongos aislados de madera aserrada de *Pinus* spp.

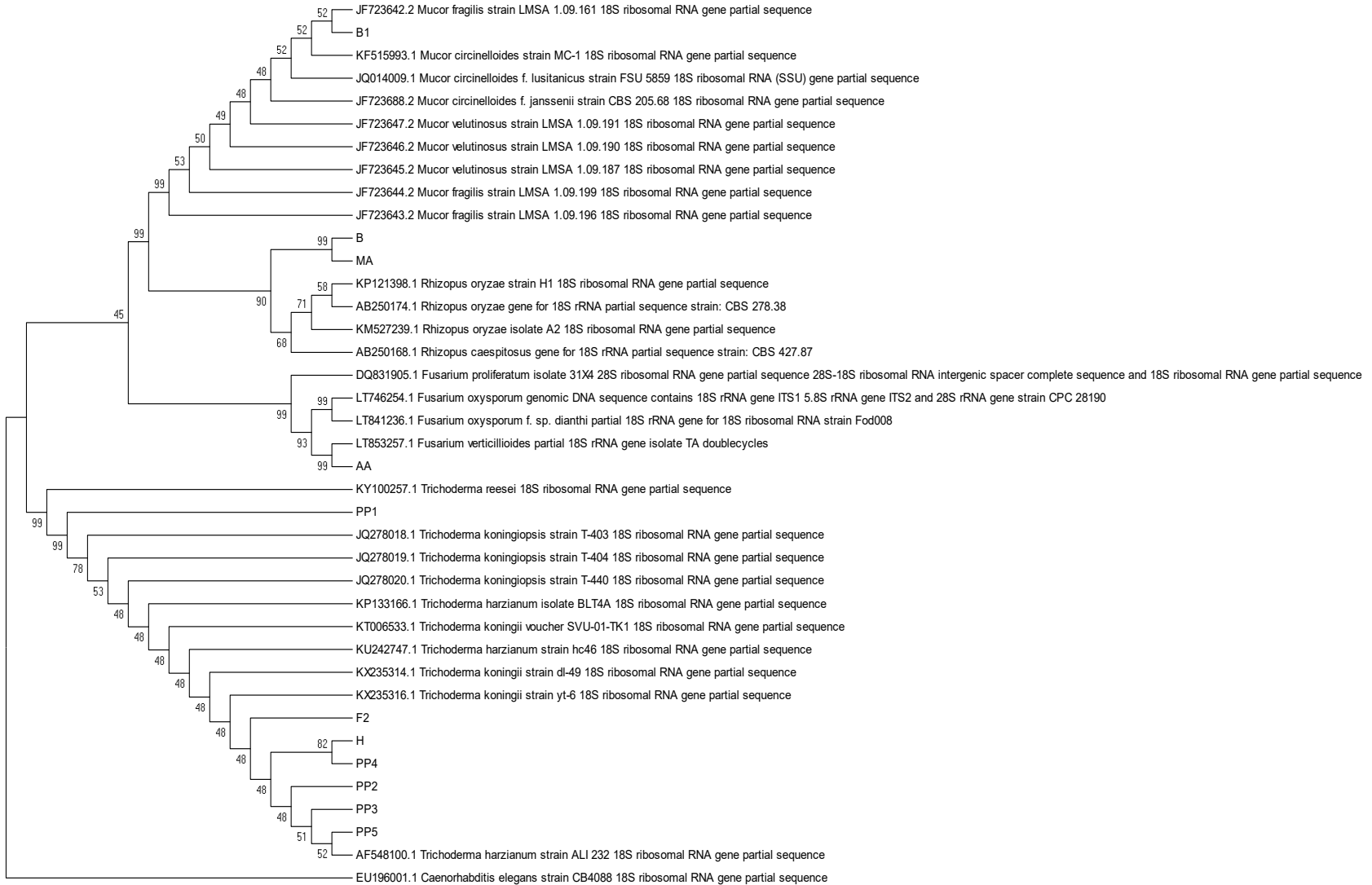


Figura 6. Árbol filogenético basado en las secuencias parciales de los genes 18S de los hongos xilófagos aislados.

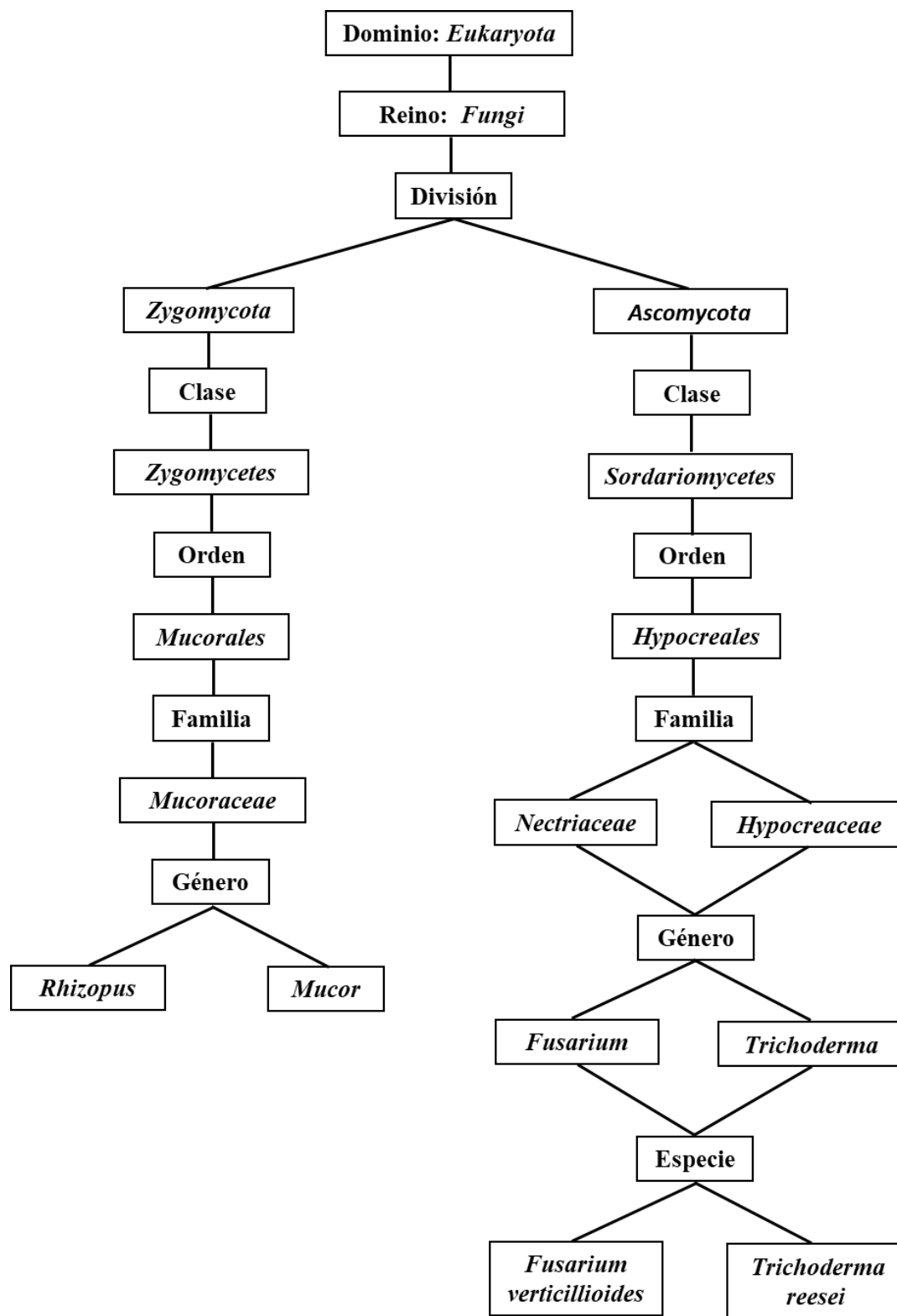


Figura 7. Clasificación taxonómica de los aislados fúngicos de la localidad de San Miguel del Monte, Morelia Michoacán, México.

7.2. Actividad enzimática de los hongos xilófagos

Los aislados *F. verticillioides* (AA), *Mucor* (B1), *Trichoderma* sp. (PP2), (PP3) y el aislado (MF) mostraron actividad enzimática óxido-reductora y celulolítica, no se encontró un patrón definido de ésta (Cuadro1). Teniendo como referencia al aislado *Trametes versicolor* (Control), conocido por su producción enzimática y capacidad para degradar completamente todos los componentes de los materiales lignocelulósicos (Zhang *et al.*, 2017). Se reporta en la literatura que los hongos xilófagos se encuentran en la división *Ascomycota* y *Basidiomycota* (Cruz de León *et al.*, 2010); sin embargo se identificó una elevada actividad óxido-reductora en *Mucor* con 421.7 U / μg perteneciente a la división *Zygomycota*, lo que indica que los hongos de esta división también liberan enzimas involucradas en la degradación de la madera. Mientras que la mayor actividad celulolítica fue en *F. verticillioides* con 2.3 U / μg . Es difícil realizar comparaciones en cuanto a la actividad enzimática celulolítica y óxido-reductora entre hongos, debido a las diferencias en los resultados que se obtienen por el uso de distintas técnicas para la cuantificación enzimática (Sigoillot *et al.*, 2002); pero la presencia de estas enzimas indica la capacidad de los xilófagos para degradar a la madera ya que son las principales enzimas involucradas en su deterioro (Ramírez *et al.*, 2012). Por tanto, de acuerdo al perfil enzimático secretado por los hongos xilófagos, se puede determinar las características del modo y grado de descomposición de la madera (Drenou, 2000; Chaparro *et al.*, 2009). Lo que ayuda a fortalecer estudios de durabilidad natural frente a hongos xilófagos que alteran el complejo lignocelulósico como resultado de la acción enzimática, además de sus posibles aplicaciones a nivel biotecnológico como en procesos de biopulpeo, las principales enzimas de uso en la industria del papel son aquellas con capacidad de eliminar lignina, dentro de las que destacan las enzimas extracelulares producidas por los hongos xilófagos y podrían ser utilizadas para este fin.

Cuadro 1. Actividad enzimática de hongos aislados de la localidad de San Miguel del Monte, Morelia, Michoacán México.

Hongo aislado	Actividad enzimática U / μg	
	Celulolítica	Óxido-reductora (10^{-5})
<i>T. versicolor</i> (Control)	0.6	21.2
<i>F. verticillioides</i> (MA1)	2.3	0.0
<i>Mucor</i> sp (B1)	0.5	42.17
<i>Trichoderma</i> sp (PP2)	0.2	0.0
<i>Trichoderma</i> sp (PP3)	0.2	95.6
<i>Trichoderma</i> sp (PP5)	0.0	0.0
Aislado MF	0.3	0.0

7.3. Identificación de las cepas bacterianas antagónicas de *Trametes versicolor* bajo condiciones *in vitro*.

Se realizó una selección *in vitro* de cepas bacterianas contra hongos xilófagos con el fin de identificar las bacterias antagonistas potenciales las cuales (*Bacillus megaterium* UMCV I, *Stenotrophomonas maltophilia* UMCVI V, *Bacillus* spp. (BA, SS, BM y BS-MIA02)), revelaron tener actividad antagónica contra *T. versicolor*. Destacando las cepas SS y BS-MIA02 que mostraron una inhibición del crecimiento micelial de *T. versicolor* con 2.50 y 2.82 cm respectivamente estos valores con diferencia estadística significativa en comparación con el crecimiento de *T. versicolor* sin las bacterias con valor de 8.62 cm como se aprecia en la figura 8. Estos son los primeros aportes de bacterias antagonistas de *T. versicolor* los resultados de este estudio demuestran que la aplicación de cepas antagonistas seleccionadas, especialmente de *Bacillus* spp. SS tienen efecto en el control de *T. versicolor* uno de los hongos xilófagos más agresivos por su capacidad para degradar los componentes estructurales de la madera. De acuerdo a lo reportado por Hernández-Lauzardo *et al.*, (2007) las bacterias antagonistas tienen la capacidad de ejercer un efecto de represión sobre el patógeno de interés y debido a que no tienen un único mecanismo de acción y la multiplicidad de éstos, es una característica importante para su selección como agentes de control biológico (Fernández-Larrea, 2001). Bacterias del género *Bacillus* son consideradas entre las más eficaces para el control de fitopatógenos mediante mecanismos de antibiosis,

competencia y actividad enzimática lítica (Layton *et al.*, 2011). Así mismo, *S. maltophilia* produce un antifúngico llamado “maltofila” que controla fitopatógenos por antagonismo directo (Gómez, 2005).

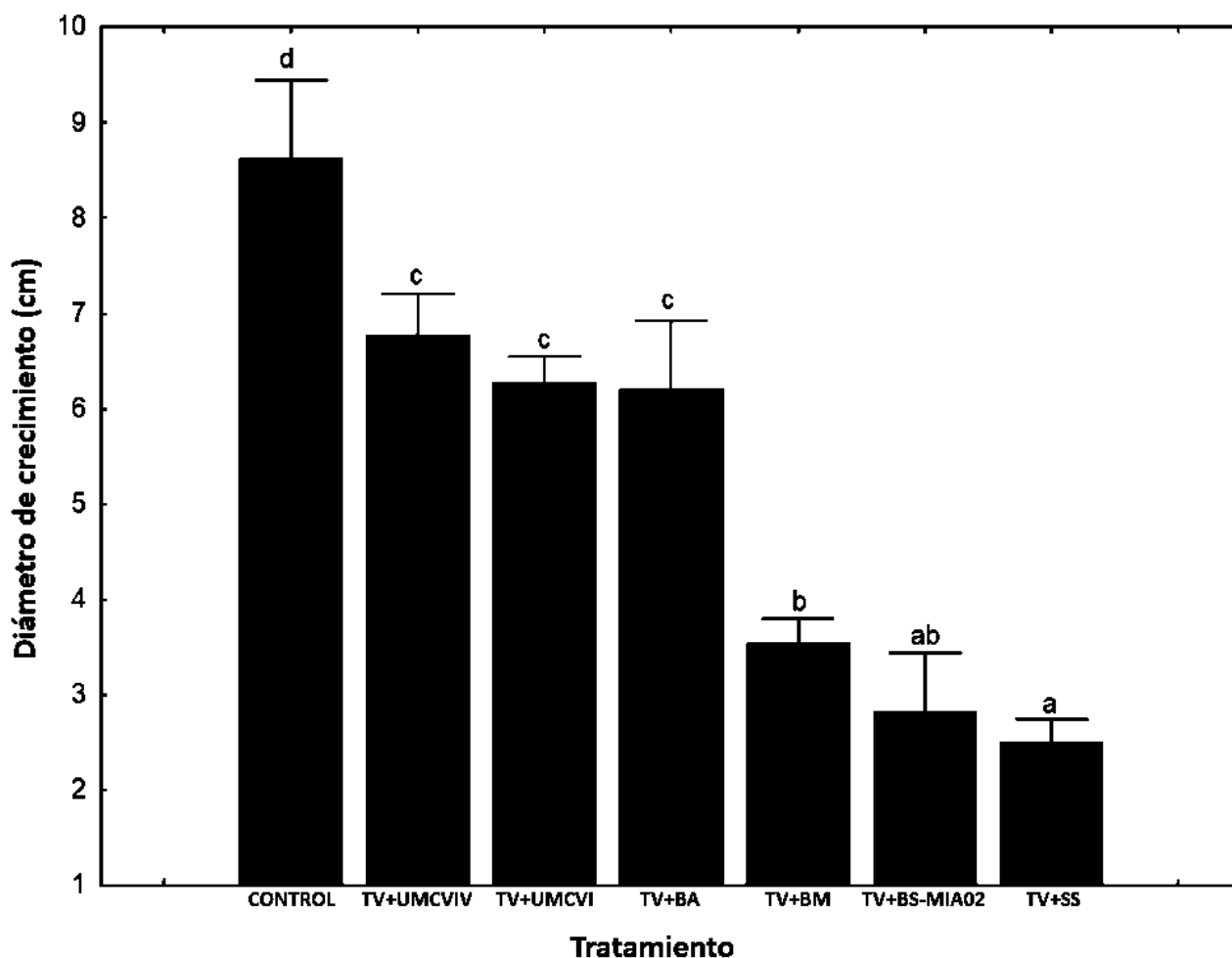


Figura 8. Diámetro del crecimiento micelial de *Trametes versicolor* en confrontación directa con bacterias antagonistas.

Control = *T. versicolor* sin bacterias; TV+ BA, TV+SS, TV+UMCV IV, TV+UMCV I, TV+BM, TV+BSMIA = *T. versicolor* con las cepas de *Bacillus* spp. Un análisis de varianza de una vía se realizó junto con una prueba de Tukey $p < 0.05$. Las barras representan el error estándar. Tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas.

7.4. Actividad antagónica de *Bacillus* spp. frente a hongos xilófagos

Las cepas de *Bacillus* spp. (SS, BM y BS-MIA02), revelaron tener actividad antagónica en confrontación directa contra los hongos aislados de tocones; sin embargo la cepa que mostró un mayor efecto antagónico fue la cepa de *Bacillus* spp. SS en el crecimiento micelial de los aislados fúngicos como se aprecia en la figura 9. En *F. verticillioides* el crecimiento micelial fue de 1.58 cm mientras que en su control fue de 4.36 cm este valor es inferior a lo reportado por Cavaglieri *et al.*, (2005) donde muestra que la cepa de *Bacillus* sp. 13 inhibió el crecimiento micelial de *F. verticillioides* a 2.36 cm lo que indica la capacidad de bacterias del género *Bacillus* para reprimir el crecimiento de *F. verticillioides*. En *Rhizopus* sp. el crecimiento micelial fue de 3.70 cm y en su control el crecimiento fue de 9.2 cm. Para *Mucor* sp. el crecimiento micelial fue de 1.62 cm y en su control fue de 8.62 cm; en el aislado MF el crecimiento micelial fue de 2.7 y en su control de 9.2 cm; en cepas de *Trichoderma* sp. el crecimiento micelial fue de 2.82 y 3.16 cm mientras que el crecimiento de su control fue de 9.2 cm y en el aislado MT2 el crecimiento micelial fue de 2.24 cm en tanto que el crecimiento de su control fue de 9.2 cm, valores con diferencia estadística significativa (Cuadro 2); éstos son los primeros aportes de antagonismo directo de bacterias del género *Bacillus* contra *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. y *Trichoderma* sp. ya que en la agricultura no tienen relevancia sin embargo en la industria de la madera son de gran importancia porque dañan su apariencia reduciendo así su valor comercial.

Cuadro 2. Inhibición del crecimiento micelial (cm) de aislados fúngicos de tocones de *Pinus* spp. por las cepas SS, BS-MIA02 y BM2 de *Bacillus* spp.

Aislado fúngico	Tratamiento			
	Control	<i>Bacillus</i> spp-SS	<i>Bacillus</i> spp. BS-MIA02	<i>Bacillus</i> spp. BM2
<i>F. verticillioides</i> (MA1)	4.36 ± 0.27 ^c	1.58 ± 0.19 ^a	3.84 ± 0.20 ^b	3.88 ± 0.13 ^b
<i>Rhizopus</i> sp. (MA)	9.2 ± 0.0 ^b	3.70 ± 0.29 ^a	9.02 ± 0.0 ^b	9.2 ± 0.0 ^b
<i>Rhizopus</i> sp. (MB)	9.2 ± 0.0 ^b	3.70 ± 0.40 ^a	9.02 ± 0.0 ^b	9.2 ± 0.0 ^b
<i>Mucor</i> sp. (B1)	8.86 ± 0.47 ^c	1.62 ± 0.35 ^a	4.7 ± 0.50 ^b	4.34 ± 0.65 ^b
Aislado (MF)	9.2 ± 0.0 ^d	2.7 ± 0.10 ^a	6.28 ± 0.71 ^b	8.20 ± 0.82 ^c
<i>Trichoderma</i> sp. (H)	9.2 ± 0.0 ^c	2.82 ± 0.37 ^a	6.26 ± 0.54 ^b	7.0 ± 0.57 ^b
<i>Trichoderma</i> sp. (F2)	9.2 ± 0.0 ^c	3.16 ± 0.20 ^a	6.88 ± 0.86 ^b	7.90 ± 0.83 ^b
Aislado (MT2)	9.2 ± 0.0 ^d	2.24 ± 0.20 ^a	4.48 ± 0.62 ^b	7.60 ± 0.83 ^c

Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey (P<0.05). Los valores son las medias ± la desviación estándar.



Figura 9. Efecto antagónico de la cepa *Bacillus* spp. SS frente a los aislados fúngicos de tocones de *Pinus* spp.

Las cepas de *Bacillus* spp. (SS, BM y BS-MIA02) mostraron actividad antagónica contra los hongos aislados de madera aserrada destacando también la cepa de *Bacillus* spp. SS; se aprecia dicha acción represora en la figura 10 donde el crecimiento micelial de *T. reesei* fue de 2.72 cm en su control con 7.48 cm; en las

demás cepas de *Trichoderma* sp. el crecimiento micelial fue entre 1.78 y 3.46 cm mientras que el crecimiento micelial de su control fue entre 9.02 y 9.2 cm valores con diferencia estadística significativa (Cuadro 3). Se sugiere que el efecto antagónico observado por las cepas de *Bacillus* spp. se debe a que las bacterias de este género muestran efecto inhibitorio sobre el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos (Lehman *et al.*, 2003) produciendo varios tipos de metabolitos con efecto antifúngico y sideróforos que facilitan el mecanismo de competencia por el hierro con los microorganismos fitopatógenos (Leclère *et al.*, 2005). Los datos en la literatura muestran que las bacterias del género *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus* pueden inhibir el crecimiento de hongos contaminantes de madera (Feio *et al.*, 2004).

Cuadro 3. Inhibición del crecimiento micelial (cm) de aislados fúngicos de madera aserrada *Pinus* spp. por las cepas SS, BS-MIA02 y BM2 de *Bacillus* spp.

Aislado fúngico	Tratamiento			
	Control	<i>Bacillus</i> spp. SS	<i>Bacillus</i> spp. BS-MIA02	<i>Bacillus</i> spp. BM2
<i>T. reesei</i> (PP1)	7.48 ± 1.10 ^b	2.72 ± 0.37 ^a	6.22 ± 0.58 ^b	7.04 ± 0.77 ^b
<i>Trichoderma</i> sp. (PP2)	9.2 ± 0.0 ^c	2.5 ± 0.18 ^a	7.26±0.67 ^b	8.32 ± 1.51 ^b ^c
<i>Trichoderma</i> sp. (PP3)	9.2 ± 0.0 ^c	3.46 ± 0.23 ^a	8.4±0.54 ^b	9.2 ± 0.0 ^c
<i>Trichoderma</i> (PP4)	9.2 ± 0.0 ^c	1.78 ± 0.19 ^a	6.96±1.37 ^b	8.14 ± 1.04 ^b ^c
<i>Trichoderma</i> sp. (PP5)	9.02 ± 0.0 ^d	2.28 ± 0.21 ^a	4.66 ± 0.62 ^b	7.8 ± 0.40 ^c

Diferentes letras indican diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey (P <0.05). Los valores son las medias ± la desviación estándar.

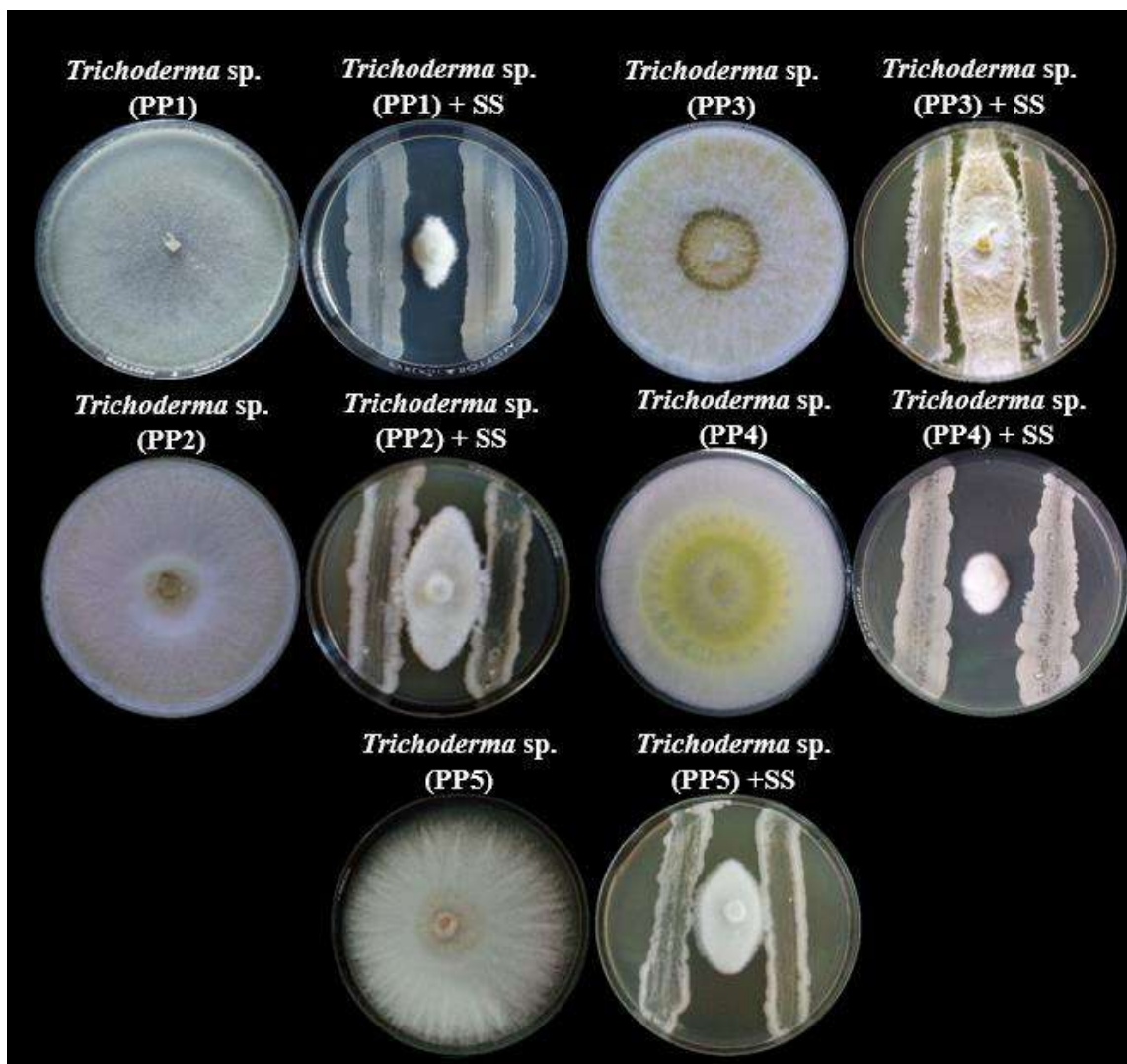


Figura 10. Efecto antagónico de la cepa *Bacillus* spp. SS frente a aislados fúngicos de madera aserrada de *Pinus* spp.

Lo anterior sugiere que este efecto inhibitorio se debe a diferentes mecanismos como la producción metabólica de moléculas tóxicas volátiles como la dimetilhexadecilamina, enzimas hidrolíticas como las quitinasas y en especial la liberación de metabolitos de tipo secundario como la fengicina que pueden inhibir el crecimiento de hongos degradadores de madera como *Fusarium* spp. hongo de pudrición blanda, capaz de producir cavidades en la pared celular y *Trichoderma* spp., que puede alterar el aspecto estético de la madera (Feio *et al.*, 2004). Se encontró que algunas cepas del género de *Bacillus* fueron menos efectivas contra

los xilófagos en comparación con otras lo que sugiere este efecto al modo de acción ejercido o al tipo de metabolito antifúngico producido. Por tanto, es necesario diversos estudios para inducir la producción de compuestos por *Bacillus* spp. (Saini, 2012; Ola *et al.*, 2013).

7.5. Evaluación del efecto de los metabolitos de *Bacillus* spp. en madera de *P. pseudostrobis*

Los metabolitos de *Bacillus* spp. SS obtenidos a partir de agua, acetato de etilo y acetona, no mostraron inhibición del crecimiento micelial en *T. versicolor* (Figura 11); Bonmatin *et al.* (2003) reporta que estos solventes presentan la característica de realizar una etérea modificación en la estructura polipeptídica de los metabolitos por *Bacillus* sp. disminuyendo su capacidad antifúngica; sin embargo el extracto metanólico tuvo mayor poder de extracción ya que reveló actividad antifúngica contra *T. versicolor* y los aislados fúngicos.

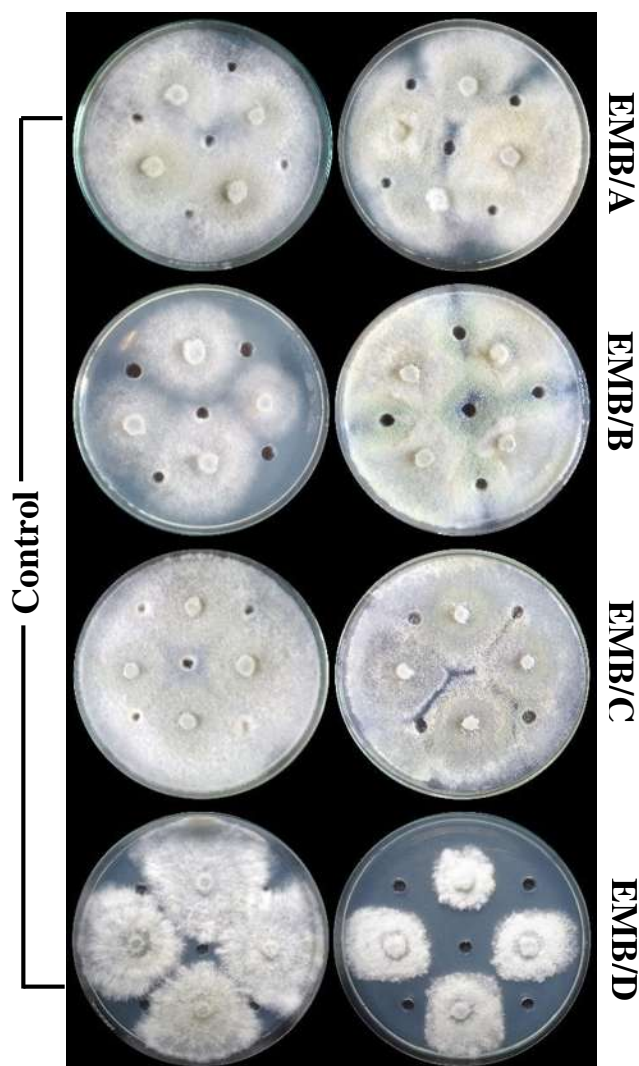


Figura 11. Interacción de *Trametes versicolor* y el extracto bacteriano de *Bacillus* spp. SS con diferentes solventes.

EMB/A= Agua destilada, EMB/B= Acetona, EMB/C= Acetato de etilo y EMB/D= Metanol.

En el cuadro 4 se muestra el efecto de los metabolitos de *Bacillus* spp. SS obtenidos con metanol en hongos aislados de tocones de *Pinus* spp. donde se puede apreciar que inhibieron el crecimiento micelial de la mayoría de los aislados fúngicos valores con diferencia estadística significativa en comparación con su control a excepción de la cepa de *Rhizopus* sp. (MA); sin embargo en un estudio Caldeira *et al.*, (2007) reporta que una cepa de *Rhizopus* sp. L-122 fue sensible al sobrenadante libre de células de *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051. En *F. verticillioides* con el extracto metabólico de *Bacillus* spp. SS el crecimiento fue de 3.01 cm y en su control fue de 3.86 cm al respecto Araiza y Sánchez (2012) reportan el efecto positivo del extracto metabólico de una cepa de *Bacillus subtilis* ya que inhibió a *Fusarium* sp. entre un 70 y 100 % así mismo sugiere que este efecto se debe a que los metabolitos de *Bacillus* spp. interactúan con las moléculas de colesterol interrumpiendo la membrana citoplasmática del hongo, creando canales transmembranales que permiten la liberación de iones vitales como el K⁺. En los hongos del género *Trichoderma* aislados de madera aserrada, los metabolitos de *Bacillus* spp. SS inhibieron a todos los aislados fúngicos resultados con diferencia estadística significativa en comparación con su control como se muestra en el cuadro 5.

Cuadro 4. Inhibición del crecimiento micelial de aislados fúngicos de tocones de *Pinus* spp. por el extracto metabólico de *Bacillus* spp. SS.

Aislado fúngico	Control	Aislado fúngico + extracto metabólico de <i>Bacillus</i> spp. SS
	Crecimiento micelial (cm)	
<i>Trametes versicolor</i>	4.08±0.13*	2.98±0.04
<i>Fusarium verticillioides</i> (MA1)	3.87±0.04*	3.01±0.27
<i>Rhizopus</i> sp. (MA)	3.90±0.01	3.86±0.15
<i>Rhizopus</i> sp (MB)	4.0 ± 0.0*	3.11±0.13
<i>Mucor</i> sp. (MB1)	3.55±0.08*	2.15±0.01
Aislado MF	3.97 ±0.07*	2.50±0.01
<i>Trichoderma</i> (MF2)	3.62±0.25*	3.50±0.10
Aislado MT2	3.95±0.07*	2.65±0.15

* Existen diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey (P <0.05). Los valores son las medias ± la desviación estándar.

Cuadro 5. Inhibición del crecimiento micelial de los aislados fúngicos de madera aserrada de *Pinus* spp. por el extracto metabólico de *Bacillus* spp. SS.

Aislado fúngico	Control	Aislado fúngico + extracto metabólico de <i>Bacillus</i> spp. SS
	Crecimiento micelial (cm)	
<i>Trichoderma resei</i> (PP1)	3.74±0.05*	2.90±0.14
<i>Trichoderma</i> sp. (PP2)	3.80±0.21*	2.80±0.57
<i>Trichoderma</i> sp. (PP3)	3.96±0.02*	3.18±0.18
<i>Trichoderma</i> sp. (PP4)	3.85±0.17*	3.40±0.18
<i>Trichoderma</i> sp. (PP5)	3.87±0.20*	2.75±0.50

* Existen diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey (P <0.05). Los valores son las medias ± la desviación estándar

Trabajos como los reportados por Nayak y Mishra (2012) señalan que solventes como el metanol presentan un alto grado de afinidad con los metabolitos bacterianos, los autores reportan que extractos metanólicos de *Bacillus* sp. fueron efectivos para la obtención de compuestos con actividad antifúngica, exhibiendo la presencia de grupos de nitrógeno correspondientes a péptidos, otros autores señalan que este efecto fungistático se debe a que *Bacillus* spp. produce un interesante perfil de antibióticos de naturaleza lipopeptídica como la surfactina capaz de inhibir el crecimiento de algunas bacterias y virus además de su actividad antifúngica, es un poderoso biosurfactante, y como tal disminuye la tensión superficial, actúa como un excelente detergente, emulsionante y ayuda a la formación de biopelículas; la familia de las iturinas representada por la iturina A, micosubtilinas y baciliomicinas, se destacan por la eficacia contra una amplia variedad de patógenos importantes, como levaduras y algunos son potentes agentes fungicidas; las fengicinas han demostrado un amplio espectro antifúngico que impide el crecimiento de ciertos hongos filamentosos (Volpon *et al.*, 2000; Touré *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2016). En otra publicación, Ariza y Sánchez (2012) consiguieron una extracción de metabolitos de *Bacillus subtilis* mediante metanol, obteniendo un extracto clarificado libre de partículas y restos celulares, con el cual, los resultados revelaron mediante identificación por cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas la presencia de Iturina A, donde además definieron que el extracto inhibió el crecimiento de *Fusarium* spp.

En la figura 12A se muestra el crecimiento de los hongos aislados de tocones de *Pinus* spp. sobre madera impregnada con el extracto metabólico de *Bacillus* spp. SS y en ausencia del mismo donde se puede apreciar que *T. versicolor* tuvo un crecimiento micelial de 4.26 cm mientras que en la madera sin el extracto metabólico el crecimiento micelial fue de 9.02 cm; en *Mucor* sp el crecimiento micelial en la madera trata fue de 2.54 cm y en la madera no tratada fue de 8.94 cm estos valores con diferencia estadística significativa; en cuanto a la cepa de *F. verticillioides* el crecimiento micelial fue de 8.8 cm y el crecimiento micelial del mismo en la madera sin el extracto metabólico fue de 8.9 cm estos valores no mostraron diferencia

estadística significativa sin embargo en la figura 12B se puede apreciar que *F. verticillioides* no colonizó a la madera, también se observa que cuando los hongos xilófagos crecieron en madera sin tratar (tratamiento madera-hongo), el desarrollo fúngico se extendió y cubrió a la madera; mientras que en la madera tratada con los metabolitos de *Bacillus* spp. SS, hubo una inhibición en el desarrollo de los hongos inclusive en la mayoría de los casos no creció sobre la madera, lo que indica su capacidad de los metabolitos de *Bacillus* spp. SS como agente protector de la madera. Autores como Reddy, (1997) reporta que en la industria forestal especies de hongos pertenecientes a los géneros *Fusarium*, ocasionan grandes pérdidas económicas por lo que emplean bacterias como control biológico suprimiendo estos hongos en coníferas. La colonización microbiana de la de madera está definida por la microflora, específica para cada especie y algunos patógenos fúngicos viven únicamente de algunas especies de madera, un ejemplo de ello es *Rhizopus oryzae* especie dominante en madera de *Pinus* spp. y *Betula pendula*, mientras que representantes de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium* comunes en los complejos de micromicetos en la superficie de *Pinus* spp. (Melentjev *et al.*, 2006). Por otra parte, Susi *et al.*, (2011) menciona que las bacterias y/o sus compuestos tienen ciertas ventajas sobre los productos químicos tóxicos en la protección de la madera ya que se requieren de cantidades mínimas para ser aplicados sobre el material para estar protegido.

A diferencia de los hongos antagonistas, las bacterias no afectan significativamente la apariencia de la madera y, en este sentido, son la elección preferida como antagonistas. Las bacterias inician el proceso de colonización rápidamente y pueden extenderse fácilmente a través de la superficie de la madera. También pueden tolerar varias condiciones de crecimiento y tratamiento químico de la madera, se cultivan fácilmente y producen en grandes cantidades para el control biológico; sin embargo, sus compuestos antagónicos deben colonizar la superficie y los compartimientos interiores de la madera para prevenir de una forma más eficiente la contaminación por hongos xilófagos.

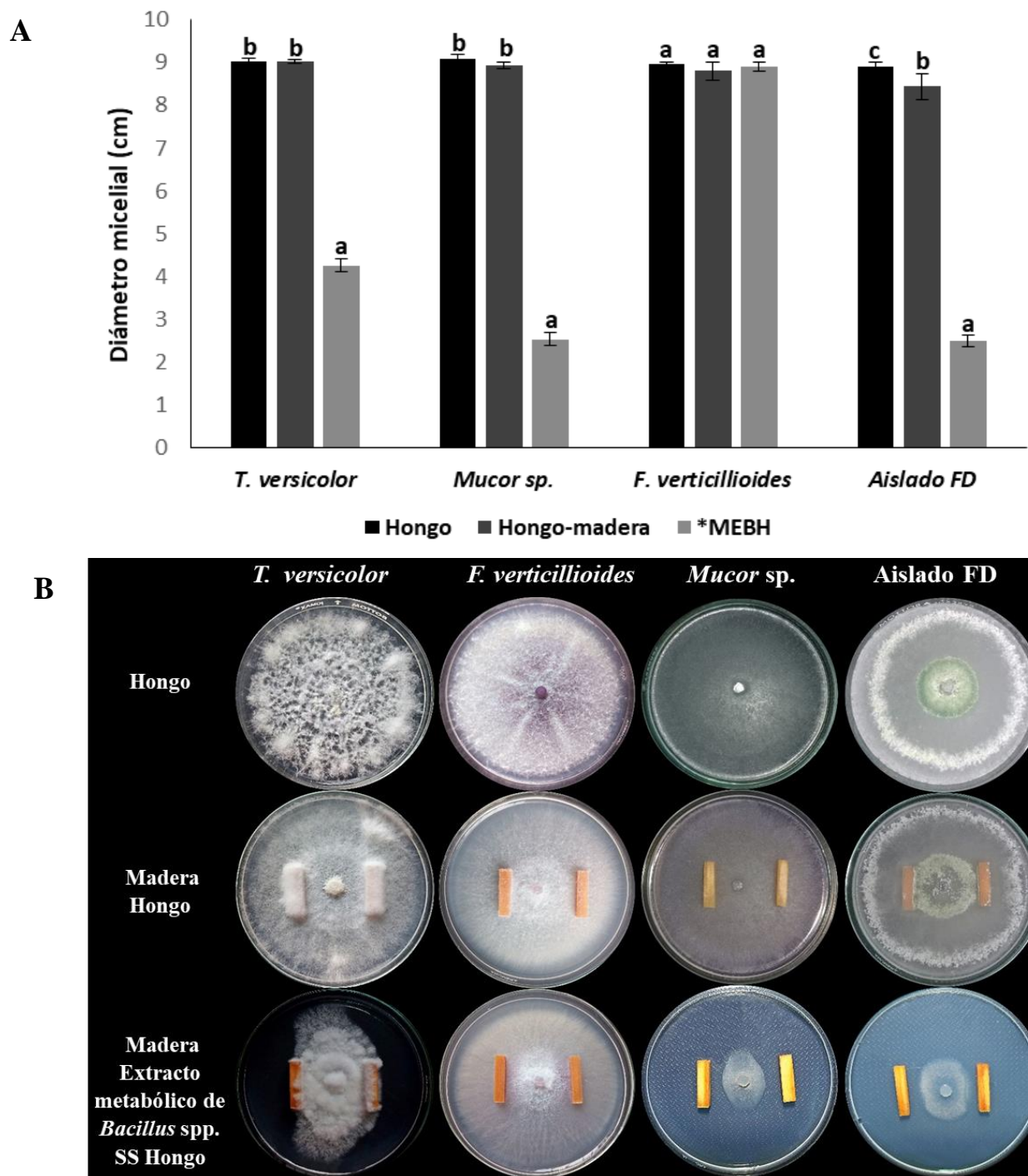


Figura 12. Diámetro del crecimiento micelial de los hongos aislados de tocones de *Pinus spp.* a diferentes tratamientos.

En la figura 13A se muestra que los metabolitos de *Bacillus* spp. SS impregnados en la madera de *P. pseudostrobus* expuesta a los hongos aislados de madera aserrada tuvieron el mismo efecto inhibitorio que sobre los hongos aislados de tocones, la cepa que mostró mayor crecimiento micelial fue *Trichoderma* sp. PP3 con un crecimiento micelial de 5.16 cm mientras que en las cepas de *Trichoderma* sp. PP2 y PP5 el crecimiento micelial fue similar de 2.46 y 2.40 cm respectivamente estos valores con diferencia estadística significativa en comparación con el crecimiento micelial de las mismas cepas en madera sin tratar. Lo que sugiere que los metabolitos producidos por *Bacillus* spp poseen actividad contra hongos de diferentes grupos taxonómicos e incluso son capaces de controlar parcialmente una infección en madera. En la figura 13B se puede apreciar dicho efecto de represión en el crecimiento de *Trichoderma* sp. por los metabolitos de *Bacillus* spp. SS, se observa que en la madera tratada los hongos no colonizaron a la madera mientras que en la madera sin tratar el crecimiento de los hongos colonizó a la madera y crecieron en toda la superficie de la caja Petri.

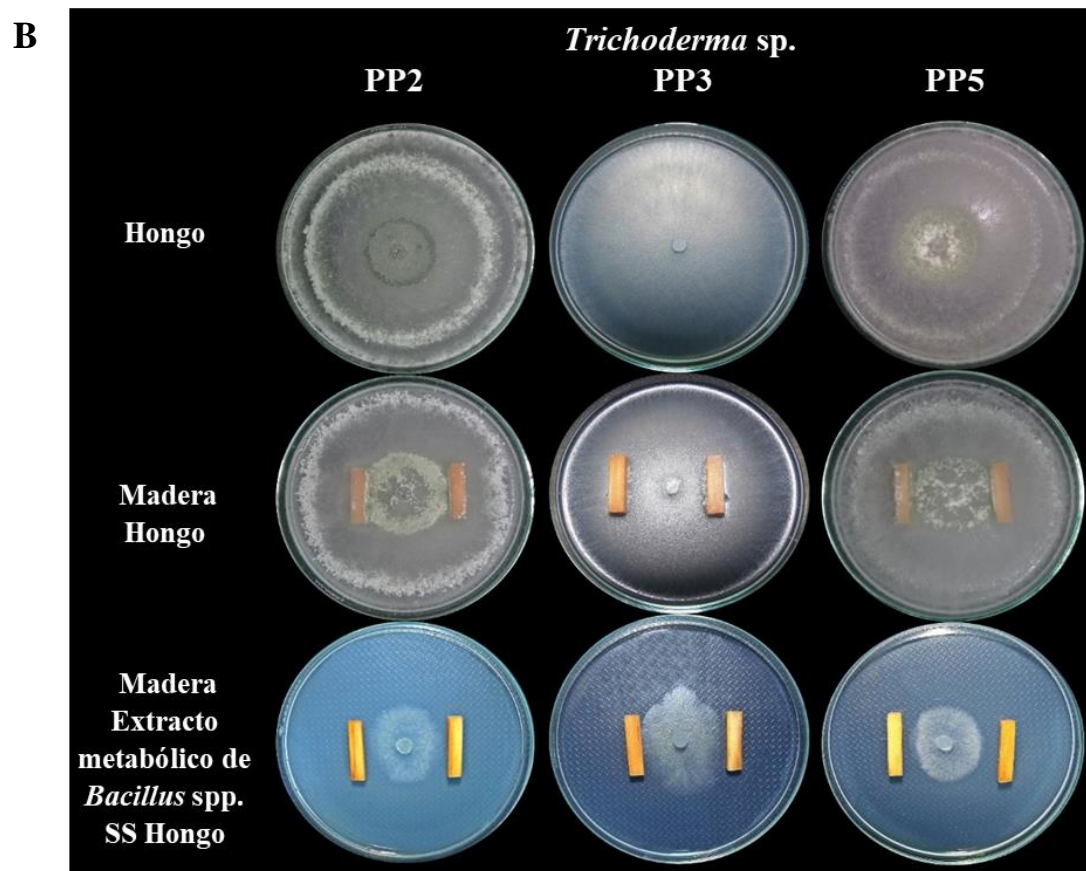
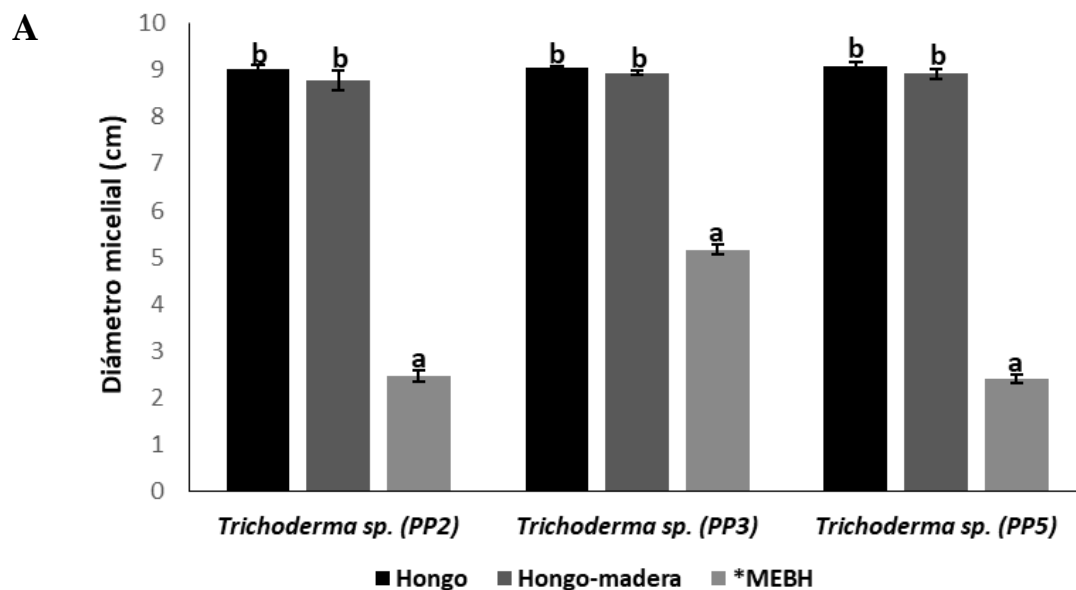


Figura 13. Diámetro del crecimiento micelial de los hongos aislados de madera aserrada de *Pinus* spp. a diferentes tratamientos.

Por tanto, distintos hongos pueden responder a diferentes componentes en la mezcla de metabolitos o la variación en la actividad antifúngica puede reflejar diferencias en los sitios de acción o las habilidades de los hongos para desintoxicar los metabolitos. Los datos en la literatura muestran que las bacterias del género *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Bacillus* pueden inhibir el crecimiento de manchas azules y hongos contaminantes superficiales (Feio *et al.*, 2004).

Algunos compuestos de naturaleza lipopeptídica son conocidos por actuar de manera sinérgica, estudios sugieren la presencia de surfactinas con iturinas (Jourdan *et al.*, 2007), surfactinas con fegicinas (Romero *et al.*, 2007) y fengicinas con iturinas, siendo la membrana fúngica el blanco o diana farmacológica para el ataque antimicrobiano causando la formación de poros y dando como resultado el estrés osmótico inhibiendo así crecimiento y desarrollo del fitopatógeno (Gordillo *et al.*, 2009; Tao *et al.*, 2011).

El porcentaje de colonización de los hongos en la madera tratada y sin tratar se muestra en el cuadro 6, en donde se aprecia que *T. versicolor* reveló ser más resistente a los metabolitos de *Bacillus* spp. SS por que fue el que colonizó en mayor porcentaje a la madera con 55.95 % mientras que en la madera sin tratar el porcentaje de colonización fue del 100 %. Los demás aislados fúngicos no lograron colonizar a la madera tratada por lo que se sugiere que los metabolitos de *Bacillus* spp. están ejerciendo algún tipo de control sobre los hongos xilófagos. Robinson, (2009) establece que el análisis de color de las superficies de madera colonizada requiere de método no subjetivo, repetible, para determinar el porcentaje de pigmentación en la superficie de la madera, lo que le permite un procedimiento más rápido, menos subjetivo, y fácilmente repetible que es superior a la simple percepción visual humana.

Cuadro 6. Porcentaje de colonización de hongos xilófagos en madera de *P. pseudostrobus*.

Aislado fúngico	Madera sin tratar (%)	Madera tratada con los metabolitos de <i>Bacillus</i> spp. SS (%)
<i>T. versicolor</i>	100	55.95
<i>F. verticillioides</i>	100	1.34
<i>Mucor</i> sp.	100	0
<i>Trichoderma</i> sp. (PP2)	100	0
<i>Trichoderma</i> sp. (PP3)	100	0
<i>Trichoderma</i> sp. (PP5)	100	0
Aislado FD	100	0

La preocupación pública y las nuevas regulaciones ambientales sobre el uso de productos químicos han creado la necesidad del desarrollo y el uso de métodos alternativos como es el empleo de bacterias del género *Bacillus* y/o de sus metabolitos que son una de las formas más prometedoras para la protección en madera. Por otro lado, cabe destacar que no existen normas que permitan determinar la eficacia de los sistemas y productos de nueva generación por tanto es importante decir que para un uso generalizado aún hacen falta importantes estudios por ejemplo relacionados con el modo de empleo, concentración o perdurabilidad de estos potencialmente inhibidores de hongos xilófagos.

Así mismo esta investigación muestra la liberación de enzimas por hongos xilófagos que degradan el complejo lignocelulósico lo que permite ampliar el conocimiento de la interacción entre las enzimas involucradas y como podrían alterar la composición de la madera.

8. Conclusiones

- Las condiciones ecológicas favorecieron la colecta de los hongos xilófagos que corresponden a los géneros: *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus* *Trichoderma*.
- Todas las cepas bacterianas evaluadas mostraron tener actividad antifúngica contra los aislados fúngicos.
- La utilización de bacterias del género *Bacillus* y/o sus metabolitos en la protección de la madera al ataque de hongos xilófagos es eficaz, lo que representa una alternativa de tratamiento a los productos químicos convencionales, pero aun hacen falta estudios para su aplicación en campo por lo que este trabajo sienta las bases para futuras investigaciones.

9. Recomendaciones

- Identificar los metabolitos producidos por *Bacillus* spp.
- Establecer el modo de aplicación de los metabolitos de *Bacillus* spp. en la madera.
- Realizar estudios de concentración y perdurabilidad de los metabolitos de *Bacillus* spp. en madera.

10. Bibliografía

- A'Bear, A. D., Jones, T. H., Kandeler, E., & Boddy, L. (2014). Interactive effects of temperature and soil moisture on fungal-mediated wood decomposition and extracellular enzyme activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 70, 151-158.
- Ariza, Y., & Sánchez, L. (2012). Determination of secondary metabolites from *Bacillus subtilis* with effect biological control on *Fusarium* sp. *Nova*, 10(18), 149-155.
- Ávila C. L. E. A. (2008). Técnicas de determinación de retención y penetración en la Madera, notas. Facultad de Ingeniería en Tecnología.
- Bonmatin, J. M., Laprévotte, O., & Peypoux, F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, 6(6), 541-556.
- Breuil, C., & Saddler, J. N. (1985). Comparison of the 3, 5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity. *Enzyme and microbial technology*, 7(7), 327-332.
- Caldeira, A. T., Feio, S. S., Arteiro, J. S., & Roseiro, J. C. (2007). *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051 in vitro activity against wood contaminant fungi. *Annals of microbiology*, 57(1), 29-33.
- Calderón, O.M.A., Mendoza, M.R.A., López, G.R., Santoyo, G., Flores, G.A., Martínez-Pacheco, M.M. (2011). Scrutiny for a disaccharide oxydoreduc Tase from filamentous extracellular pathogens. *Afr J Microbiol Res* 5:3487-92.
- Carrillo-Parra, Artemio & Garza-Ocañas, Fortunato, González-Rodríguez, Foroughbakhch, Rähim & Bustamante-García, Veronica. (2014). Tecnologías para la preservación de la madera y evaluación de la durabilidad. 122-141.
- Castillo Morales, I., & Bárcenas Pazos, C. (1998). Pentaclorofenol: toxicología y riesgos para el ambiente. *Madera y Bosques*, 4(2).

- Cavaglieri, L., Orlando, J. R. M. I., Rodriguez, M. I., Chulze, S., & Etcheverry, M. (2005). Biocontrol of *Bacillus subtilis* against *Fusarium verticillioides* *in vitro* and at the maize root level. *Research in Microbiology*, 156(5-6), 748-754.
- Chaparro, D. F., Rosas, D. C., & Varela, A. (2009). Aislamiento y evaluación de la actividad enzimática de hongos descomponedores de madera (Quindío, Colombia). *Revista Iberoamericana de Micología*. 26:238-243.
- Conafor (Comisión Nacional Forestal). (2006). *Pinus pseudostrobus* http://www.conafor.gob.mx/programas_nacionales_forestales/pronare/Fichas%20Tecnicas/Pinus%20pseudostrobus.pdf.
- Crawford, D. M., De Groot, R. C., Watkins, J. B., & Greaves, H. (2000). Treatability of US wood species with pigment-emulsified creosote. *Forest products journal*, 50(1), 29.
- Crowther, T. W., Thomas, S. M., Maynard, D. S., Baldrian, P., Covey, K., Frey, S. D., & Bradford, M. A. (2015). Biotic interactions mediate soil microbial feedbacks to climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), 7033-7038.
- Cruz de León, J. (2010). Manual para la protección contra el deterioro de la madera (No. F/674.386 C7).
- Decker, P., Cohen, B., Butala, J. H., & Gordon, T. (2002). Exposure to wood dust and heavy metals in workers using CCA pressure-treated wood. *AIHA Journal*, 63(2), 166-171.
- Dimkić, I., Stanković, S., Nišavić, M., Petković, M., Ristivojević, P., Fira, D., & Berić, T. (2017). The profile and antimicrobial activity of bacillus lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Frontiers in microbiology*, 8, 925.
- Drenou C. La poda de los árboles ornamentales. (2000). Ediciones Mundi Prensa.

- Encinas, O., Mohali, S., Mora, N., & Villarreal, N. (2002). Microorganismos frecuentemente hallados en la madera de Pino Caribe bajo riego por aspersión en patios de rolas. *Rev. Forest Vzlana*, 46(1), 9-14.
- Ezziyani, M., Sánchez, C. P., Requena, M. E., Rubio, L., & Castillo, M. E. C. (2004). Biocontrol por *Streptomyces rochei*-Ziyani-, de la podredumbre del pimiento (*Capsicum annuum* L.) causada por *Phytophthora capsici*. In *Anales de Biología* (No. 26, pp. 61-68).
- Feio S., Barbosa A., Cabrita M., Nunes L., Esteves A., Roseiro J.C., Marcelo Curto M. (2004). Antifungal activity of *Bacillus subtilis* 355 against wood-surface contaminant fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 31: 199-203.
- Fernández-Larrea Vega, O. (2001). Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. *Manejo integrado de plagas*, 62(96) ,100.
- Flores, H. J. M., Reyes, J. T. S., & Sánchez, A. R. (2011). Especies promisorias de clima tropical para plantaciones forestales comerciales en Michoacán. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Centro de Investigación Regional Pacífico Centro Campo Experimental. Uruapan, Michoacán. Libro Técnico Núm. 11. ISBN: 978-607-425-647-5
- García, J. M. C. (2015). Utilización de hongos de podredumbre blanca en la producción de pasta de celulosa de alto rendimiento. Tesis doctoral
- Ghose, T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 59(2), 257-268.
- Gómez, M. A. B. (Ed.). (2005). Estrategias adaptativas de plantas del páramo y del bosque altoandino en la cordillera oriental de Colombia. Univ. Nacional de Colombia. pp. 171.
- González-Laredo, R. F., Rosales-Castro, M., Rocha-Guzmán, N. E., Gallegos-Infante, J. A., Moreno-Jiménez, M. R., & Karchesy, J. J. (2015). Wood preservation using natural products. *Madera y Bosques*, 21.

- Gordillo, M. A., Navarro, A. R., Benitez, L. M., De Plaza, I. T., & Maldonado, M. C. (2009). Preliminary study and improve the production of metabolites with antifungal activity by a *Bacillus* sp strain IBA 33. *Microbiology Insights*, 2, 15.
- Guillén, F., Martínez, M. J., Gutiérrez, A., & Del Rio, J. C. (2005). Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 8, 195-204.
- Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Hernández-Rodríguez, A. (2007). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(1), 66-74.
- Hu, Q. P., Xu, J. G., Song, P., Song, J. N., & Chen, W. L. (2008). Isolation and identification of a potential biocontrol agent *Bacillus subtilis* QM3 from Qinghai yak dung in China. *World journal of microbiology and biotechnology*, 24(11), 2451-2458.
- Humphrey, D. G. (2002). The chemistry of chromated copper arsenate wood preservatives. *Reviews in inorganic chemistry*, 22(1), 1-40.
- Image Processing and Analysis in Java ImageJ disponible en línea: <https://imagej.nih.gov/ij/>.
- Jankowiak, R., Bilański, P., Chyrzyński, Ł., & Strzałka, B. (2018). Identification of sapstain fungi from Scots pine pallets and assessment of their staining ability. *European Journal of Plant Pathology*, 150(2), 307-322.
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommès, J., Barthelemy, J. P., Thonart, P., & Ongena, M. A. R. C. (2009). Insights into the defense-related events occurring in plant cells following perception of surfactin-type lipopeptide from *Bacillus subtilis*. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(4), 456-468.
- LANGEBIO, Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, (2011). Recuperado de: <http://www.langebiodiv.mx>.

- Layton, C., Maldonado, E., Monroy, L., Corrales, L. & Sánchez, L. (2011). *Bacillus* spp., perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. Nova-Publicación Científica en Ciencias Biomédicas, 9(15), 177-187.
- Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J. S., Wathelet, B., Ongena, M., ... & Jacques, P. (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Applied and environmental microbiology, 71(8), 4577-4584.
- Lehman, L. J., McCoy, R. J., Messenger, B. J., Manker, D. C., Orjala, J. E., Lindhard, D., & Jimenez, D. R. (2003). U.S. Patent No. 6,635,245. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Li, Y., Gu, Y., Li, J., Xu, M., Wei, Q., & Wang, Y. (2015). Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. Frontiers in microbiology, 6, 883.
- Mai, C., Kües, U., & Militz, H. (2004). Biotechnology in the wood industry. Applied Microbiology and Biotechnology, 63(5), 477-494.
- Mandels, M. A. R. Y. (1975). Microbial sources of cellulase. In Biotechnology and bioengineering symposium (No. 5, pp. 81-105).
- Mejía-Bautista, M. Á., Reyes-Ramírez, A., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J. M., Borges-Gómez, L. D. C., & Pacheco-Aguilar, J. R. (2016). *Bacillus* spp. en el Control de la Marchitez Causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense*. Revista mexicana de fitopatología, 34(3), 208-222.
- Melentev, A. I., Helisto, P., Kuz'mina, L. Y., Galimzyanova, N. F., Aktuganov, G. E., & Korpela, T. (2006). Use of antagonistic bacilli for biocontrol of fungi degrading fresh wood. Applied Biochemistry and Microbiology, 42(1), 62-66.
- Mitidieri, I. D. (1988). Control biológico de hongos del suelo con *Trichoderma* sp." *in vitro*". IDIA-Informativo de investigaciones agrícolas (Argentina).(May-Ago 1986).(. (449-452), 45-49.

- Mizumoto, S., Hirai, M., & Shoda, M. (2006). Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(5), 869.
- Nayak, S.K., Mishra, B.B. (2012). Antimicrobial activity of *Bacillus* sp. metabolites extracted in polarity gradient based solvent system against *T. mentagrophytes*, a dermatophyte. *The Ecoscan*, 6 (1&2): 57-60.
- Nazareno M, Martínez M, Cabello M, Arambarri A. (2002). Screening for ligninolytic enzymes in autochthonous fungal strains from Argentina isolated from different substrata. *Rev Iberoam Micol.* 19:181–5.
- Ola, A. R., Thomy, D., Lai, D., Brötz-Oesterhelt, H., & Proksch, P. (2013). Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*. *Journal of natural products*, 76(11), 2094-2099.
- Orozco-Mosqueda, M., Valencia-Cantero, E., López-Albarrán, P., Martínez-Pacheco, M., & Velázquez-Becerra, C. (2015). La bacteria *Arthrobacter agilis* UMCV2 y diversas aminos inhiben el crecimiento *in vitro* de hongos destructores de madera. *Revista argentina de microbiología*, 47(3), 219-228.
- Peylo, A., & Willeitner, H. (2001). Assessment of borates as wood preservatives. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 58(6), 476-482.
- Quintero Díaz, J. C. (2011). Revisión: degradación de plaguicidas mediante hongos de la pudrición blanca de la madera. *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 64(1).
- Raeder, U., & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1(1), 17-20.
- Ramírez, L. A. G., Bran, J. A. P., & Uribe, M. A. (2012). Evaluación *in vitro* de celulasas producidas por cepas nativas de *Trichoderma reesei*, *Cladosporium herbarum* y *Aspergillus niger*. *Journal of Agriculture and Animal Sciences*, 1(1).

- Reddy, M. S. (1997). Status on commercial development of *Burkholderia cepacia* for biological control of fungal pathogens and growth enhancement of conifer seedlings for a global market. United States Department of Agriculture Forest Service General Technical Report PNW, 235-244.
- Reinoso Pozo, Y., Vaillant Flores, D., Casadesús Romero, L., García Pérez, E., & Pazos Álvarez-Rivera, V. (2007). Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. *Fitosanidad*, 11(1).
- Reyes Ramírez, A., Ruiz Sánchez, E., Yam Chimal, C., & Dzul Chan, M. (2012). Selección de *Bacillus* spp. con actividad antagónica *in vitro* contra *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en diferentes medios de cultivo. *Fitosanidad*, 15(2), 117-121.
- Robinson S. C. 2009 A. Method for Digital Color Analysis of Spalted Wood Using Scion Image Software. 2. (en línea). Disponible en <http://www.mdpi.com/1996-1944/2/1/62/htm>.
- Rodríguez A, Xoconostle B, Váldez M (2004) Ecología Molecular de Hongos Ectomicorrízicos. *Revista Fitotecnia Mexicana* 3:267-278.
- Rodríguez Barreal, J. A. (1998). Patología de la madera. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes, Madrid (España).
- Romero, D., de Vicente, A., Rakotoaly, R. H., Dufour, S. E., Veening, J. W., Arrebola, E., & Pérez-García, A. (2007). The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(4), 430-440.
- Saini, P. (2012). Preliminary screening for plant disease suppression by plant growth promoting rhizobacteria. *Sci Res Rep*, 2, 246-250.
- Sarti, G. C., & Miyazaki, S. S. (2013). Actividad antifúngica de extractos crudos de *Bacillus subtilis* contra fitopatógenos de soja (*Glycine max*) y efecto de su coinoculación con *Bradyrhizobium japonicum*. *Agrociencia*, 47(4), 373-383.

- Scharf, D. H., Heinekamp, T., & Brakhage, A. A. (2014). Human and plant fungal pathogens: the role of secondary metabolites. *PLoS pathogens*, 10(1), e1003859.
- Schmidt, O. (2007). Indoor wood-decay basidiomycetes: damage, causal fungi, physiology, identification and characterization, prevention and control. *Mycological Progress*, 6(4), 261.
- Sigoillot, C., Lomascolo, A., Record, E., Robert, J. L., Asther, M., & Sigoillot, J. C. (2002). Lignocellulolytic and hemicellulolytic system of *Pycnoporus cinnabarinus*: isolation and characterization of a cellobiose dehydrogenase and a new xylanase. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(6), 876-883.
- Silva, J. A. (2008). Fichas técnicas sobre características tecnológicas y usos de maderas comercializadas en México. Coordinación, Educación y Desarrollo Tecnológico. Conafor. 62p.
- Susi, P., Aktuganov, G., Himanen, J., & Korpela, T. (2011). Biological control of wood decay against fungal infection. *Journal of environmental management*, 92(7), 1681-1689.
- Tao, Y., Bie, X. M., Lv, F. X., Zhao, H. Z., & Lu, Z. X. (2011). Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer*. *The Journal of Microbiology*, 49(1), 146-150. <https://doi.org/10.1007/s12275-011-0171-9>.
- Tapia, C. P., Velásquez, J. C., & Hernandez, D. B. (2014). Durabilidad natural y descripción anatómica de la madera de la especie *Caryodaphnopsis cogolloi* Van der Werf. *Colombia Forestal*, 17(1), 25-39.
- Torres, M. J., Brandan, C. P., Sabaté, D. C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., & Audisio, M. C. (2017). Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. *Biological Control*. 105, 93-99.

- Torres, M.J., Pérez Brandán, C., Petroselli, G., Erra-Balsells, R., Audisio, M.C., (2016). Antagonistic effects of *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* and *B. amyloliquefaciens* against *Macrophomina phaseolina*: SEM study of fungal changes and UV-MALDITOF MS analysis of their bioactive compounds. *Microbiol. Res.* 182, 31–39.
- Touré, Y., Ongena, M. A. R. C., Jacques, P., Guiro, A., & Thonart, P. (2004). Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of applied microbiology*, 96(5), 1151-1160.
- Valenzuela, E., & Barrera, S. (2001). Determinación taxonómica y enzimática cualitativa de hongos en aserrín de *Pinus radiata* en diversas condiciones naturales. *Boletín Micológico*, 16.
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & de los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1).
- Volpon, L., Besson, F., & Lancelin, J. M. (2000). NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A2. *FEBS letters*, 485(1), 76-80.
- Whipps, J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of experimental Botany*, 52(suppl_1), 487-511.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. L. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.
- Winandy, J. E., & Rowell, R. M. (2005). 11 Chemistry of Wood Strength. *Handbook of wood chemistry and wood composites*, 303.

- Yesid, A. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 10: 149-155.
- Zanni, E. (2008). Patología de la madera: degradación y rehabilitación de estructuras de madera. Editorial Brujas. Argentina.
- Zhang, L., Wang, Z. X., Wang, Y., & Huang, B. (2017). Transcriptomic profile of lignocellulose degradation from *Trametes versicolor* on poplar wood. *BioResources*, 12(2), 2507-2527.
- Zhang, X., Zhao, G., Li, D., Li, S., & Hong, Q. (2014). Identification and evaluation of strain B37 of *Bacillus subtilis* antagonistic to sapstain fungi on poplar wood. *The Scientific World Journal*.

11. Anexos

11.1. Conteo de esporas

Se agregaron 6 mL de agua tridestilada a cada caja Petri donde creció el aislado fungico con la espátula se frota débilmente la superficie de la placa para obtener la mayor cantidad de esporas, se colectaron en viales de 1.5 mL, se agitaron y se centrifugaron a 10 000 r.p.m. durante 5 minutos para eliminar restos del medio de cultivo que pudieran arrastrarse, se afora a 1 mL y se realizan diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000 para el conteo de esporas el cual se hizo por cuadrantes con la cámara de Neubauer para determinar la concentración de 5×10^5 esporas / mL de cada aislado fúngico. Se tomaron 10 uL de la dilución 1:100 y se coloca en la cámara superior y 10 uL en la cámara inferior de Neubauer y por capilaridad las esporas de los hongos se distribuyen, después se fijó la cámara de recuento en la platina del microscopio para realizar la observación microscópica, el enfoque del microscopio se empieza con el objetivo 4X hasta llegar a 40X donde se contaron las esporas en cinco campos. Para obtener la cantidad de esporas por mL, se utilizó la siguiente formula: $(\text{Dilución}) (\text{Número de esporas}) (\text{Número de campos}) / (1 \times 10^{-6} \text{ mL}) = \text{esporas} / \text{mL}$.

11.2. Cuantificación de azúcares reductores por el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico

Se enumeraron los tubos del 1 al 10 tomando en cuenta el blanco y se preparó una solución stock de glucosa pesando 5 mg/mL diluida en 10 mL de agua desionizada. Se colocaron en los tubos las cantidades señaladas como se muestra a continuación:

Concentración de soluciones para construir la curva de calibrado a partir de la solución patrón de glucosa		
Tubo No.	Solución stock (µL)	Agua destilada (µL)
1	0	1000
2	50	950
4	75	925
5	100	900
6	125	875
7	150	850
8	175	825
9	200	800
10	225	775

Posteriormente se colocó 1 mL de solución DNS a cada tubo, se homogenizó y se colocaron los tubos en baño maría por 15 minutos. La absorbencia se leyó en el espectrofotómetro a 540 nm y finalmente se realizó una curva de calibración donde se graficó la concentración de la glucosa vs la absorbencia.

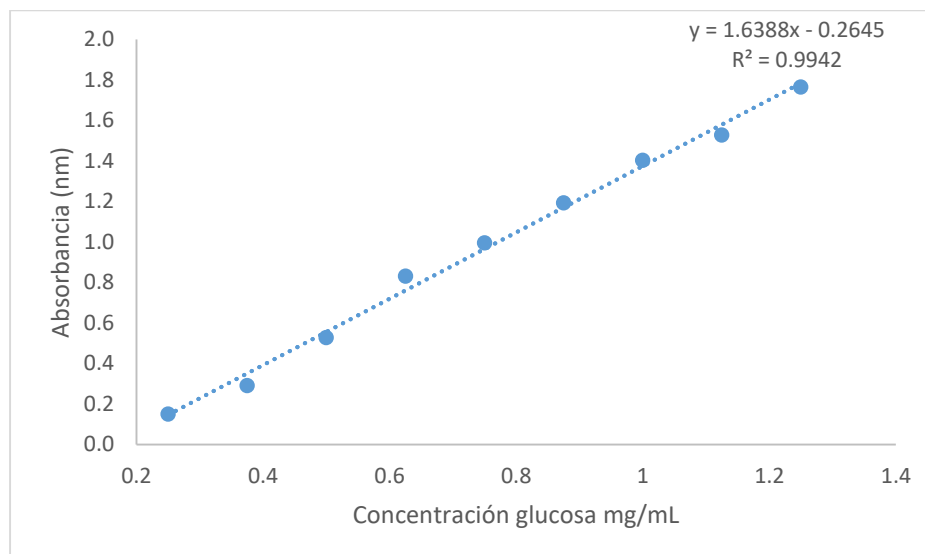


Figura 1. Curva para cuantificar azúcares reductores

11.3. Determinación de proteína

El contenido de proteína extracelular de los aislados fúngicos se determinó con el método descrito por Lowry *et al.*, 1951, para el cual se utilizó las siguientes disoluciones:

A: Na₂CO₃ al 3 % en NaOH 0.2 M en agua desionizada

B: Citrato de sodio al 4 % en agua desionizada

C: CuSO₄·5H₂O al 2 % en agua desionizada

Una mezcla de las disoluciones anteriores se preparó en una proporción de 1:1:48 (v/v) de B:C:A con el siguiente orden de adición:

Para tal caso se obtuvo una curva estándar de proteína en donde la pendiente de la curva se utilizó para determinar el contenido de proteína de la muestra problema. La Albúmina Sérica Bovina (BSA) se utilizó como estándar en concentración de 5 mg/ml, la formación de color azul se determinó mediante la absorbancia a 640 nm.

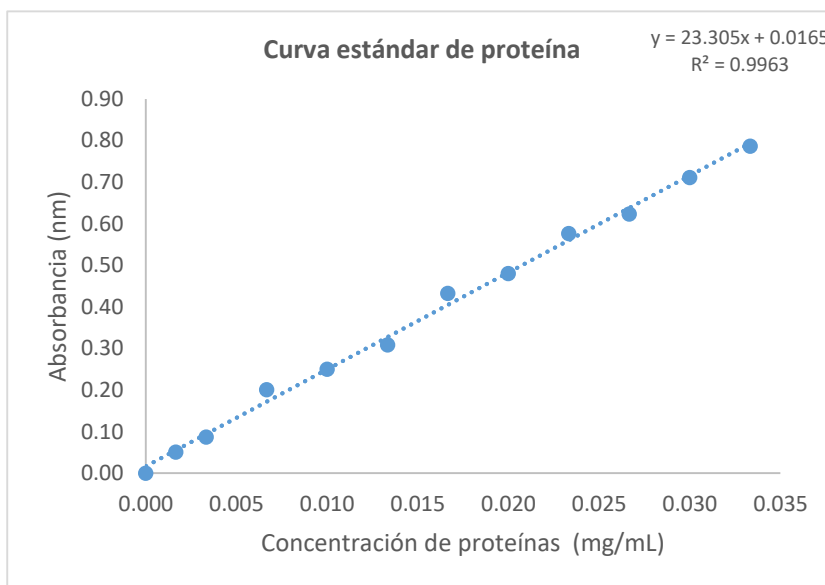


Figura 2. Curva estándar de Albumina de suero bobino (BSA) por el método de Lowry