



REVISTA ARGENTINA DE MICROBIOLOGÍA

www.elsevier.es/ram



ORIGINAL

Identificación y actividad antifúngica de bacterias halófilas aisladas de suelos salinos en Campeche, México

Miguel Á. Guerra-Camacho^a, María C. Magaña-Tzuc^a, Arely A. Vargas-Díaz^{b,*},
Hilda V. Silva-Rojas^c y Marcela Gamboa-Angulo^d

^a Colegio de Postgraduados, Champotón, Campus Campeche, Campeche, México

^b CONAHCYT-Colegio de Postgraduados, Champotón, Campus Campeche, Campeche, México

^c Colegio de Postgraduados, Posgrado en Producción de Semillas, Campus Montecillo, Texcoco, Estado de México, México

^d Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., Mérida, Yucatán, México

Recibido el 19 de junio de 2023; aceptado el 3 de febrero de 2024

PALABRAS CLAVE

Colletotrichum gloeosporioides;
Alternaria alternata;
Bacillus;
Extractos microbianos

Resumen Los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloeosporioides* pueden provocar enfermedades en los tejidos vegetales y pérdidas significativas en la poscosecha. El uso de fungicidas químicos para su control tiene efectos negativos sobre el ambiente y la salud. Los metabolitos secundarios de bacterias halófilas son una alternativa prometedora para obtener nuevos compuestos antifúngicos. En el presente estudio, se aislaron y caracterizaron bacterias halófilas provenientes de dos sitios con suelos salinos, denominados blanquiales, en Campeche, México. En total, se aislaron 64 bacterias; entre los géneros identificados por métodos moleculares, se encontraron *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Inquilinus*, *Gracilbacillus*, *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Paenibacillus*, *Priestia*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* y *Virgibacillus*. Se investigó el potencial antifúngico del sobrenadante de cultivo (SC) de 39 bacterias halófilas contra *C. gloeosporioides* y *A. alternata*. Las bacterias que ejercieron una mayor inhibición del crecimiento micelial (ICM) fueron *Bacillus subtilis* CPO 4.292, *Metabacillus* sp. CPO 4.266, *Bacillus* sp. CPO 4.295 y *Bacillus* sp. CPO 4.279. Asimismo, el SC de *Bacillus* sp. CPO 4.279 fue el que presentó la mayor actividad y su extracto en acetato de etilo (AcOEt) el que más inhibió la germinación de conidios de *C. gloeosporioides*, con valores de inhibición del crecimiento media.

Abreviaturas: SC, sobrenadante de cultivo; CTS, caldo de tripticasa de soja; ICM, inhibición del crecimiento micelial; IGC, inhibición de la germinación de conidios; IC, inhibición del crecimiento; CIM, concentración inhibitoria mínima.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: anayansi.3185@gmail.com (A.A. Vargas-Díaz).

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.02.004>

0325-7541/Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Asociación Argentina de Microbiología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Cómo citar este artículo: M.Á. Guerra-Camacho, M.C. Magaña-Tzuc, A.A. Vargas-Díaz et al., Identificación y actividad antifúngica de bacterias halófilas aisladas de suelos salinos en Campeche, México, Revista Argentina de Microbiología, <https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.02.004>

(IC₅₀) de 8.630 µg/ml e IC₉₀ de 10.720 µg/ml. La partición orgánica del extracto en AcOEt permitió la obtención de tres fracciones, la de acetonitrilo (FACB9) presentó la mayor actividad antifúngica, con un porcentaje de inhibición de la germinación de condios superior al 66%. Se concluye que las bacterias halófilas de suelos blanquiales del género *Bacillus* sp. producen metabolitos con propiedades antifúngicas para inhibir al hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides*. Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Asociación Argentina de Microbiología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

KEYWORDS

Colletotrichum gloeosporioides;
Alternaria alternata;
Bacillus;
Microbial extracts

Identification and antifungal activity of halophilic bacteria isolated from saline soils in Campeche, México

Abstract Phytopathogenic fungi *Alternaria alternata* and *Colletotrichum gloeosporioides* cause diseases in plant tissues as well as significant postharvest losses. The use of chemical fungicides for their control has negative effects on health and the environment. Secondary metabolites from halophilic bacteria are a promising alternative for new antifungal compounds. In the present study, halophilic bacteria were isolated and characterized from two sites with saline soils called branquiales in Campeche, Mexico. A total of 64 bacteria were isolated. *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Inquilinus*, *Gracilibacillus*, *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Paenibacillus*, *Priestia*, *Staphylococcus*, *Streptomyces* and *Virgibacillus* were among the identified genera. The antifungal potential of the culture supernatant (CS) of 39 halophilic bacteria was investigated against *C. gloeosporioides* and *A. alternata*. The bacteria showing the greatest inhibition of mycelial growth corresponded to *Bacillus subtilis* CPO 4292, *Metabacillus* sp. CPO 4266, *Bacillus* sp. CPO 4295 and *Bacillus* sp. CPO 4279. The CS of *Bacillus* sp. CPO 4279 exhibited the highest activity and its ethyl acetate extract (AcOEt) inhibited the germination of *C. gloeosporioides*, with IC₅₀ values of 8,630 µg/ml and IC₉₀ of 10,720 µg/ml. The organic partition of the AcOEt extract led to three fractions, with acetonitrile (FACB9) showing the highest antifungal activity, with values exceeding 66%. Halophilic bacteria from 'blanquiales' soils of the genus *Bacillus* sp. produce metabolites with antifungal properties that inhibit the phytopathogenic fungus *C. gloeosporioides*.

Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Asociación Argentina de Microbiología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La agricultura tropical a nivel mundial se ve afectada por la presencia de enfermedades de origen fúngico, que ocasionan pérdidas durante los ciclos de producción y en la poscosecha¹⁴. Los hongos fitopatógenos *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloeosporioides* producen daños en la poscosecha de varios cultivos, que pueden reducir hasta en un 40% la producción^{13,46}. La principal estrategia de control de estos hongos es mediante el uso de fungicidas de origen químico; no obstante, el empleo excesivo de estos productos ha provocado contaminación ambiental y resistencia de los hongos a los compuestos específicos^{5,29}. Por lo tanto, es importante encontrar nuevas fuentes de compuestos con actividad antifúngica amigables con el ambiente y efectivos contra hongos fitopatógenos resistentes a los productos actuales⁴².

En este sentido, las bacterias halófilas constituyen un grupo diverso de microorganismos caracterizado por habitar en ambientes con altas concentraciones de sales^{30,47}. Se considera que estas bacterias han desarrollado múltiples mecanismos de adaptación para sobrevivir, entre ellos, la producción de metabolitos que funcionan como defensa

frente a organismos competidores, lo que supone una fuente importante de nuevos compuestos antifúngicos^{6,10,38,47}. En este contexto, Sadfi-Zouaoui et al.³⁷ reportaron que las bacterias halófilas *Bacillus*, *Halobacillus*, *Halomonas*, *Marinococcus*, *Planococcus* y *Salinicoccus*, aisladas de lagos salados en Túnez, inhibieron el crecimiento del fitopatógeno *Botrytis cinerea* en un 50 a 91%. A su vez, Elyasi et al.¹⁰ aislaron del desierto de sal de la provincia de Semnan, en el norte de Irán, las bacterias halófilas *Bacillus subtilis* Dar y D6A, con capacidad para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *B. cinerea*. También, se ha reportado la actividad antifúngica de extractos orgánicos provenientes del sobrenadante de cultivo (SC) de bacterias halófilas. Por ejemplo, Nas et al.²⁷ encontraron que los extractos crudos de acetato de etilo (AcOEt) y cloroformo del SC de una cepa halófila de *Bacillus* sp. fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Aspergillus flavus*. Entre los principales compuestos identificados en los extractos con actividad antifúngica se encontraron el 2,4-di-terc-butilfenol, el 1-nonilcicloheptano y el 1,3-di-terc-butilbenceno. De igual forma, Tian et al.⁴⁴ identificaron en el SC del actinomiceto *Nocardioopsis gilva* YIM 90087 p-terfenil, novobiocina y ciclodipeptidos con activi-

dad antifúngica contra los hongos fitopatógenos *Fusarium avenaceum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* y *Pyricularia oryzae*. Esto indica que los compuestos producidos por bacterias halófilas tienen un alto potencial para ser utilizados como antifúngicos.

México posee diversos hábitats hipersalinos, de los cuales solo algunos han sido investigados con respecto a la composición de su comunidad microbiana^{7,12}. En la Reserva de la Biósfera de los Petenes (RBLP), en Campeche, México, existen ciertos ambientes conocidos como blanquizales, que son suelos hipersalinos y calcáreos, en los que se registran altos valores de salinidad y con condiciones mesohalinas en la temporada de lluvias ($27,1 \pm 8,0$ g/l) e hipersalinas en la temporada seca ($47,0 \pm 7,0$ g/l)⁴. Estos ambientes son considerados únicos a nivel internacional, ya que se encuentran ubicados dentro de una planicie costera con sedimentación palustre, adyacente al mar, en la que existen tres distintas geoformas de origen: litoral, palustre y kárstico²². A pesar de ello, no hay reportes de la diversidad microbiana existente y el potencial de sus bacterias halófilas para producir metabolitos secundarios con actividad antifúngica contra *A. alternata* y *C. gloeosporioides*. El presente estudio tiene por objetivo aislar e identificar molecularmente bacterias halófilas de suelos de la RBLP y determinar su potencial para liberar compuestos antifúngicos.

Materiales y métodos

Sitios de muestreo de los suelos salinos

En mayo de 2019, se colectaron muestras de suelo blanquizal en dos sitios de la RBLP con diferente grado de conservación: el ejido de Tankuché ($20^\circ 15' 40,7''$ N, $90^\circ 28' 31,0''$ W), que se consideró suelo de blanquizal perturbado, y el ejido de Nunkiní ($20^\circ 32' 46,9''$ N, $90^\circ 25' 45,6''$ W), que se consideró suelo de blanquizal conservado (Fig. 1S). En cada sitio se tomaron cinco submuestras de suelo a una profundidad de 30 cm, las cuales se homogenizaron para formar una muestra compuesta representativa de cada sitio (1 kg).

Aislamiento de las bacterias halófilas

El aislamiento de las bacterias halófilas se realizó por diluciones decimales. Para ello, se diluyeron 10 g de suelo salino seco en 90 ml de solución salina estéril al 25% m/v⁷. A partir de esta suspensión, se prepararon diluciones desde 10^{-1} hasta 10^{-5} . Alícuotas de cada dilución (0,1 ml) se esparcieron con una espátula Drigalski de vidrio estéril en placas de Petri con los medios de aislamiento agar tripticasa de soya (TSA)⁴⁰, medio de cultivo agar R2A³ y agar extracto de malta (EM)⁴⁰, suplementados con 0,5 M de cloruro de sodio (NaCl) para favorecer el crecimiento de un mayor número de bacterias halófilas. Los cultivos se incubaron a $28 \pm 3^\circ\text{C}$. Las colonias con diferentes morfologías se aislaron y purificaron por estría por agotamiento.

La capacidad de las cepas bacterianas de tolerar la salinidad se evaluó haciendo crecer cada una de las cepas en medio TSA con diferentes concentraciones de NaCl (0,5; 2 y 3 M)⁴⁰ por un tiempo de incubación máximo de 48 horas. Aquellas bacterias que presentaron crecimiento óptimo en 24 horas a 0,5 M se categorizaron como halotolerantes, las

que crecieron a 2 M como halófilas moderadas y las que desarrollaron a 3 M como halófilas extremas, según el esquema de clasificación propuesto por Kushner²³.

Identificación de las bacterias por secuenciación del gen 16S ARNr

Las cepas bacterianas se identificaron con base en la secuenciación parcial del gen 16S ARNr. El ADN se extrajo con bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 2% m/v, de acuerdo con lo propuesto por Doyle et al.⁸ La integridad del ADN se determinó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% suplementado con GelRed® (Biotium, EE. UU.). La amplificación del fragmento de 1.500 pb se llevó a cabo con los iniciadores universales 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y 1492 R (5'-GTTACCTTGTACGACTT-3')⁹, y con fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3')⁴⁹. La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 15 μl y el programa de amplificación que se aplicó es el descrito por Eden et al.⁹. Los productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de aproximadamente 1.500 pb, se purificaron con EXO-SAP® (Affymetrix, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los amplicones purificados se secuenciaron con los iniciadores 518F (5'-CCAGCAGCCGCGTAATACG-3') y 800R (5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3') en la compañía Macrogen, mediante secuenciación capilar. Las secuencias de ambas hebras de cada cepa se ensamblaron y editaron usando el programa BioEdit versión v7.2.5¹⁶ (Thomas A. Hall, 2013, California, EE. UU.) y se analizaron utilizando el algoritmo BLASTN del software BLAST/NCBI¹ (National Center for Biotechnology Information, 2011, Maryland, EE. UU.) y el Ribosomal Database Project release 11⁵⁰. Se realizó el alineamiento múltiple de secuencias utilizando el programa MAFFT v.7 (Kazutaka Katoh, 2002, Osaka, Japón; <http://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>)²¹. La reconstrucción filogenética de todas las secuencias se realizó con inferencia bayesiana usando el programa Mr. Bayes v3.2³⁵ (Ronquist Fredrik et al., 2012, Uppsala, Suecia) y el modelo de sustitución nucleotídica fue (GTR+G) (por sus siglas en inglés *General Time Reversible* [tiempo reversible general]) con 3.000.000 de generaciones. Para la construcción de los árboles filogenéticos, se incluyeron las cepas *Alkali-lactibacillus ikkensis* GCM68 (NR_132707) y *Halobacterium salinarum* 91-R6 (NR_025555) como fuera de grupo. Los árboles filogenéticos se visualizaron y editaron en FigTree V1.4.4 (Rambaut Andrew, 2016, Edimburgo, Escocia; <https://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Todas las secuencias se depositaron en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI)-GenBank (N.º de acceso MW429711-MW429774).

Evaluación de la actividad antifúngica de las cepas bacterianas halófilas

De las 64 cepas bacterianas aisladas, 25 perdieron su viabilidad. Por lo tanto, solo 39 se reactivaron y cultivaron en 1 ml de caldo de tripticasa de soya (CTS) con 0,5 M de NaCl⁴⁰, a $28^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ por 15 días³³ a 180 rpm³⁴ en agitación orbital. Para obtener el SC, estos se centrifugaron a 6.000 rpm

durante 20 min y se filtraron a través de una membrana estéril (0,22 μm). Para evaluar la actividad antifúngica de las bacterias halófilas, se utilizó el ensayo de difusión en pozo, de acuerdo con la metodología descrita por Elyasi et al.¹⁰. Para ello, en placas de Petri con medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA), se realizaron dos perforaciones de 6 mm de diámetro en los extremos de la placa y en ellas se depositó el SC (70 μl) de cada cepa bacteriana. Finalmente, en el centro de cada placa se colocó un disco invertido de micelio de *A. alternata* JG14 o de *C. gloeosporioides* CGP6. Se incluyó anfotericina B como control positivo, a una concentración de 8 $\mu\text{g/ml}$ para *C. gloeosporioides* y de 4 $\mu\text{g/ml}$ para *A. alternata*. Como control negativo, se utilizó CTS con 0,5 M de NaCl en el pozo y el hongo fitopatógeno. Las placas se incubaron a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ hasta que el micelio de las placas del control negativo alcanzó el borde de los pozos. La actividad antifúngica se expresó mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) empleando la fórmula de Shi et al.³⁹:

$$ICM (\%) = [(R1 - R2) / R1] \times 100$$

donde R1 (mm) es el crecimiento del hongo del control negativo y R2 (mm) es el crecimiento del hongo en presencia del SC de cada cepa bacteriana.

Selección de la cepa bacteriana halófila con mayor actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*

Las cepas bacterianas halófilas más activas se cultivaron nuevamente en 1 ml de CTS con 0,5 M de NaCl por 48 h para obtener un preinóculo²⁰, que luego se transfirió a tubos con 2.500 ml de CTS con 0,5 M de NaCl, ajustado a una concentración de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml²⁰. Las condiciones de incubación fueron $28^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ por 15 días³³, con una agitación orbital a 180 rpm³⁴. El SC se obtuvo como se describió anteriormente. La cepa fitopatógena *A. alternata* no fue capaz de producir una cantidad elevada de conidios, los cuales son necesarios para los ensayos de inhibición de la germinación de conidios (IGC) y la inhibición del crecimiento (IC), por lo que se decidió excluirla en el proceso de selección de la cepa más activa. Por lo tanto, los SC masivos de las cepas con mayor actividad se evaluaron únicamente contra *C. gloeosporioides* mediante los ensayos de IGC, IC e ICM. El porcentaje de ICM se determinó como se describió anteriormente, mediante el método de difusión en pozo.

La IGC se determinó de acuerdo con la descripción de Suwan et al.⁴³, con ligeras modificaciones. El SC de las bacterias se concentró a $2 \times$ por liofilización. La suspensión de conidios del hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides* se preparó con solución salina estéril y se ajustó a una concentración de 2×10^5 conidios/ml con un hemocitómetro. Posteriormente, se depositaron 20 μl del SC concentrado en un tubo de microcentrífuga y se mezclaron con 20 μl de una suspensión de conidios de *C. gloeosporioides*. El tubo fue incubado a $28^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ por 12 horas. Se utilizó como control positivo anfotericina B (8 $\mu\text{g/ml}$), nistatina (6,25 $\mu\text{g/ml}$) y benomil (1000 $\mu\text{g/ml}$), y como control negativo CTS concentrado a $2 \times$. Después de 12 horas, se tomó una alícuota de 10 μl de la mezcla y se determinó el IGC contando aleatoriamente 100 conidios por tratamiento, empleando un

microscopio óptico (Prisma 209, Optika Microscopes, Italia) con aumento de $10 \times$. Se registró el número de conidios germinados; se consideró conidio germinado aquel cuyo tubo germinativo tenía el doble de longitud que el conidio. El porcentaje de IGC se estimó con la fórmula siguiente:

$$IGC (\%) = [(Eg1 - Eg2) / (Eg2)] \times 100$$

donde Eg1 es el número de conidios germinados en el control negativo y Eg2 es el número de conidios germinados en presencia del SC de cada bacteria.

La IC se determinó mediante el método de microdilución, como describen Escalante-Rendiz et al.¹¹, con ligeras modificaciones. El SC de las bacterias se concentró a un cuarto de su volumen ($4 \times$) por liofilización. Luego, se depositó el SC concentrado (50 μl) y el medio sintético RPMI-1640 (50 μl) en una microplaca de 96 pozos. Finalmente, se transfirieron 100 μl de una suspensión de conidios de *C. gloeosporioides* (1×10^5 conidios/ml). Se utilizó el medio CTS concentrado $4 \times$ como control negativo y como control positivo se emplearon los mismos compuestos que los usados en la determinación de la IGC. Las pruebas se realizaron por triplicado y las placas se incubaron a $28^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ por 96 horas. La IC de *C. gloeosporioides* por el SC se evaluó visualmente usando la escala numérica establecida por el Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico²⁸.

Extracción del SC de la bacteria *Bacillus* sp. CPO 4.279

La bacteria *Bacillus* sp. CPO 4.279 fue cultivada en CTS con 0,5 M de NaCl a $28^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 días³³, en agitación orbital a 180 rpm³⁴, para obtener el SC. La extracción orgánica del SC se realizó mediante una partición líquido-líquido con AcOEt dos veces (2:1, 1.1, v/v). El disolvente se eliminó a presión reducida en un evaporador rotatorio (Ika RV 10 Control, Optika Microscopes, Italia; IKA, Alemania) para obtener el extracto crudo EcB9 (594,80 mg). También se incluyó un blanco de extracción del medio caldo tripticasa libre de la bacteria (EcTS; 102,50 mg).

Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo del SC de *Bacillus* sp. CPO 4.279

Los extractos de AcOEt EcB9 (100 mg) y EcTS (100 mg) se resuspendieron en acetonitrilo (AcN) (10 ml) y se fraccionaron con hexano (Hx) tres veces (2:1, 1:1, 1:1, v/v). El disolvente se eliminó a presión reducida para obtener, a partir del extracto crudo de EcB9, las fracciones de baja polaridad (FHxB9; 4,80 mg) y mediana polaridad (FACB9; 116,90 mg), y un precipitado (FPREB9; 45,80 mg). Las fracciones obtenidas del extracto EcTS fueron FHxTS (0,60 mg), FAcTS (2,80 mg) y FPRETS (32,80 mg), respectivamente³⁶.

Actividad antifúngica del extracto y de las fracciones de *Bacillus* sp. CPO 4.279

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos y de las fracciones se determinó mediante el ensayo de microdilución en caldo, siguiendo la metodología de

Medina-Baizabal et al.²⁶, con modificaciones. Los extractos EcB9 y EcTS se disolvieron en dimetil sulfóxido (DMSO) a una concentración de 40 mg/ml. Posteriormente, se mezclaron con el medio sintético RPMI-1640 y se depositaron en una microplaca de 96 pozos. Se realizaron diluciones seriadas hasta obtener concentraciones finales del extracto de 10.000, 5.000 y 2.500 µg/ml. Finalmente, se depositaron 100 µl de la suspensión de conidios de *C. gloeosporioides* a una concentración final de $2,5 \times 10^4$ conidios/ml. Se utilizaron como controles positivos anfotericina B (8 µg/ml), nistatina (6,25 µg/ml) y benomil (1 mg/ml), y como controles negativos DMSO al 5% con el hongo fitopatógeno y el blanco del extracto EcTS (10.000 µg/ml) más el hongo. Se efectuaron pruebas por triplicado y se incubaron las placas a $28 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 96 horas. La CIM se definió como la concentración más baja en la que no se observó crecimiento visible del hongo después de la incubación.

También se calculó la concentración inhibitoria media y noventa (CI_{50} y CI_{90}) del extracto crudo EcB9 mediante el método de IGC por un análisis Probit con diferentes concentraciones del extracto (8.000, 10.000 y 12.000 µg/ml); los resultados se analizaron utilizando el sistema de análisis estadístico (SAS, Institute Inc., 2004, Carolina del Norte, EE. UU.), versión 9 para Windows³⁶.

La actividad antifúngica de las fracciones obtenidas del extracto EcB9 se determinó mediante el método IGC, utilizando una concentración final de 8.000 µg/ml. Se emplearon tres réplicas por tratamiento y como controles se usaron los descritos anteriormente.

Análisis estadístico

Las medias se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba Tukey de comparación múltiple ($p=0,05$), con el objetivo de encontrar diferencias significativas entre tratamientos. Se empleó el software SAS versión 9 para Windows.

Resultados

Aislamiento e identificación de las bacterias halófilas

Se aislaron en total 64 cepas bacterianas halófilas a partir de suelos salinos de los blanquiales de la RBLP; se obtuvo un mayor número de bacterias ($n=49$) a partir del sitio perturbado en comparación con el sitio conservado ($n=15$) (tabla 1). Asimismo, del total de cepas bacterianas aisladas, un gran porcentaje mostró capacidad de crecer a 3 y 0,5 M de NaCl; por lo tanto, se categorizaron como halófilas extremas (31 cepas, 48%) y halotolerantes (22 cepas, 34%), respectivamente. Solo 11 cepas (17%) se clasificaron como halófilas moderadas al crecer a una concentración 2M de NaCl (tabla 1).

El análisis de secuenciación permitió detectar que las 64 cepas aisladas presentaban una máxima similitud (0,959-1,000) con secuencias previamente reportadas. El género predominante correspondió a *Bacillus* y las especies más frecuentemente encontradas correspondieron a especies aún no descritas, que se nombraron como *Bacillus* sp. (CPO

4.257, CPO 4.277, CPO 4.279, CPO 4.281, CPO 4.282, CPO 4.284, CPO 4.285, CPO 4.287, CPO 4.288, CPO 4.290, CPO 4.293, CPO 4.294, CPO 4.295, CPO 4.300, CPO 4.271, CPO 4.280, CPO 4.296 y CPO 4.298). Dentro de especies ya descritas, predominaron aquellas asignables a *Bacillus stratosphericus* (CPO 4.245, CPO 4.247, CPO 4.248, CPO 4.249, CPO 4.256, CPO 4.259, CPO 4.260, CPO 4.275, CPO 4.255, CPO 4.278 y CPO 4.306) y *B. subtilis* (CPO 4.263, CPO 4.264, CPO 4.268, CPO 4.276, CPO 4.286, CPO 4.291, CPO 4.292, CPO 4.297 y CPO 4.308). Entre las especies menos frecuentes se encontraron *Bacillus licheniformis* (CPO 4.251, CPO 4.274 y CPO 4.302), *Paenibacillus illinoisensis* (CPO 4.253, CPO 4.304 y CPO 4.307), *Bacillus safensis* (CPO 4.258 y CPO 4.262), *Virgibacillus* sp. (CPO 4.270 y CPO 4.272), *Bacillus sinesaloumensis* (CPO 4.265), *Gracilibacillus phocaensis* (CPO 4.269) y *Gracilibacillus* sp. (CPO 4.267). Otras especies identificadas por secuenciación fueron *Neobacillus drentensis* (CPO 4.246, CPO 4.283, CPO 4.261 y CPO 4.303), *Metabacillus* sp. (CPO 4.266 y CPO 4.301) y *Priestia* sp. (CPO 4.250), que fueron recientemente reclasificadas como nuevos géneros^{15,32} (fig. 1). De igual forma, se encontraron otros géneros que se agruparon con bacterias gram positivas, entre las que se cuentan *Streptomyces caeruleatus* (CPO 4.273), *Staphylococcus epidermis* (CPO 4.289) y *Staphylococcus* sp. (CPO 4.299 y CPO 4.305); entre las gram negativas, se detectaron *Inquilinus* sp. (CPO 4.252) y *Agrobacterium pusense* (CPO 4.254) (tabla 1, fig. 2).

Selección de las cepas bacterianas halófilas con mayor actividad antifúngica

Del total de cepas bacterianas halófilas evaluadas (39), el 28% presentó actividad antifúngica contra alguno de los dos hongos fitopatógenos evaluados. El análisis estadístico de la ICM contra *A. alternata* indicó que las cepas con mayor acción antifúngica correspondieron a *Metabacillus* sp. CPO 4.266, *Bacillus* sp. CPO 4.295 y *B. subtilis* CPO 4.292, las que tuvieron un desempeño equivalente al control positivo de anfotericina B (4 µg/ml) ($p \leq 0,05$). Contra *C. gloeosporioides*, fue *B. subtilis* CPO 4.292 el aislamiento que exhibió la mayor actividad antifúngica, con una acción igual a la de la anfotericina B (8 µg/ml). Asimismo, la cepa *Bacillus* sp. CPO 4.279 mostró una actividad antifúngica media contra ambos fitopatógenos (tabla 2).

Las cuatro cepas más activas se cultivaron de nuevo para obtener los SC masivos y se evaluaron nuevamente contra *C. gloeosporioides*, para seleccionar la cepa más activa para el proceso de fraccionamiento. Los resultados indicaron que el SC de *Bacillus* sp. CPO 4.279 presentó la mayor ICM en el ensayo de difusión en pozo, la mayor IGC y la IC en el ensayo en microdilución (tabla 3, Anexo, fig. S2).

Actividad antifúngica del extracto crudo y las fracciones de SC de la cepa *Bacillus* sp. CPO 4.279

El extracto crudo de AcOEt (EcB9) obtenido del SC de *Bacillus* sp. CPO 4.279 presentó una CIM de 10 µg/ml para inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* por el método de microdilución (Anexo, fig. 35). De igual forma, presentó una CI_{50} y CI_{90} de 8,63 µg/ml y 10,72 µg/ml, respectivamente, para inhibir la germinación de conidios de

Tabla 1 Identificación molecular de cepas halófilas aisladas de dos sitios de suelos salinos blanquiales de la Reserva de la Biósfera de los Petenes, México

Sitio	Clave aislado	Medio de aislamiento	Microorganismo identificado	Número de acceso GenBank NCBI	Ribosomal Database project/NCBI	Similitud	Tolerancia NaCl (M)
Sitio A, perturbado Tankuché	CPO 4.281	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	MW429747	<i>Bacillus</i> sp. A3-30; JF900030	0,978	3
	CPO 4.285	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	MW429751	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0,973	0,5
	CPO 4.282	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	MW429748	<i>Bacillus</i> sp. A3-30; JF900030	0,978	0,5
	CPO 4.284	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	MW429750	<i>Bacillus</i> sp. A3-30; JF900030	0,978	0,5
	CPO 4.274	TSA	<i>Bacillus licheniformis</i>	MW429740	<i>B. licheniformis</i> ; YW1257; AF516177	1,000	3
	CPO 4.272	TSA	<i>Virgibacillus</i> sp.	MW429738	<i>Virgibacillus</i> sp. CU42; DQ643161	0,991	2
	CPO 4.270	TSA	<i>Virgibacillus</i> sp.	MW429736	<i>Virgibacillus</i> sp. B1-21; EU435360	0,986	2
	CPO 4.277	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	MW429743	<i>Bacillus</i> sp. RIC12-Oh014; KC535085	0,978	3
	CPO 4.302	TSA	<i>B. licheniformis</i>	MW429768	<i>B. licheniformis</i> ; YW1257; AF516177	1,000	3
	CPO 4.288	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	MW429754	<i>Bacillus</i> sp. MHS002; DQ993324	1,000	0,5
	CPO 4.269	TSA	<i>Gracilibacillus phocaeensis</i>	MW429735	LT934503 <i>G. phocaeensis</i> Marseille P3801 ^T	1,000	3
	CPO 4.297	TSA	<i>Bacillus subtilis</i>	MW429763	<i>B. subtilis</i> ; C-3; AB110598	1,000	3
	CPO 4.260	TSA	<i>Bacillus stratosphericus</i>	MW429726	<i>B. stratosphericus</i> (T); type strain:41KF2a; AJ831841	1,000	0,5
	CPO 4.283	TSA	<i>Neobacillus drementensis</i>	MW429749	AB681783 <i>N. drementensis</i> NBRC	1,000	3
	CPO 4.294	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	MW429760	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0,973	3
	CPO 4.257	EM	<i>Bacillus</i> sp.	MW429723	<i>Bacillus</i> sp. CNJ842 PL04; DQ448790	0,959	2
	CPO 4.254	EM	<i>Agrobacterium pusense</i>	MW429720	FJ969841 <i>A. pusense</i> NRCPB10	1,000	2
	CPO 4.259	EM	<i>B. stratosphericus</i>	MW429725	<i>B. stratosphericus</i> ; DN14.7A9; KP769446	1,000	2
	CPO 4.279	EM	<i>Bacillus</i> sp.	MW429745	<i>Bacillus</i> sp. A3-30; JF900030	0,978	3
	CPO 4.307	EM	<i>Paenibacillus illinoisensis</i>	MW429773	<i>P. illinoisensis</i> (T); JCM 9907; AB073192	0,969	0,5
	CPO 4.276	EM	<i>B. subtilis</i>	MW429742	<i>B. subtilis</i> ; C-3; AB110598	1,000	3
	CPO 4.266	EM	<i>Metabacillus</i> sp.	MW429732	AY998119 <i>Metabacillus niabensis</i> 4T19	1,000	3
	CPO 4.245	EM	<i>B. stratosphericus</i>	MW429711	<i>B. stratosphericus</i> (T); type strain:41KF2a; AJ831841	1,000	3
	CPO 4.308	EM	<i>B. subtilis</i>	MW429774	<i>B. subtilis</i> ; C-3; AB110598	1,000	0,5
	CPO 4.286	EM	<i>B. subtilis</i>	MW429752	<i>B. subtilis</i> ; C-3; AB110598	1,000	0,5
	CPO 4.295	EM	<i>Bacillus</i> sp.	MW429761	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0,973	0,5
	CPO 4.292	EM	<i>B. subtilis</i>	MW429758	<i>B. subtilis</i> ; C-3; AB110598	1,000	3
	CPO 4.261	EM	<i>N. drementensis</i>	MW429727	AB681783 <i>N. drementensis</i> NBRC	1,000	3
	CPO 4.251	EM	<i>B. licheniformis</i>	MW429717	<i>B. licheniformis</i> ; YW1257; AF516177	1,000	0,5
	CPO 4.264	EM	<i>B. subtilis</i>	MW429730	<i>B. subtilis</i> ; C-3; AB110598	1,000	3
CPO 4.252	R2A	<i>Inquilius</i> sp.	MW429718	<i>Inquilius</i> sp. RB35; DQ512800	0,980	0,5	
CPO 4.263	R2A	<i>B. subtilis</i>	MW429729	<i>B. subtilis</i> ; C-3; AB110598	1,000	3	
CPO 4.293	R2A	<i>Bacillus</i> sp.	MW429759	<i>Bacillus</i> sp. RIC12-Oh014; KC535085	0,978	3	
CPO 4.247	R2A	<i>B. stratosphericus</i>	MW429713	<i>B. stratosphericus</i> ; DN14.7A9; KP769446	1,000	3	
CPO 4.300	R2A	<i>Bacillus</i> sp.	MW429766	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0,973	2	

Tabla 1 (continuación)

Sitio	Clave aislado	Medio de aislamiento	Microorganismo identificado	Número de acceso GenBank NCBI	Ribosomal Database project/NCBI	Similitud	Tolerancia NaCl (M)
	CPO 4.265	R2A	<i>Bacillus sinesaloumensis</i>	MW429731	LT671591 <i>B. sinesaloumensis</i> Marseille P3516 ^T	1,000	0,5
	CPO 4.248	R2A	<i>B. stratosphericus</i>	MW429714	<i>B. stratosphericus</i> ; LAMA 927; KC583210	1,000	0,5
	CPO 4.249	R2A	<i>B. stratosphericus</i>	MW429715	<i>B. stratosphericus</i> ; DN14_7A9; KP769446	1,000	3
	CPO 4.289	R2A	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	MW429755	<i>S. epidermidis</i> ; RW35; EU419922	1,000	0,5
	CPO 4.258	R2A	<i>Bacillus safensis</i>	MW429724	AF234854 <i>B. safensis</i> FO-036b	1,000	3
	CPO 4.250	R2A	<i>Priestia</i> sp.	MW429716	MN456843 <i>Priestia megaterium</i> ATCC 12872	0,990	3
	CPO 4.304	R2A	<i>P. illinoisensis</i>	MW429770	<i>P. illinoisensis</i> (T); JCM 9907; AB073192	0,969	0,5
	CPO 4.273	R2A	<i>Streptomyces caeruleatus</i>	MW429739	GQ329712 <i>S. caeruleatus</i> G1MN4.002	0,750	3
	CPO 4.275	R2A	<i>B. stratosphericus</i>	MW429741	NR_042336 <i>B. stratosphericus</i> 41KF2a	1,000	0,5
	CPO 4.287	R2A	<i>Bacillus</i> sp.	MW429753	<i>Bacillus</i> sp. CH2; KC442367	0,973	0,5
	CPO 4.305	R2A	<i>Staphylococcus</i> sp.	MW429771	<i>Staphylococcus</i> sp. NIPHL090904/B4; AY748913	1,000	0,5
	CPO 4.268	R2A	<i>B. subtilis</i>	MW429734	<i>B. subtilis</i> ; C-3; AB110598	1,000	3
	CPO 4.290	R2A	<i>Bacillus</i> sp.	MW429756	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0,973	2
	CPO 4.256	R2A	<i>B. stratosphericus</i>	MW429722	NR_042336 <i>B. stratosphericus</i> 41KF2a	1,000	0,5
Sitio B conservado, Nunkini	CPO 4.301	R2A	<i>Metabacillus</i> sp.	MW429767	AY998119 <i>M. niabensis</i> 4T19	1,000	3
	CPO 4.262	R2A	<i>B. safensis</i>	MW429728	AF234854 <i>B. safensis</i> FO-036b	1,000	3
	CPO 4.299	R2A	<i>Staphylococcus</i> sp.	MW429765	<i>Staphylococcus</i> sp. NIPHL090904/B4; AY748913	1,000	3
	CPO 4.303	R2A	<i>N. drentensis</i>	MW429769	AB681783 <i>N. drentensis</i> NBRC	1,000	3
	CPO 4.246	R2A	<i>N. drentensis</i>	MW429712	AB681783 <i>N. drentensis</i> NBRC	1,000	3
	CPO 4.296	R2A	<i>Bacillus</i> sp.	MW429762	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0,973	3
	CPO 4.253	EM	<i>P. illinoisensis</i>	MW429719	<i>P. illinoisensis</i> (T); JCM 9907; AB073192	0,969	0,5
	CPO 4.298	EM	<i>Bacillus</i> sp.	MW429764	<i>Bacillus</i> sp. 1324(2012); JN645973	0,973	0,5
	CPO 4.278	EM	<i>B. stratosphericus</i>	MW429744	NR_042336 <i>B. stratosphericus</i> 41KF2a	1,000	2
	CPO 4.267	TSA	<i>Gracilibacillus</i> sp.	MW429733	<i>Gracilibacillus</i> sp. BH235; AY762980	1,000	2
	CPO 4.255	TSA	<i>B. stratosphericus</i>	MW429721	<i>B. stratosphericus</i> (T); type strain:41KF2a; AJ831841	1,000	3
	CPO 4.306	TSA	<i>B. stratosphericus</i>	MW429772	NR_042336 <i>B. stratosphericus</i> 41KF2a	1,000	0,5
	CPO 4.291	TSA	<i>B. subtilis</i>	MW429757	<i>B. subtilis</i> ; IP; DQ452512	1,000	3
	CPO 4.280	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	MW429746	<i>Bacillus</i> sp. A3-30; JF900030	0,978	2
	CPO 4.271	TSA	<i>Bacillus</i> sp.	MW429737	<i>Bacillus</i> sp. MB-12; AF326361	0,962	2

TSA: agar tripeteína de soja; R2A: medio agar R2A; EM: agar extracto de malta, suplementados con 0,5M de NaCl;

A. pusense: *Agrobacterium pusense*; *B. licheniformis*: *Bacillus licheniformis*; *B. stratosphericus*: *Bacillus stratosphericus*; *B. subtilis*: *Bacillus subtilis*; *G. phocaeensis*: *Gracilibacillus phocaeensis*; *M. niabensis*: *Metabacillus niabensis*; NaCl: cloruro de sodio; NCBI: National Center for Biotechnology Information; *N. drentensis*: *Neobacillus drentensis*; *P. illinoisensis*: *Paenibacillus illinoisensis*; *B. sinesaloumensis*: *Bacillus sinesaloumensis*; *S. epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis*; *B. safensis*: *Bacillus safensis*; *S. caeruleatus*: *Streptomyces caeruleatus*.

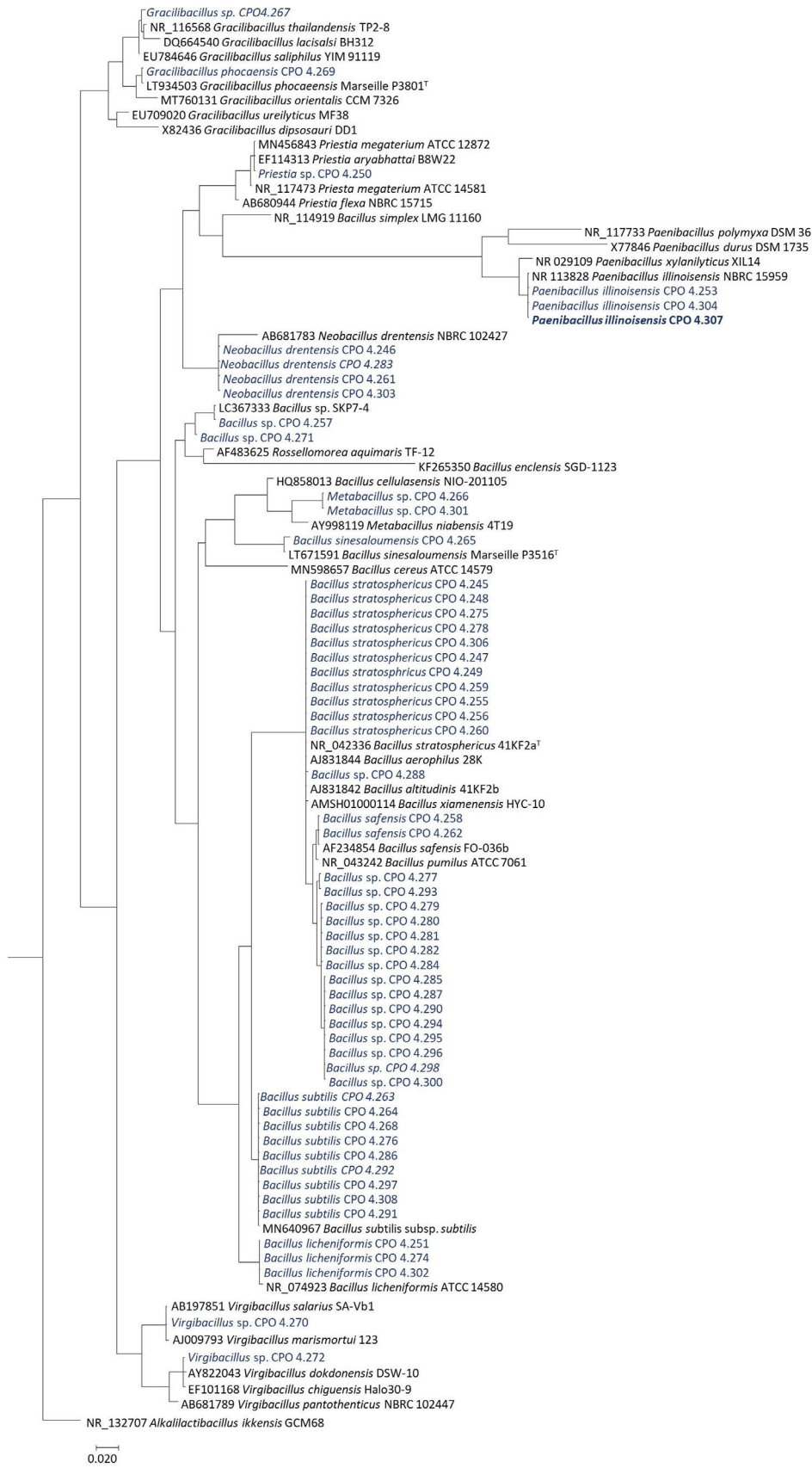


Figura 1 Árbol filogenético de las bacterias correspondientes al género dominante *Bacillus*, basado en la secuenciación del gen 16S ARNr y construido por el método de inferencia bayesiana. La cepa NR.132707 *Alkalilactibacillus ikkensis* GCM68 se consideró fuera de grupo. ARNr: ARN ribosómico.

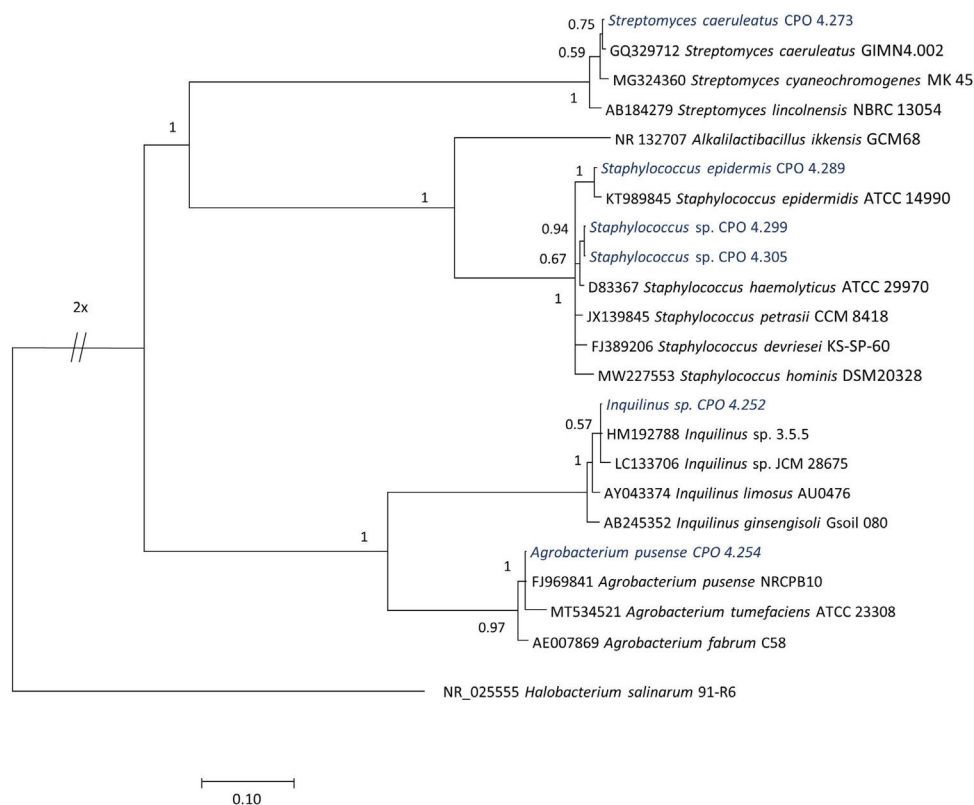


Figura 2 Árbol filogenético de las bacterias que no correspondieron al género *Bacillus*, basado en la secuenciación del gen 16S ARNr y construido por el método de inferencia bayesiana. La cepa NR_025555 *Halobacterium salinarum* 91_R6 se consideró fuera de grupo. ARNr: ARN ribosómico.

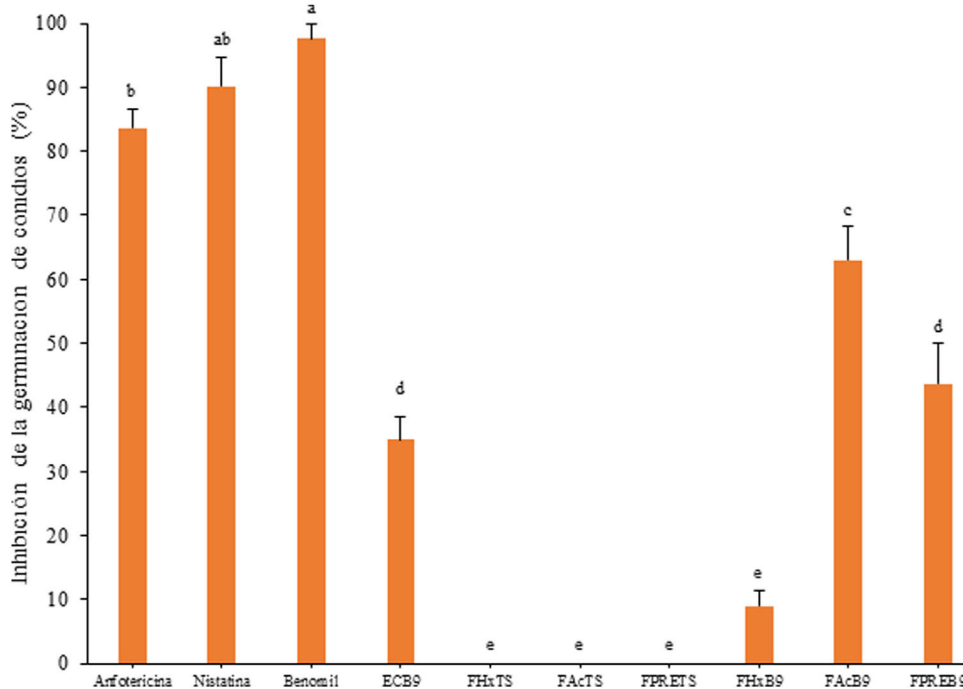


Figura 3 Inhibición de la germinación de conidios de *C. gloeosporioides* por el extracto crudo de *Bacillus* sp. CPO 4.279 (EcB9) a una concentración de 8,0 µg/ml y de sus distintas fracciones orgánicas: FHxB9: baja polaridad; FAcB9: mediana polaridad; FPREB9: precipitado. Control negativo: mismas fracciones orgánicas del CTS. Control positivo: anfotericina B (8 µg/ml), nistatina (12 µg/ml) y benomil (1,0 µg/ml). Las letras indican las diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$). CTS: caldo de tripticosa soya; *C. gloeosporioides*: *Colletotrichum gloeosporioides*.

Tabla 2 Inhibición del crecimiento micelial de *Alternaria alternata* y *Colletotrichum gloeosporioides* por el SC de las bacterias halófilas

Bacteria halófila	Inhibición del crecimiento micelial (%)	
	<i>A. alternata</i>	<i>C. gloeosporioides</i>
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.282	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Bacillus stratosphericus</i> CPO 4.306	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.277	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>B. stratosphericus</i> CPO 4.278	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Bacillus sinesaloumensis</i> CPO 4.265	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Neobacillus drementensis</i> CPO 4.261	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.286	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Paenibacillus illinoisensis</i> CPO 4.304	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Bacillus licheniformis</i> CPO 4.302	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>B. subtilis</i> CPO 4.292	23,96 ± 1,8ab	16,67 ± 1,8a
<i>Priestia</i> sp. CPO 4.250	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Bacillus safensis</i> CPO 4.262	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Metabacillus</i> sp. CPO 4.301	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.296	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>B. stratosphericus</i> CPO 4.245	6,25 ± 2,41cd	0 ± 0c
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.281	9,38 ± 1,0c	0 ± 0c
<i>B. safensis</i> CPO 4.258	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>B. licheniformis</i> CPO 4.274	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.284	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>B. subtilis</i> CPO 4.268	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>P. illinoisensis</i> CPO 4.307	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>B. stratosphericus</i> CPO 4.275	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.257	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>B. stratosphericus</i> CPO 4.259	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Metabacillus</i> sp. CPO 4.266	26,04 ± 3,61ab	0 ± 0c
<i>N. drementensis</i> CPO 4.246	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Inquilinus</i> sp. CPO 4.252	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Gracilibacillus phocaensis</i> CPO 4.269	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.295	26,04 ± 1,8ab	5,21 ± 4,77bc
<i>Gracilibacillus</i> sp. CPO 4.267	4,17 ± 1,8cd	0 ± 0c
<i>N. drementensis</i> CPO 4.283	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>B. stratosphericus</i> CPO 4.247	3,13 ± 1,13cd	0 ± 0c
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.294	7,29 ± 1,8cd	0 ± 0c
<i>P. illinoisensis</i> CPO 4.253	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Virgibacillus</i> sp. CPO 4.272	4,17 ± 1,8cd	0 ± 0c
<i>Streptomyces caeruleatus</i> CPO 4.273	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>B. stratosphericus</i> CPO 4.255	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>B. stratosphericus</i> CPO 4.248	0 ± 0d	0 ± 0c
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.279	18,75 ± 6,25b	10,42 ± 6,51b
Anfotericina (8 y 4 µg/ml)	30,21 ± 4,77a	17,71 ± 1,8a
Medio TS	0 ± 0d	0 ± 0c

Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± error estándar. Las diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

A. alternata: *Alternaria alternata*; *C. gloeosporioides*: *Colletotrichum gloeosporioides*; *B. stratosphericus*: *Bacillus stratosphericus*; *B. subtilis*: *Bacillus subtilis*; *N. drementensis*: *Neobacillus drementensis*; *P. illinoisensis*: *Paenibacillus illinoisensis*; *B. safensis*: *Bacillus safensis*; SC: sobrenadante de cultivo; TS: tripeteína de soja.

C. gloeosporioides. La fracción del extracto EcB9 con mayor IGC correspondió a la de mediana polaridad (FACB9), con $62,99 \pm 5,36\%$ de inhibición, un valor significativamente diferente del registrado con el resto de las fracciones ($p \leq 0,05$). El precipitado (FPREB9) y el extracto (EcB9) presentaron una actividad moderada, con $43,65 \pm 6,41\%$ y $35,00 \pm 3,61\%$ de inhibición, respectivamente, valores significativamente superiores al de la fracción hexánica (FHxB9),

cuya IGC fue del $8,98 \pm 2,48\%$. Las fracciones del blanco no mostraron actividad antifúngica (fig. 3).

Discusión

La presente investigación corresponde a la primera prospección de bacterias en suelos halófilos del

Tabla 3 Selección de la bacteria con mayor actividad antifúngica contra *Colletotrichum gloeosporioides*

Tratamiento	ICM (%)	IGC (%)	IC (%)
Control (CTS)	0 ± 0 e	0,0 ± 0,0d	0
<i>Bacillus subtilis</i> CPO 4.292	12,00 ± 1,86 d	14,92 ± 4,31c	15
<i>Metabacillus</i> sp. CPO 4.266	0 ± 0 e	0 ± 0d	0
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.295	0 ± 0 e	0 ± 0d	0
<i>Bacillus</i> sp. CPO 4.279	21,31 ± 3,33 c	26,64 ± 5,74b	25
Anfotericina (8 µg/ml)	21,33 ± 0,94 c	89,46 ± 1,95a	100
Nistatina (12 µg/ml)	28,57 ± 3,22 b	92,60 ± 1,61a	100
Benomil (1 mg/ml)	42,20 ± 5,05 a	96,23 ± 0,76a	100

Los valores representan el promedio de tres repeticiones ± error estándar. Las diferentes letras dentro de la misma columna indican diferencias significativas (Tukey, $p < 0,05$).

CTS: caldo de tripticasa soya; ICM: inhibición del crecimiento micelial; IGC: inhibición de la germinación de conidios; IC: inhibición del crecimiento por el método de microdilución.

trópico mexicano enfocada en la búsqueda de nuevos agentes antifúngicos. En los suelos salinos de la RBLP, las cepas bacterianas halófilas aisladas se agruparon dentro de tres principales filos, Bacillota (= Firmicutes), que incluyó los géneros *Bacillus*, *Gracilibacillus*, *Metabacillus*, *Neobacillus*, *Paenibacillus*, *Prieta*, *Staphylococcus* y *Virgibacillus*; Pseudomonadota (= Proteobacteria), representada por una sola cepa de los géneros *Agrobacterium* e *Inquilinus*, y, finalmente, una cepa bacteriana del filo Actinomycetota (= Actinobacteria), identificada como del género *Streptomyces*.

En los sitios muestreados, *Bacillus* aparece como el género dominante; sin embargo, algunas cepas no se lograron identificar a nivel especie, ya que sus secuencias no han sido descritas aún en la literatura. En otros suelos salinos se han encontrado como dominantes especies de *Bacillus*^{2,19,48}, lo que se ha atribuido a su reconocida plasticidad metabólica para sobrevivir bajo diversas condiciones ambientales^{6,18}. En el presente estudio, las cepas con mayor actividad también correspondieron a *Bacillus*; sin embargo, se observó una variación en la actividad antifúngica del SC. Esto indica que la producción de los metabolitos secundarios en estas cepas es inestable cuando se producen en una escala masiva, por lo que el proceso de producción del SC aún debe estandarizarse. A pesar de esto, el SC masivo de la cepa *Bacillus* sp. CPO 4.279 presentó una mayor actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*, lo que sugiere que esta cepa posee una mayor estabilidad en la producción de metabolitos secundarios. En este sentido, los halos de ICM observados en el ensayo de difusión en pozo por la cepa *Bacillus* sp. CPO 4.279 sugieren la secreción constitutiva de metabolitos extracelulares antifúngicos. De forma similar, Irshad et al.¹⁹ encontraron que las bacterias halófilas *Streptomyces sampsonii* M1C-15 y *Marinobacter flavimaris* M1A-1 mostraron capacidad antifúngica contra *C. gloeosporioides*. Torres et al.⁴⁵ reportaron que la cepa halotolerante *Bacillus velezensis* inhibió el crecimiento micelial de *A. alternata*. Esto indica que las bacterias halófilas son capaces de producir y secretar metabolitos con actividad antifúngica.

Asimismo, el extracto (EcB9) del SC de la cepa *Bacillus* sp. CPO 4.279 presentó actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*. Sin embargo, se observó una CIM más alta que la reportada previamente para dos cepas halófilas de *Streptomyces*^{2,17}. Esto daría cuenta de la presencia de meta-

bolitos secundarios con actividad antifúngica en el extracto EcB9, aunque en muy bajas concentraciones, por lo que se realizó el fraccionamiento del extracto para potenciar la actividad antifúngica. El fraccionamiento permitió aumentar la actividad antifúngica, lo que se evidenció por la IGC de *C. gloeosporioides* (fig. 3). Además, se observó que los compuestos de mediana polaridad provenientes de la fracción de AcN (FACB9) son los principales responsables de la actividad antifúngica.

Actualmente, existen pocos estudios sobre la actividad antifúngica de fracciones orgánicas de cepas halófilas de *Bacillus* spp. contra *C. gloeosporioides*. Los resultados del presente trabajo son concordantes con los de estudios previos que han mostrado que las fracciones orgánicas de cepas mesófilas de *Bacillus* spp. tienen actividad antifúngica contra este hongo. De igual manera, Park et al.³¹ observaron una disminución notable en el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* por la fracción de mediana polaridad obtenida de AcN de la cepa *B. velezensis* GH1-13, lo que revela que las principales sustancias antifúngicas contenidas en esta fracción son lipopéptidos cíclicos de tipo surfactina. Por otro lado, en el presente estudio, la fracción de baja polaridad (FHxB9) de *Bacillus* sp. CPO 4.279 presentó baja actividad antifúngica, contrariamente a lo informado por Matloub et al.²⁵, quienes documentaron que la fracción Hx del SC de *B. subtilis* NCIB 3610 presentó los mayores halos de inhibición (10 mm) contra *Aspergillus niger* mediante el ensayo de difusión en pozo. Estas diferencias pueden deberse a la naturaleza de los compuestos producidos por las diferentes cepas de *Bacillus* y el blanco evaluado. En bacterias halófilas del género *Bacillus* con actividad antifúngica, se han detectado compuestos bioactivos como 2,4-di-terc-butilfenol, 1-nonilcicloheptano, 1,3-di-terc-butilbenceno, iturina F1, iturina F2, iturina A9, iturina A8, subtilisina A, glucoproteínas y proteínas^{24,27,41}. Estos reportes nos sugieren que la cepa *Bacillus* sp. CPO 4.279 también podría ser productora de estos tipos de compuestos antifúngicos.

Conclusiones

En el presente estudio se efectuó la caracterización molecular de 64 bacterias halófilas aisladas de suelos salinos en ambientes tropicales en Campeche, México. Las cepas *Baci-*

llus sp. CPO 4.279, *Bacillus* sp. CPO 4.295, *B. subtilis* CPO 4.292 y *Metabacillus* sp. CPO 4.266 fueron capaces de inhibir el crecimiento de *A. alternata* y *C. gloeosporioides*. El análisis biodirigido del extracto crudo de AcOEt de *Bacillus* sp. CPO 4.279 indicó la presencia de una fracción orgánica de mediana polaridad con capacidad de inhibir la germinación de *C. gloeosporioides*. En suma, *Bacillus* sp. CPO 4.279 presenta potencial para la producción de compuestos con actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*, por lo que es conveniente avanzar en la caracterización de los metabolitos implicados. Las bacterias halófilas del trópico mexicano poseen alto potencial para desarrollar productos alternativos en el control de *C. gloeosporioides*, agente causal de antracnosis en cultivos agrícolas de importancia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de maestría concedida al primer (1099478) y segundo autor (723269); así como al proyecto Cátedra CONACYT 364 «Reconversión productiva sustentable para el desarrollo de los productores rurales de Campeche» del cual es integrante el autor de correspondencia de este manuscrito. Además, agradecemos al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por la beca otorgada para realizar los estudios de posgrado.

Anexo. Material adicional

Se puede consultar material adicional a este artículo en su versión electrónica disponible en [doi:10.1016/j.ram.2024.02.004](https://doi.org/10.1016/j.ram.2024.02.004).

Bibliografía

1. Altschul F, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389–402, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
2. Betancur LA, Naranjo-Gaybor SJ, Vinchira-Villarraga DM, Moreno-Sarmiento NC, Maldonado LA, Suarez-Moreno ZR, Acosta-González A, Padilla-Gonzalez GF, Puyana M, Castellanos L, Ramos FA. Marine Actinobacteria as a source of compounds for phytopathogen control: An integrative metabolic-profiling /bioactivity and taxonomical approach. *PLoS ONE.* 2017;12:e0170148, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0170148>.
3. Bibi F, Strobel G, Naseer M, Yasir M, Khalaf Al-Ghamdi A, Azhar E. Halophytes-associated endophytic and rhizospheric bacteria: diversity, antagonism and metabolite production. *Biocontrol Sci Technol.* 2018;28:192–213, <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2018.1434868>.
4. Chan-Keb CA, Agraz-Hernández CM, Muñoz-Salazar R, Posada-Vanegas G, Osti-Sáenz J, Castellano J, Conde-Medina ER, Vega-Serratos KPBE. Ecophysiological response of Rhizophora mangle to the variation in hydrochemistry during five years

- along the Coast of Campeche, México. *Diversity.* 2018;10:9, <http://dx.doi.org/10.3390/d10010009>.
5. Chechi A, Stahlecker J, Dowling ME, Schnabel G. Diversity in species composition and fungicide resistance profiles in *Colletotrichum* isolates from apples. *Pestic Biochem Phys.* 2019;158:18–24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.04.002>.
 6. Corral P, Amoozegar MA, Ventosa A. Halophiles and their biomolecules: Recent advances and future applications in biomedicine. *Mar Drugs.* 2019;18:33, <http://dx.doi.org/10.3390/md18010033>.
 7. Delgado-García M, Contreras-Ramos SM, Rodríguez JA, Mateos-Díaz JC, Aguilar CN, Camacho-Ruiz RM. Isolation of halophilic bacteria associated with saline and alkaline-sodic soils by culture dependent approach. *Heliyon.* 2018;4:1–18, <http://dx.doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00954>.
 8. Doyle JJ, Doyle JL, Brown AHD. Chloroplast DNA Phylogenetic affinities of newly described species in Glycine (Leguminosae: Phaseoleae). *Syst Bot.* 1990;15:466–71.
 9. Eden P, Schmidt T, Blakemore R, Pace N. Phylogenetic analysis of *Aquaspirillum magnetotacticum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-Specific DNA. *Int J Syst Bacteriol.* 1991;41:324–5, <http://dx.doi.org/10.1099/00207713-41-2-324>.
 10. Elyasi B, Jafari S, Hallaj S, Chapeland F, Ruprich G, Dilmaghani A. Isolation and identification of antibiotic-producing halophilic bacteria from Dagh Biarjmand and Haj Aligholi salt deserts, Iran. *Pharm Sci.* 2019;25:70–7, <http://dx.doi.org/10.15171/PS.201911>.
 11. Escalante-Réndiz D, De-la-Rosa-García S, Tapia-Tussell R, Martín J, Reyes F, Vicente F, Gamboa-Angulo M. Molecular identification of selected *Streptomyces* strains isolated from Mexican tropical soils and their anti-Candida activity. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16:1913, <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16111913>.
 12. Espinosa-Asuar L, Soto L, Salcedo D, Hernández-Monroy A, Eguiarte L, Souza V, Velez P. Bacterial communities from deep hydrothermal systems: The Southern Gulf of California as an example of primeval environments. En: Souza V, Segura A, Foster J, editores. *Astrobiology and Cuatro Ciénegas basin as an analog of early earth.* 1 ed. Switzerland: Springer Cham; 2020. p. 146–66, <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-46087-7>.
 13. García-Estrada RS, Cruz-Lachica I, Osuna-García LA, Márquez-Zequera I. First report of papaya (*Carica papaya*) Anthracnose caused by *Colletotrichum plurivorum* in Mexico. *Plant Dis.* 2020;104:589, <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-19-0914-PDN>.
 14. González-Estrada R, Blancas-Benítez F, Velázquez-Estrada RM, Montaña-Leyva B, Ramos-Guerrero A, Aguirre-Güitrón L, Gutierrez-Martinez P. Alternative eco-friendly methods in the control of post-harvest decay of tropical and subtropical fruits. En: Kahramanoglu I, Kafkas NE, Küden A, Çömlekçioğlu S, editores. *Modern fruit industry.* 1 ed. Turkey: IntechOpen; 2020. p. 1–22, <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.85682>.
 15. Gupta R, Patel S, Navneet S, Shu C. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only for the members to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2020;70:5753–98, <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.004475>.
 16. Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 1999;41:95–8.
 17. Haque MU, Rahman MA, Haque MA, Sarker AK, Islam MA. Antimicrobial and anticancer activities of ethyl acetate extract of co-culture of *Streptomyces* sp. ANAM-5 and AIAH-10 isolated from

- mangrove forest of sundarbans, Bangladesh. *J Appl Pharm Sci*. 2016;6:051–5, <http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2016.60207>.
18. Ibarra-Villarreal A, Gándara-Ledezma A, Godoy-Flores A, Herrera-Sepúlveda A, Díaz-Rodríguez A, Parra-Cota F, Santos-Villalobos S. Salt-tolerant *Bacillus* species as a promising strategy to mitigate the salinity stress in wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum). *J. Arid Environ*. 2021;186(104399):1–8, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaridenv.2020.104399>.
19. Irshad A, Ahmad I, Kim SG. Isolation, characterization and antimicrobial activity of halophilic bacteria in foreshore soils. *Afr J Microbiol Res*. 2013;7:164–73, <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR12.1004>.
20. Kadaikunnan S, Rejiniemom T, Khaled JM, Alharbi NS, Mothana R. In-vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and functional properties of *Bacillus amyloliquefaciens*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14:9, <http://dx.doi.org/10.1186/s12941-015-0069-1>.
21. Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:3059–66, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkf436>.
22. Koyoc-Ramírez LG, Mendoza-Vega J, Pérez Jiménez JC, Torrescano Valle N. Efectos de la perturbación antrópica en petenes de selva en Campeche, México. *Act Bot Mex*. 2015;1:89–103, <http://dx.doi.org/10.21829/abm110.2015.189>.
23. Kushner DJ. Life in high salt and solute concentrations. En: Kushner DJ, editor. *Microbial Life in Extreme Environments*. 1a ed London: Academic Press; 1985. p. 317–68.
24. Manikandan P, Moopantakath J, Imchen M, Kumavath R, SenthilKumar PK. Identification of multi-potent protein subtilisin A from halophilic bacterium *Bacillus firmus* VE2. *Microb Pathog*. 2021;157:105007, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2021.105007>.
25. Matloub AA, Gomaa EZ, Hassan AA, Elbatanony MM, El-Senousy WM. Comparative chemical and bioactivity studies of intra- and extracellular metabolites of endophytic bacteria, *Bacillus subtilis* NCIB 3610. *Int J Peptide Res Ther*. 2020;26:497–511, <http://dx.doi.org/10.1007/s10989-019-09856-w>.
26. Medina-Baizabal IL, Heredia G, Gamboa-Angulo M. Antimicrobial activity of extracts obtained from the dual interaction between saprophytic microm. *Trop Subtrop Agroecosystems*. 2022;25:1–11, <http://dx.doi.org/10.56369/tsaes.4199>.
27. Nas F, Aissaoui N, Mahjoubi M, Mosbah A, Arab M, Abdelwahed S, Khrouf R, Masmoudi AS, Cherif A, Klouche-Khelil N. A comparative GC-MS analysis of bioactive secondary metabolites produced by halotolerant *Bacillus* spp. isolated from the Great Sebkhah of Oran. *Int Microbiol*. 2021;24:455–70, <http://dx.doi.org/10.1007/s10123-021-00185-x>.
28. National Committee for Clinical Laboratory Standards M27-A2. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved Standard –Second Edition. 2nd ed. Pennsylvania, USA: NCCLS; 2002. p. 10–33.
29. Niemeyer JC, Chelinho S, Sousa JP. Soil ecotoxicology in Latin America: Current research and perspectives. *Environ Toxicol Chem*. 2017;36:1795–810, <http://dx.doi.org/10.1002/etc.3792>.
30. Oren A. Halophilic microbial communities and their environments. *Curr Opin Biotechnol*. 2015;33:119–24, <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.02.005>.
31. Park G, Nam J, Kim J, Song J, Kim PI, Min HJ, Lee CW. Structure and mechanism of surfactin peptide from *Bacillus velezensis* antagonistic to fungi plant pathogens. *Bull Korean Chem Soc*. 2019;40:704–9, <http://dx.doi.org/10.1002/bkcs.11757>.
32. Patel S, Gupta RS. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalo-*
- bacillus* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70:406–38, <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.003775>.
33. Rajeswari P, Jose PA, Amiya R, Jebakumar SR. Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity. *Front Microbiol*. 2015;5:753, <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00753>.
34. Rashad FM, Fathya HM, El-Zayata AS, Elghonaimy AM. Isolation and characterization of multifunctional *Streptomyces* species with antimicrobial, nematocidal and phytohormone activities from marine environments in Egypt. *Microbiol Res*. 2015;175:34–47, <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2015.03.002>.
35. Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*. 2012;61:539–42, <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
36. Ruiz-Jiménez AL, González-Coloma A, Andrés-Yeves MF, Ruiz-Sánchez E, Heredia G, Peraza-Sánchez SR, Medina-Baizabal IL, Reyes-Estebanez M, Canto-Canché B, Gamboa-Angulo M. Insect deterrent and nematocidal screening of microfungi from Mexico and anti-aphid compounds from *Gliomastix marseei*. *Rev Argent Microbiol*. 2017;49:83–92, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.08.009>.
37. Sadfi-Zouaoui N, Hannachi I, Andurand D, Essghaier B, Boudabous A, Nicot P. Biological control of *Botrytis cinerea* on stem wounds with moderately halophilic bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*. 2008;24:2871–7, <http://dx.doi.org/10.1007/s11274-008-9825-0>.
38. Santhaseelan H, Dinakaran VT, Dahms HU, Ahamed JM, Murugaiah SG, Krishnan M, Hwang JS, Rathinam AJ. Recent antimicrobial responses of halophilic microbes in clinical pathogens. *Microorganisms*. 2022;10:417, <http://dx.doi.org/10.3390/microorganisms10020417>.
39. Shi L, Liang Z, Li J, Hao J, Xu Y, Huang K, Tian J, He X, Xu W. Ochratoxin A biocontrol and biodegradation by *Bacillus subtilis* CW 14. *J Sci Food Agric*. 2014;94:1879–85, <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.6507>.
40. Shultana R, Kee Zuan AT, Yusop MR, Saud HM. Characterization of salt-tolerant plant growth-promoting rhizobacteria and the effect on growth and yield of saline-affected rice. *PLoS One*. 2020;15:e0238537, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0238537>.
41. Son S, Ko SK, Jang M, Kim JW, Kim GS, Lee JK, Jeon ES, Futamura Y, Ryoo IJ, Lee JS, Oh H, Hong YS, Kim BY, Takahashi S, Osada H, Jang JH, Ahn JS. New Cyclic Lipopeptides of the Iturin Class Produced by Saltern-Derived *Bacillus* sp. KCB14S006. *Mar Drugs*. 2016;14:72, <http://dx.doi.org/10.3390/md14040072>.
42. Sparks TC, Bryant RJ. Crop protection compounds – trends and perspective. *Pest Manag Sci*. 2021;77:3608–16, <http://dx.doi.org/10.1002/ps.6293>.
43. Suwan N, Baison W, Chuajedton A. Purification of *Gymnema inodorum* leaf extract and its antifungal potential against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Proc Natl Acad Sci India Sect B Biol Sci*. 2022;92:667–77, <http://dx.doi.org/10.1007/s40011-022-01364-0>.
44. Tian SZ, Pu X, Luo G, Zhao LX, Xu LH, Li WJ, Luo Y. Isolation and characterization of new p-Terphenyls with antifungal, antibacterial, and antioxidant activities from halophilic actinomycete *Nocardioopsis gilva* YIM 90087. *J Agric Food Chem*. 2013;61:3006–12, <http://dx.doi.org/10.1021/jf400718w>.
45. Torres M, Llamas I, Torres B, Toral L, Sampedro I, Béjar V. Growth promotion on horticultural crops and antifungal activity of *Bacillus velezensis* XT1. *Appl Soil Ecol*. 2020;150:103453, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.103453>.
46. Troncoso-Rojas R, Tiznado-Hernández M. *Alternaria alternata* (Black Rot, Black Spot). En: Bautista-Baños S, editor. *Postharvest*

- Decay: Control Strategies. 1a ed Netherlands: Elsevier Science; 2014. p. 147–87.
47. Waditee-Sirisattha R, Kageyama H, Takabe T. Halophilic micro-organism resources and their applications in industrial and environmental biotechnology. *AIMS Microbiol.* 2016;2:42–54, <http://dx.doi.org/10.3934/microbiol.2016.1.42>.
 48. Wang W, Wu Z, He Y, Huang Y, Li X, Ye BC. Plant growth promotion and alleviation of salinity stress in *Capsicum annuum* L. by isolated from saline soil in Xinjiang. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2018;164:520–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.070>.
 49. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 1991;173:697–703, <http://dx.doi.org/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>.
 50. Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, et al. Ribosomal Database Project: data and tools for high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:633–42, <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1244>.