



Xtrem Biotech S.L.
Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

TESIS DOCTORAL INDUSTRIAL

Caracterización de bacterias que pueblan Rambla Salada (Murcia) y evaluación de su potencial para el control de infecciones fúngicas en el olivar.

Programa de Doctorado: Biología Fundamental y de Sistemas

David Jonathan Castro

Granada, 2019

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: David Jonathan Castro
ISBN: 978-84-1117-157-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/71865>

INDICE GENERAL

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Hábitats hipersalinos y microorganismos halófilos	5
1.2. Rambla Salada	8
1.3. Microorganismos procariotas que aún no han sido cultivados	9
1.4. Técnicas y estrategias para el cultivo de procariotas que aún no se han podido cultivar	10
1.4.1. Empleo de medios modificados	10
1.4.2. Modificaciones de las condiciones de crecimiento	11
1.4.3. Simulación de los ambientes naturales	12
1.4.3.1. Uso de cámaras de difusión	12
1.4.3.2. Técnica de Dilución “a extinción”	12
1.4.4. Cocultivo	13
1.5. Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos halófilos	14
1.6. Bacterias promotoras de crecimiento y agentes de biocontrol	15
1.7. Verticilosis	17
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAL Y MÉTODOS	27
3.1. Muestras de suelo	29
3.2. Microorganismos utilizados	29
3.3. Plantas de olivos	30
3.4. Medios de cultivo	30
3.5. Soluciones	37
3.6. Técnica de aislamiento de dilución a extinción	39
3.6.1. Procesamiento y estimación del número de microorganismos de las muestras	39
3.6.2. Inoculación de las placas de microtitulación	39
3.6.3. Análisis estadístico	39
3.7. Pruebas fenotípicas	40
3.7.1. Gram, catalasa, oxidasa y movilidad	40
3.7.2. Crecimiento a distintas concentraciones de sales, temperatura y pH	40
3.7.3. Crecimiento en anaerobiosis	40
3.7.4. Pruebas enzimáticas	40
3.7.5. Producción de sideróforos	44
3.7.6. Sistemas miniaturizados	44
3.8. Determinación de ácidos grasos, lípidos polares y quinonas respiratorias	46
3.9. Análisis genéticos y filogenéticos	46
3.9.1. Extracción de ADN de bacterias	46
3.9.2. Extracción de ADN del material vegetal	47
3.9.3. Determinación de la concentración de ADN	47
3.9.4. Reacción en cadena de la polimerasa	47
3.9.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa	48
3.9.6. Reacción de ligación y clonación de ADN	48
3.9.7. Secuenciación de los amplificadores	49
3.9.8. Contenido de G+C	49
3.9.9. Secuenciación de genomas	49
3.10. Análisis filogenético	50

3.11. Recuento de microorganismos	50
3.12. Ensayos <i>in vitro</i> para determinar la actividad antifúngica	51
3.12.1. Actividad antifúngica en medio sólido	51
3.12.2. Actividad antifúngica en medio líquido	51
3.12.3. Actividad antifúngica de los compuestos volátiles	52
3.13. Crecimiento de las cepas bacterianas seleccionadas en distintos medios de cultivo	52
3.14. Estudios de compatibilidad entre las bacterias	52
3.15. Ensayos <i>in vivo</i> de la actividad antifúngica de las cepas en olivos infectados con <i>V. dahliae</i>	53
3.15.1. Actividad antifúngica preventiva en condiciones de invernadero	55
3.15.1.1. Invernadero en Granada	55
3.15.1.2. Invernadero en Córdoba	56
3.15.2. Actividad antifúngica preventiva en condiciones de semi-campo	56
3.15.2.1. Condiciones de semi-campo en Granada	56
3.15.2.2. Condiciones de semi-campo en Murcia	57
3.16. Ensayo de campo de la actividad antifúngica curativa de la cepa XT1 en olivos con síntomas de infección por <i>V. dahliae</i>	58
3.17. Determinación de la presencia y permanencia de las cepas bacterianas seleccionadas en olivos	58
3.17.1. Obtención de mutantes resistentes a rifampicina	58
3.17.2. Aplicación de los mutantes rif+ sobre plantas y sustratos	58
3.17.3. Recuento de microorganismos rif+ de las muestras vegetales	59
3.18. Análisis de metabolitos implicados en la actividad antifúngica	59
3.18.1. Actividad antifúngica de los sobrenadantes de las cepas XT1, XT5, XT6, XT8 y XT212	59
3.18.2. Actividad antifúngica de los lipopéptidos producidos por XT1 y XT212	59
3.19. Ensayos de bioseguridad	60
3.19.1. Ensayo de sensibilidad con <i>E. coli</i> MC4100	60
3.19.2. Ensayo de toxicidad con <i>V. fischeri</i>	60
3.19.3. Ensayo de toxicidad con el nematodo <i>C. elegans</i>	60
4. RESULTADOS	63
4.1. Cultivo por la técnica de dilución a extinción	65
4.2. Caracterización fenotípica	65
4.2.1. Caracterización morfológica y fisiológica	65
4.2.2. Actividades enzimáticas	66
4.3. Estudio filogenético	66
4.4. Caracterización de nuevas cepas	68
4.4.1. Descripción de la cepa D22-912	69
4.4.2. Descripción de la cepa D15	74
4.4.3. Descripción de la cepa A21	79
4.5. Actividad antifúngica <i>in vitro</i>	85
4.6. Actividad antifúngica de los compuestos volátiles	88
4.7. Actividad promotora del crecimiento de plantas	89
4.8. Crecimiento de las cepas bacterianas seleccionadas en distintos medios de cultivo	89
4.9. Estudios de compatibilidad entre las cepas	90
4.10. Actividad antifúngica de las cepas en plantas de olivos infectadas con <i>V. dahliae</i>	91
4.10.1. Actividad preventiva en invernadero, Granada	91
4.10.2. Actividad preventiva en invernadero, Córdoba	96
4.10.3. Actividad preventiva en condiciones de semi-campo, Granada	99
4.10.4. Actividad post infección en condiciones de semi-campo, Murcia	102
4.10.5. Actividad curativa en campo, Granada	104

4.11. Presencia y permanencia de las cepas bacterianas seleccionadas en olivos	105
4.12. Análisis de metabolitos implicados en la actividad antifúngica	107
4.13. Ensayos de bioseguridad	109
4.13.1. Ensayo de sensibilidad con <i>E. coli</i> MC4100	109
4.13.2. Ensayo de interferencia metabólica con <i>V. fischeri</i>	110
4.13.3. Ensayo de toxicidad con el nematodo <i>C. elegans</i>	110
5. DISCUSIONES	113
6. CONCLUSIONES	131
7. BIBLIOGRAFÍA	135

INDICE DE TABLAS

Tabla 3.1.	Fecha de muestreo y ubicación de las muestras de suelo analizadas	29
Tabla 3.2.	Composición del medio de cultivo S3	31
Tabla 3.3.	Composición de la solución traza	31
Tabla 3.4.	Composición de la solución de vitaminas I	31
Tabla 3.5.	Composición de la solución de vitaminas II	32
Tabla 3.6.	Composición de sales Subow 30% (p/v)	32
Tabla 3.7.	Composición del medio líquido R2	33
Tabla 3.8.	Composición del caldo nutritivo	33
Tabla 3.9.	Composición del medio Molp	34
Tabla 3.10.	Composición del medio NGM	35
Tabla 3.11.	Composición del medio NP10 Sorensen's	35
Tabla 3.12.	Composición del medio Cooper	36
Tabla 3.13.	Solución de sales traza 100X para medio Cooper	36
Tabla 3.14.	Composición de la solución de sales stock para el medio SG	36
Tabla 3.15.	Composición del medio SG	36
Tabla 3.16.	Composición del medio para la prueba de la fosfatasa ácida	42
Tabla 3.17.	Composición del medio de Burk	43
Tabla 3.18.	Pruebas determinadas mediante los sistemas miniaturizados API	45
Tabla 3.19.	Oligonucleótidos utilizados para las PCR	48
Tabla 3.20.	Resumen de experiencias realizadas en olivos para determinar la actividad antifúngica de las cepas	54
Tabla 4.1.	Porcentaje de cepas cultivables para las 6 muestras de suelo	65
Tabla 4.2.	Especies aisladas por dilución a extinción. Identificación por comparación de	67

	sus secuencias del gen ARNr 16S usando BLAST	
Tabla 4.3.	Características que distinguen la cepa D22-912 de otras especies del género <i>Blastomonas</i>	70
Tabla 4.4.	Perfil de ácidos grasos de la cepa D22-912 y las cepas tipo de especies del género <i>Blastomonas</i> .	72
Tabla 4.5.	Características que distinguen la cepa D15 de otras cepas del género <i>Roseovarius</i>	76
Tabla 4.6.	Perfil de ácidos grasos de la cepa D15 y las cepas tipo del género <i>Roseovarius</i>	78
Tabla 4.7.	Características distintivas de la cepa A21 frente a especies tipo del género <i>Roseovarius</i>	80
Tabla 4.8.	Perfil de ácidos grasos de la cepa A21 y las especies relacionadas del género <i>Roseovarius</i>	84
Tabla 4.9.	Nuevas taxa descritos, obtenidos por dilución a extinción a partir de suelo de Rambla Salada.	85
Tabla 4.10.	Número de cepas con actividad antifúngica en medio sólido y líquido y porcentaje de reducción del crecimiento del micelio en medio sólido	86
Tabla 4.11.	Cepas seleccionadas por su actividad antifúngica	87
Tabla 4.12.	Porcentajes de inhibición de fitopatógenos de las cepas seleccionadas	88
Tabla 4.13.	Resultado de las pruebas para determinar la capacidad de las cepas seleccionadas para promover el crecimiento vegetal.	89
Tabla 4.14.	Crecimiento de las cepas seleccionadas en medio SG, Molp y M2	90
Tabla 4.15.	Crecimiento de las cepas en presencia de sobrenadantes	91
Tabla 4.16.	Dosis UFC/ sustrato en cada tratamiento en invernadero	92
Tabla 4.17.	Incidencia, severidad e índice de daño a los 90 días de la infección con <i>V. dahliae</i> .	95
Tabla 4.18.	Número de esporas de <i>V. dahliae</i> en los sustratos de las plantas tratadas con las cepas	96
Tabla 4.19.	Dosis UFC/ sustrato por tratamiento en invernadero Córdoba	96
Tabla 4.20.	Efecto de los tratamientos sobre la incidencia y severidad de la verticilosis en plántulas de olivo en invernadero de Córdoba.	97
Tabla 4.21.	Dosis UFC/ sustrato en cada tratamiento en semi-campo Granada.	100
Tabla 4.22.	Dosis UFC/ sustrato en cada tratamiento en semi-campo Murcia	103
Tabla 4.23.	Altura (cm), peso fresco de la raíz (g) y peso fresco de la planta (g) a los 166 días	103
Tabla 4.24.	Severidad promedio de los síntomas de verticilosis en los olivos tratados y sin tratar	104
Tabla 4.25.	Recuentos de XT1 rif+ y XT212 rif+ en placas de agar nutritivo con rifampicina a partir de sustrato de olivos	106
Tabla 4.26.	Inhibición del crecimiento de <i>V. dahliae</i> de sobrenadantes en medio sólido.	107

Tabla 4.27.	Concentración letal 50 (CL50) para <i>C. elegans</i> de sobrenadantes de la cepa XT1 y compuestos químicos	11
-------------	--	----

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.	Algunos hábitats hipersalinos en España	5
Figura 1.2.	Árbol filogenético universal.	7
Figura 1.3.	Situación geográfica del Humedal del Ajauque y Rambla Salada.	8
Figura 1.4.	Micelio de <i>V. dahliae</i> .	19
Figura 1.5.	Ciclo de vida de <i>V. dahliae</i>	20
Figura 4.1.	Actividades enzimáticas de las cepas. Los resultados representan la abundancia relativa de 354 aislados	66
Figura 4.2.	Micrografía electrónica a partir de una tinción negativa de las células de la cepa D22-912	69
Figura 4.3.	Perfil de lípidos polares de la cepa D22-912 y <i>B. natatoria</i> CECT 4273T	71
Figura 4.4.	Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen 16S rRNA para la cepa D22-912	73
Figura 4.5.	Productos de PCR de genes pufLM en la cepa D22-912	74
Figura 4.6.	Micrografías electrónicas a partir de una tinción negativa de las células de la cepa D15	75
Figura 4.7.	Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen del ARNr 16S para la cepa D15	77
Figura 4.8.	Perfil lipídico polar de la cepa D15	78
Figura 4.9.	Productos de PCR de genes pufLM en la cepa D15	79
Figura 4.10.	Micrografía electrónica a partir de una tinción negativa de las células de la cepa A21	80
Figura 4.11.	Visualización de BLAST Ring Image Generator (BRIG) de secuencias cromosómicas de las cepas A21, <i>R. tolerans</i> EL-172T, <i>R. pacificus</i> LMG 24575T.	82
Figura 4.12.	Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen del ARNr 16S para la cepa A21	83
Figura 4.13	Perfil lipídico polar de la cepa A21	84
Figura 4.14.	Actividad antifúngica en medio sólido frente a <i>V. dahliae</i> . A, cepa con actividad; B, cepa sin actividad	86
Figura 4.15.	Actividad de los sobrenadantes bacterianos frente a <i>V. dahliae</i> patotipo D	87
Figura 4.16.	Inhibición del crecimiento de <i>V. dahliae</i> en PDA	88
Figura 4.17.	Inhibición del crecimiento de <i>V. dahliae</i> por compuestos volátiles de la cepa XT1	89
Figura 4.18.	Halos de inhibición alrededor de los cultivos de las cepas	90

Figura 4.19.	Contenido de MDA en las plantas de olivo a los 30 días	92
Figura 4.20.	Contenido de fenoles totales en las plantas de olivo a los 30 días	93
Figura 4.21.	Actividad polifenol oxidasa (PPO) en las hojas de las plantas de olivo a los 30 días	94
Figura 4.22.	Identificación de <i>V. dahliae</i> en las hojas de olivos a los 30 días	94
Figura 4.23.	Progreso en la severidad de los síntomas por <i>V. dahliae</i>	98
Figura 4.24.	Efecto de la cepa XT1 sobre la severidad de la verticilosis	98
Figura 4.25.	Plantones de olivo al final del ensayo	99
Figura 4.26.	Severidad de los síntomas de la infección por <i>V. dahliae</i> patotipo D en plantas de olivo	101
Figura 4.27.	Ensayo en plantas de olivo en condiciones de semicampo	101
Figura 4.28.	Crecimiento (altura) de las plantas de olivo	102
Figura 4.29.	Porcentaje de la severidad de la verticilosis en olivos tratados con Heroprotec Micro® en campo	105
Figura 4.30.	Disminución de la severidad de los síntomas de la verticilosis en un árbol de olivo	105
Figura 4.31.	Recuentos de sustratos de olivos sin tratar, en placas de agar nutritivo	106
Figura 4.32.	Recuentos de microorganismos resistentes a rifampicina a partir de raíces de plantones tratados con XT1	107
Figura 4.33.	Inhibición del crecimiento de <i>V. dahliae</i> en medio PDA hidratado con sobrenadantes de cultivos de la cepa XT1	108
Figura 4.34.	Inhibición del crecimiento de <i>V. dahliae</i> en medio PDA hidratado con lipopéptido de la cepa XT1 en caldo Molp	108
Figura 4.35.	Inhibición del crecimiento de <i>V. dahliae</i> en presencia de lipopéptido de la cepa XT1	109
Figura 4.36.	Recuento de supervivientes de <i>E. coli</i> MC4100	110
Figura 4.37.	Cinética de crecimiento diferencial de la cepa N2 de <i>C. elegans</i>	111
Figura 4.38.	Proporciones entre las concentraciones de uso en campo (CC) y la concentración necesaria para alcanzar la CL50.	112

RESUMEN

Rambla Salada es un espacio hipersalino protegido de la Comunidad de Murcia. La biodiversidad procariota cultivable de este hábitat ha sido estudiada previamente tanto por técnicas clásicas como moleculares encontrando numerosos grupos que no han podido ser cultivados. Con el propósito de ampliar conocimientos sobre su diversidad microbiana hemos empleado la técnica de dilución a extinción y el uso de medios oligotrofos para favorecer el cultivo de microorganismos de crecimiento lento y/o indetectables por métodos clásicos de muestras de suelo. La diversidad bacteriana cultivada perteneció a los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* siendo la clase *Gammaproteobacteria* la predominante. Los taxones más abundantes fueron *Marinobacter*, *Halomonas* y *Bacillus*. Como parte de los resultados de este estudio se describieron 3 nuevos taxa: *Blastomonas quesadae* 912^T, *Roseovarius ramblicola* D15^T y *Roseovarius bejariae* A21^T.

La caracterización de los aislados nos permitió seleccionar cepas con interés biotecnológico y agrícola. Por ser la verticilosis una de las principales infecciones del olivar, centramos la búsqueda a la caracterización y evaluación de potenciales agentes de biocontrol frente a *V. dahliae* aislados a partir de suelos de Rambla de Salada y, cepas bacterianas que ya han sido aisladas de diversos hábitats salinos de España y que pertenecen a la colección de la empresa Xtrem Biotech S.L.

La aplicación preventiva de las cepas en olivos infectados con *V. dahliae* en invernaderos y semi-campo puso de manifiesto una protección a la infección mediante la disminución de la incidencia y la severidad de los síntomas de la verticilosis, la reducción de las esporas en el suelo, la inducción de una respuesta sistémica defensiva frente al hongo, la incremento en el crecimiento de los plantones, siendo XT1 la cepa que mostró los resultados más prometedores. De igual forma, el formulado Heroprotec Micro® mostró actividad curativa en olivos afectados por *V. dahliae* en condiciones de campo relacionada con una disminución de la severidad de los síntomas a lo largo de 14 meses.

La aplicación de la cepa XT1 constituye una alternativa segura y ecológica a los métodos de control tradicionales y podría sumarse como elemento clave en las estrategias integradas para el manejo de la verticilosis. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran el potencial de la cepa XT1 como un agente de biocontrol capaz de estimular el crecimiento de olivos, inducir una respuesta sistémica de defensa en el huésped frente a la infección por *V. dahliae*, reducir la incidencia y severidad de la infección por verticilosis, persistir en el suelo y colonizar las raíces.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Hábitats hipersalinos y microorganismos halófilos

Se consideran ambientes hipersalinos aquellos que poseen una concentración salina elevada, generalmente muy superior a la de los hábitats acuáticos marinos y oceánicos (Ventosa, 2010). Estos ambientes están ampliamente distribuidos en la naturaleza y se encuentran representados principalmente por hábitats acuáticos y suelos hipersalinos, aunque también se engloban en esta categoría las áreas salobres próximas a los yacimientos petrolíferos, algunas plantas del desierto, las minas de sal y una gran variedad de productos en salmuera o salazón (Ventosa y col., 2008). En estos ambientes no solo la elevada concentración salina limita la microbiota de los mismos, sino que otros factores tales como la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto o las radiaciones solares pueden influir seleccionando los tipos de seres vivos que los habitan. Estos microorganismos extremófilos no solo toleran estas condiciones adversas, sino que en muchos casos se encuentran perfectamente adaptados a las mismas y de hecho, requieren para su desarrollo determinadas concentraciones de sal, siendo incapaces de crecer en condiciones de baja salinidad o en ausencia de las mismas (Ventosa, 2010).



Figura 1.1. Algunos hábitats hipersalinos en España: A. Salinas de Santa Pola (Alicante); B. Salinas de Cabo de Gata (Almería); C. Salinas de Isla Cristina (Huelva); D. Salinas de la Malahá (Granada); E. Laguna de Fuente de Piedra (Málaga); F. Rambla Salada (Murcia).

Los llamados ambientes talasohalinos son originados por la evaporación de agua de mar, por lo que su composición de sal es similar. Los iones más predominantes son el

sodio y el cloruro, y el pH es cercano a la neutralidad o ligeramente alcalino. Cuando hay evaporación, ocurren algunos cambios en la composición iónica debido a la precipitación de yeso ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y otros minerales (Oren, 2002a). Las salmueras talasohalinas saturadas de NaCl, como las que se encuentran en los estanques cristalizadores de salinas, a menudo muestran una coloración rojo brillante debido a la gran cantidad de microorganismos pigmentados que la albergan. Por otro lado, existen los ambientes hipersalinos atalasoalinos, en los que la composición iónica difiere mucho de la del agua de mar, y que están igualmente poblados por microorganismos. Un buen ejemplo es el Mar Muerto, un lago salado en el que la concentración de cationes divalentes ($1,9\text{M Mg}^{2+}$ y $0,4\text{M Ca}^{2+}$) excede a la de cationes monovalentes ($1,6\text{M Na}^+$ y $0,14\text{M K}^+$), y en el que el pH es relativamente bajo, cercano a 6,0. La vida microbiana también se ha adaptado a entornos que combinan altas concentraciones de sal con valores extremadamente altos de pH. Un ejemplo son los lagos de salados alcalinos de África, India, China y otros lugares con valores de pH de 11 y concentraciones de sal superiores a 300 g/l que están llenos de vida (Oren, 1988).

Kushner y Kamekura en 1988 establecen la siguiente clasificación de los microorganismos en función a la concentración de NaCl requerida para su desarrollo óptimo:

- **Microorganismos no halófilos**, crecen óptimamente en medios con menos de 0,2M de NaCl (<1%, p/v). Dentro de este grupo algunos pueden tolerar elevadas concentraciones de sal y se les denominan microorganismos **halotolerantes**. Si toleran hasta una concentración salina de 2,5M de NaCl (15%, p/v), se denominan microorganismos halotolerantes extremos.
- **Microorganismos halófilos débiles**, son aquellos que crecen óptimamente en medios con una concentración comprendida entre 0,2 y 0,5M de NaCl (1-3%, p/v). A esta categoría pertenecen los microorganismos marinos.
- **Microorganismos halófilos moderados**, crecen óptimamente en una concentración de NaCl de 0,5-2,5M (3-15%, p/v).
- **Microorganismos halófilos extremos**, presentan un crecimiento óptimo entre 2,5-5,2M de NaCl (15-32%, p/v).

Los dos grupos de microorganismos predominantes en los ambientes hipersalinos son los halófilos moderados y halófilos extremos (Benlloch y col., 2002; Rodríguez-Valera, 1988; Rodríguez-Valera y col., 1985) y se pueden encontrar en cada uno de los tres dominios: *Archaea*, *Bacteria* y *Eucarya* (Figura 1.2).

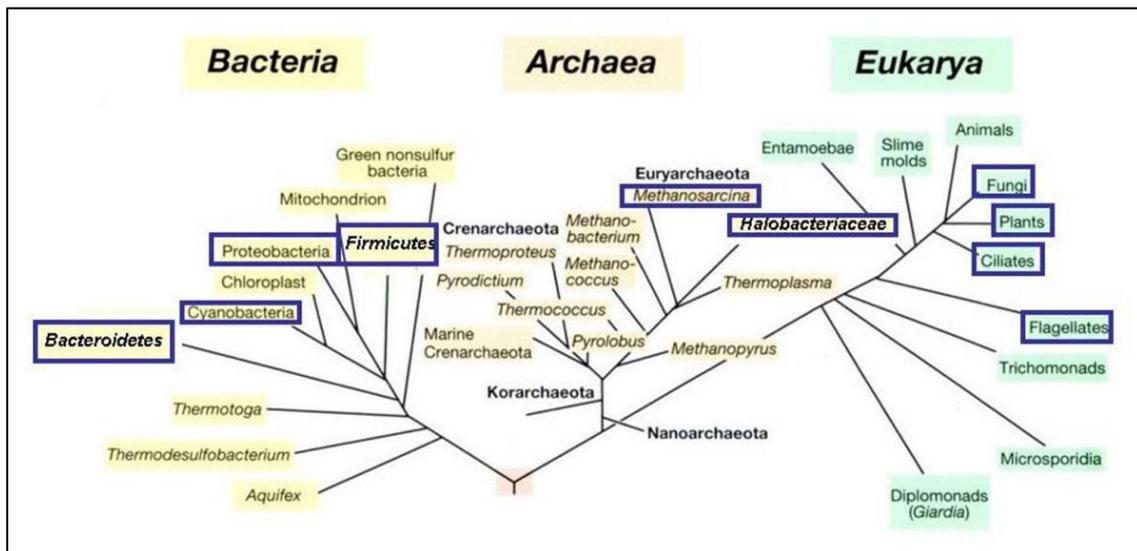


Figura 1.2. Árbol filogenético universal. Los grupos marcados con cuadros azules poseen al menos un microorganismo halófilo representativo (Oren, 2008).

Las arqueas halófilas aeróbicas del orden *Halobacteriales* dentro de la Familia *Halobacteriaceae*, son los halófilos por excelencia. Ellas son el componente principal de la biomasa microbiana de tales entornos como el Mar Muerto, lagos hipersalinos de sosa como el Lago Magadi en Kenia y los estanques de cristalizadores de las salinas. La mayoría o la totalidad de la coloración roja de estos lagos se debe a los pigmentos carotenoides C50 (α -bacterioruberina y derivados), que se encuentra en grandes concentraciones en las membranas de la mayoría de los miembros de esta familia (Oren, 1994).

Dentro del dominio *Eucarya*, los halófilos son escasos, de hecho, el único microorganismo de importancia de este dominio, es el alga verde *Dunaliella*, ubicada en ambientes con altas concentraciones de sal. Esta alga es el único o principal productor primario en el Mar Muerto y en muchos otros lagos y lagunas hipersalinas. Existen diferentes especies de *Dunaliella*; muchas de ellas sintetizan grandes cantidades de β -caroteno en condiciones adecuadas, una propiedad explotada en biotecnología. *Dunaliella* es halotolerante en lugar de ser realmente halófila: la mayoría de las cepas pueden crecer en un amplio rango de concentraciones de sal, creciendo incluso en concentraciones relativamente bajas del orden de 1M. También hay un eucariota que juega un papel importante en muchos ambientes con altas concentraciones de sal, el camarón de salmuera *Artemia salina* (Oren, 2002a).

El dominio *Bacteria* contiene muchos tipos de halófilos y microorganismos halotolerantes, repartidos en un gran número de filos. Dentro de este dominio se han descrito microorganismos halófilos moderados o extremos en los filos: *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Thermotogae*, *Cyanobacteria* y *Tenericutes* (De la Haba y col., 2011). El mayor número de taxa se encuentra en *Proteobacteria* y *Firmicutes* (Oren, 2002b).

Rambla Salada fue estudiada por primera vez desde el punto de vista microbiológico por el grupo de investigación “Exopolisacáridos Microbianos” del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, en el año 2005. En este estudio se aislaron y describieron nuevas especies halófilas. En 2006, comenzó un estudio más exhaustivo de dicho ambiente, analizándose concretamente la biodiversidad procariota cultivable en diversos puntos de Rambla salada empleando técnicas de cultivo clásicas y técnicas moleculares.

1.3. Microorganismos procariotas que aún no han sido cultivados

Los microorganismos procariotas constituyen el principal componente de la diversidad de cualquier ecosistema y son los seres vivos más abundantes en nuestro planeta (Ferrer, 2004; Pedrós-Alió, 2006). Aun siendo tan abundantes, hasta la fecha solo se ha podido cultivar un pequeño porcentaje de éstos (Lloyd y col., 2019; Nguyen y col., 2018; Stewart, 2012; Green y Keller, 2006; Leadbetter, 2003, Ward y col., 1990). Específicamente en suelos, los estudios de las secuencias del gen del ARN ribosomal 16S han revelado que existen 4×10^6 taxones microbianos diferentes por tonelada de suelo y 10^9 células por gramo de suelo, de los cuales más del 99% continúan aun sin ser cultivados (Chaudhary y col., 2019) y, aunque las técnicas moleculares permitan el estudio de la diversidad y el rol de los microorganismos en el ambiente, su cultivo es útil y necesario para entender el metabolismo y las funciones de estos organismos (Pham y Kim, 2012).

La primera evidencia de que no todas las bacterias de un determinado entorno crecían en los medios de laboratorio procedió de la microscopía: el número de células que se observaron al microscopio superaba con creces el número de colonias que crecían en una placa de petri. Esto se denominó “la gran anomalía del recuento en placa” y la magnitud de la anomalía podría llegar a varios órdenes de magnitud. Se propuso que se trataban de células muertas y por lo tanto nunca crecerían. Posteriormente, se demostró que muchas de estas células estaban metabólicamente activas, a pesar de que no podían crecer en los medios de laboratorio (Stewart, 2012).

La evaluación de la diversidad de los procariotas estuvo limitada, al estudio de la microbiota que podía ser aislada y cultivada en el laboratorio por técnicas de enriquecimiento y cultivo clásicas. Hoy en día, gracias a las técnicas moleculares se sabe que éstas técnicas sólo permiten el desarrollo de algunos microorganismos (Rappé y Giovannoni, 2003). A finales de los años 80 y principios de los 90 se publicaron unos trabajos que demostraron que la naturaleza estaba llena de procariotas desconocidos. Los autores de estos artículos aplicaron técnicas moleculares para identificar los microorganismos *in situ* a través de la secuencia de su gen ribosomal 16S. Desde entonces, numerosos trabajos han demostrado, no solo la abundancia y diversidad de procariotas, sino que los tipos que aún no hemos logrado cultivar por métodos clásicos son los más abundantes en la naturaleza, pudiendo estos microorganismos tener un importante papel ecológico y ser productores de sustancias de interés biotecnológico (Nichols, 2007).

En cuanto a los hábitats salinos, nos encontramos con una situación similar, la mayoría de las especies cultivables se encuadran dentro de los filos *Proteobacteria* y *Firmicutes* (Oren, 2002b), sin embargo los estudios ecológicos moleculares están poniendo de manifiesto la abundancia de *Bacteroidetes*, *Plantomyces* y otros taxones de los cuales hay poco o ningún representante (Pedrós-Alió, 2006). Lloyd y col., 2019 estimaron mediante análisis de datos de metagenomas y metatranscriptomas, que casi la mitad de las arqueas y bacterias de ambientes hipersalinos provienen de géneros cultivados y muy pocas de filos no cultivados.

1.4. Técnicas y estrategias para el cultivo de procariontas que aún no se han podido cultivar

Las bacterias que pueden ser cultivadas en el laboratorio son sólo una pequeña fracción de la diversidad total que existe en la naturaleza. El término “no cultivable” indica que las técnicas de cultivo actuales no permiten el crecimiento de una determinada bacteria en el laboratorio, lo que no significa que nunca pueda ser cultivada, sino más bien, que carecemos de la información crítica sobre su biología. Esto representa tanto retos como oportunidades para aprender los principios moleculares que están detrás del crecimiento recalcitrante y obtener acceso a la diversidad metabólica hasta ahora desconocida (Stewart, 2012).

La diversidad microbiana se ha medido por cultivos de bacterias en medios de laboratorio y por enfoques moleculares basados en metodologías relacionadas con el gen ribosomal ARNr 16S. Sin embargo, durante los pasados 25 años, son muchos los avances que se han hecho en las técnicas basadas en cultivos, y que han contribuido significativamente a nuestra comprensión acerca de los microorganismos vivos. El objetivo del cultivo *in situ* es crear sistemas artificiales que mimeticen las condiciones naturales. Sin embargo, algunas condiciones naturales son difíciles de mimetizar como la química de un hábitat natural, las interacciones de los factores bióticos y abióticos, la diversidad de microbios, el efecto de los cambios climáticos y otras funciones en los ecosistemas a nivel microbiano (Pham y Kim, 2012). Algunas de las estrategias se describen a continuación:

1.4.1. Empleo de medios modificados

Esta estrategia se basa en el diseño medios de cultivo específicos que permitan adaptar las condiciones de aislamiento al hábitat natural del microorganismo, entre ellos, la disminución del contenido en nutrientes, ya que las concentraciones elevadas de nutrientes son atípicas en la gran mayoría de los medios naturales, inhibiendo así el crecimiento de los microorganismos oligotrofos (Janssen, 2008). Otro método es el uso de extractos de suelo con agar como agente solidificante o medios que contienen ingredientes complejos diluidos como extracto de levadura o peptona y que permiten obtener taxa anteriormente no cultivables (Davis y col., 2005; Joseph y col., 2003).

Algunos microorganismos requieren diferentes componentes a concentraciones específicas para su cultivo, tal es el caso de *Tannerella forsythia* que necesita ácido N-acetil-murámico para crecer, mientras *Abiotrophia spp.* y *Granulicatella spp.* requieren piridoxal o L-cisteína (Vartoukian y col., 2010). Utilizando medios bajos en nutrientes, se han logrado aislar especies pertenecientes a los filos bacterianos *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Proteobacteria*, y *Verrucomicrobia* (Pham y Kim, 2012). De igual forma, cambiando las condiciones de cultivo como por ejemplo, la concentración de oxígeno o adicionando ácidos húmicos y moléculas de señalización, se ha conseguido aumentar la presencia de algunos microorganismos nuevos en el suelo (Stevenson y col., 2004).

También, los medios de cultivo pueden ser sometidos a tiempos de incubación más prolongados y en atmósferas con diferentes concentraciones de gases como CO₂ (Davis y col., 2005) así como, aproximando el pH de los medios de cultivos al pH real de los hábitats objetos de estudio.

1.4.2. Modificaciones de las condiciones de crecimiento

Las condiciones de cultivo, tales como el período de incubación, la temperatura, el pH y las concentraciones de CO₂/O₂, son importantes para mimetizar las condiciones naturales y lograr el cultivo de bacterias hasta ahora no cultivadas.

Tiempo de incubación: El aumento del período de incubación es uno de los factores más importantes cuando se trata de identificar aislados exigentes y de crecimiento lento. Incubaciones prolongadas entre 5 y 12 semanas han permitido el cultivo de cepas de grupos tanto conocidos como nuevos (Davis y col., 2005; Stevenson y col., 2004; Jassen y col., 2002). Se han aislado con éxito nuevas cepas bacterianas con periodos de incubación prolongados de los siguientes filos: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Chloroflexus*, *Gemmatimonadetes*, *Planctomydetes* y *Verrucomicrobia* (Pham y Kim, 2012).

Aire: La incubación en presencia de aire y atmósferas hipóxicas y anóxicas y añadiendo una concentración elevada de CO₂ se emplean para aislar diversas bacterias que viven en diferentes microhábitats en el suelo, especialmente para autótrofos. Un ejemplo de ello, es el aislamiento de nuevas bacterias anaerobias del orden *Verrucomicrobiales* a partir de suelos de arrozales anóxicos utilizando medios no oxigenados (Janssen y col., 1997) y una amplia variedad de diazotrofos aeróbicos, anaeróbicos facultativos y microaeróbicos, a partir de agua de mar usando medios de cultivos con gradiente de O₂ (Riemann y col., 2010).

Temperatura: Debido a que las temperaturas bajas disminuyen la tasa metabólica, también se disminuye la producción de sustancias inhibitoras del crecimiento, favoreciendo así, la aparición de más aislados. Las bacterias del suelo frecuentemente crecen mejor en un rango de temperatura de 20-25°C en lugar de 30°C (Janssen, 2008).

pH: Es un factor crítico para cultivar bacterias del suelo aun no cultivadas. Los medios de cultivo más comúnmente utilizados tienen un pH cercano a la neutralidad y un contenido de sal de 1-3 g/l. El diseño de medios con valores bajos de pH similares al

agua de turbas (pH 3,5 a 5,5) y con contenidos de sal mineral de 5-50 mg/l, han permitido el cultivo de bacterias que habitan estos ambientes y que no se desarrollan en medios convencionales (Pham y Kim, 2012).

1.4.3. Simulación de los ambientes naturales

Es difícil replicar un entorno natural a un alto nivel de fidelidad, si no se conocen los parámetros importantes para el crecimiento de un taxón bacteriano propio de ese entorno. Por lo tanto, una alternativa es tomar las bacterias y el medio ambiente donde crecen y llevarlas al laboratorio. El desafío de este enfoque es separar los microorganismos de interés del resto de la población microbiana (Stewart, 2012). Para ello, se emplean las cámaras de difusión y el método de dilución a extinción:

1.4.3.1. Uso de cámaras de difusión

Se han diseñado cámaras de difusión selladas que encierran la bacteria dentro de una cámara semipermeable donde las células son incapaces de atravesar la membrana pero los nutrientes y factores de crecimiento del medio ambiente si son capaces de hacerlo. La evaluación microscópica de las cámaras revela crecimiento de microcolonias dentro de ellas, la mayoría de las cuales podrían además aislarse y propagarse por reinoculación en cámaras frescas. La comparación del número de microcolonias en crecimiento con recuentos microscópicos de células del inóculo inicial ha conseguido tasas de recuperación de hasta 40%. Sin embargo, cuando el mismo inóculo es sembrado en placas de petri para obtener colonias, la tasa de recuperación es de 0,05%. Las microcolonias de las cámaras en estos casos pudieron ser aisladas en cultivo puro. Estos resultados demuestran que el propio medio ambiente podría ser una herramienta poderosa para obtener acceso a bacterias que no han podido ser cultivadas en el laboratorio. Esta técnica también ha demostrado ser eficaz fuera del medio ambiente marino (Stewart, 2012). Con este método se ha conseguido el enriquecimiento de actinobacterias filamentosas, con una mayor diversidad y número, incluyendo aislados de grupos raros, a través de una modificación de la cámara en una trampa, de tal manera que una de las membranas que posee un tamaño de poro suficientemente grande permite el crecimiento de bacterias filamentosas por hifas, sin embargo las bacterias no filamentosas no pueden atravesar esta membrana (Ferrari y Gillings, 2009).

1.4.3.2. Técnica de dilución “a extinción”

En el método de dilución “a extinción” se llevan a cabo una secuencia de diluciones hasta que sólo una o unas pocas bacterias están presentes en un volumen de cultivo dado a fin de reducir las interacciones interespecíficas y aumentar la sensibilidad de detección de células con tasas de crecimiento lento o especies que aparentemente no eran cultivables. El fraccionamiento de las células en los pocillos permite que el número de especies cultivables aumente a medida que disminuye la densidad del inóculo

(Stewart, 2012; Collado y col., 2007; Button y col., 1993). Esta técnica se empleó para el cultivo de un representante del clado SAR11 de *Alphaproteobacteria* que se denominó inicialmente como "*Candidatus Pelagibacter ubique*". Este clado fue originalmente identificado como un importante productor primario en los océanos y un primer ejemplo de bacteria ubicua no cultivable. También es el clado con la mayor abundancia de organismos que poseen una bomba de protones impulsada por la luz llamada proteorodopsina, a la cual se le atribuye un importante impacto global en el balance de carbón y energía en los océanos. Para su aislamiento se empleó agua de mar como medio de cultivo, y al tratarse de microorganismos muy abundantes en las muestras se utilizó el método de dilución a extinción (Rappe y col., 2002).

Utilizando también este método con agua de mar como medio de cultivo y combinado con una técnica de encapsulamiento de células bacterianas individuales en microgotas de agarosa solidificada, se consiguió detectar mayor diversidad que utilizando agua de mar con nutrientes añadidos, comprobando que el entorno natural puede ser esencial para el crecimiento en el laboratorio de bacterias no cultivables. Así, se ha conseguido aislar miembros del orden *Planctomycetales* anteriormente no cultivados, algunos de los cuales mostraron identidad menor al 84% con secuencias válidamente descritas obtenidas por cultivo u otros métodos (Zengler y col., 2002). De igual forma, la técnica de dilución a extinción permitió el cultivo de bacterias planctónicas psicrotolerantes de lagos permanentemente cubiertos de hielo en los valles secos de McMurdo de la Antártida (Stingl y col., 2008).

1.4.4. Cocultivo

Algunas bacterias no crecen a menos que se cultiven cerca de otras bacterias del mismo ambiente, demostrando así una dependencia de cocultivo (Stewart, 2012). Son numerosos los ejemplos en donde se evidencia este fenómeno. Por ejemplo, se ha logrado obtener mayor crecimiento de *Catellibacterium nectarophilum* a partir de una planta de tratamiento de aguas residuales en presencia de medio agotado por otra bacteria. También se ha conseguido identificar una serie de microorganismos termófilos anaerobios de la familia *Clostridiaceae* que dependen del extracto de células de *Geobacillus toebii*. Sin embargo, en ambos casos, aún no se han identificado los factores que promueven su crecimiento (Tanaka y col., 2004; Kim y col., 2011). De igual forma, el género bacteriano fotosintético *Prochlorococcus* aunque se ha cultivado en agua de mar y sintética, los aislamientos dependen del cocultivo con bacterias heterotróficas que reducen el estrés oxidativo favoreciendo su crecimiento (Moore y col., 2007). *Maribacter polysiphoniae* KLE1104 elegida como modelo para identificar su mecanismo de codependencia, además de depender de bacterias del medio ambiente fue también capaz de crecer junto a una cepa de *E. coli* de laboratorio en una placa de petri. Esto permitió el uso de mutantes de *E. coli* para identificar los genes involucrados en la producción del factor de crecimiento revelando que, los mutantes en la vía de síntesis de la enterobactina fueron incapaces de inducir el crecimiento de la bacteria. La enterobactina es un sideróforo, capaz de solubilizar hierro oxidado (Fe^{+3}) y de esta manera hacer disponible este nutriente esencial para la bacteria (D'Onofrio y col., 2010).

Los microorganismos que dependen de otros para su crecimiento, aparentemente han perdido la capacidad de llevar a cabo procesos esenciales por ellos mismos y por tanto, también han perdido la capacidad de crecer en nuevos entornos en los que los microorganismos no están presentes. Esto puede ser explicado como un "engaño evolutivo" mediante el cual las bacterias evitan el costo de la realización de estas funciones aprovechándose de sus vecinos. También es posible que en realidad estén utilizando la presencia de ayudantes específicos como una señal de un entorno propicio para iniciar el crecimiento. Una alternativa a estas hipótesis, es la llamada "hipótesis de la reina negra" en analogía con el juego de cartas del mismo nombre (Morris, y col., 2012). Según esta teoría, los organismos pierden funciones que se complementan con sus vecinos, de forma similar a la hipótesis del tramposo. Sin embargo, se sugiere que esta dependencia de organismos auxiliares es adaptativa, ya que crea la especialización dentro de las comunidades microbianas que son impulsadas por la selección individual, lo que resulta en una mayor aptitud para toda la comunidad (Stewart, 2012).

1.5. Aplicaciones biotecnológicas de los microorganismos halófilos

El estudio de la diversidad microbiana se ha convertido en una de las líneas de investigación más relevantes en el área de la Ecología Microbiana, no sólo por su papel en el conocimiento de la función, estructura y evolución de las poblaciones que componen una comunidad microbiana, sino como una fuente importante de investigación médica y biotecnológica (Oueriaghli y col., 2010). Los microorganismos halófilos se emplean en diversas aplicaciones biotecnológicas. Algunas aplicaciones se conocen desde hace más de cien años y existieron antes de que fuesen entendidos sus aspectos microbiológicos. En los últimos años, el número de usos en biotecnología de microorganismos halófilos se ha incrementado, y se encuentran en desarrollo numerosas aplicaciones adicionales (Oren, 2002a).

Las enzimas halófilas, típicas de las arqueas y de la bacteria halófila extrema *Salinibacter* sp. así como las exoenzimas de otros microorganismos halófilos, se caracterizan por presentar un exceso de aminoácidos ácidos y una carga superficial negativa. Esta peculiaridad les permite competir en soluciones con baja actividad de agua, incluyendo mezclas de disolventes orgánicos/agua. Entre las ventajas más inmediatas de la tecnología de enzimas podríamos destacar: el incremento de la tolerancia a la sal y al calor, un entorno catalítico que permite el uso de productos menos polares, y un potencial de inversión de reacciones hidrolíticas, las cuales las hacen fuertes candidatos para la biocatálisis industrial. Una aplicación industrial cada vez más importante de las enzimas es la producción estereo-específica de moléculas estructurales en la construcción de productos farmacéuticos en la llamada "biotecnología blanca". Un ejemplo de ello, es la producción estereo-específica de alcoholes a partir de cetonas. Otras enzimas estudiadas y con posibles aplicaciones biotecnológicas son proteasas, celulasas, lipasas, amilasas y manasas. Los metabolitos secundarios y, en particular, los productos de los actinomicetos halófilos han ganado interés en la producción de nuevos antibióticos. En el contexto de descubrimientos de nuevos quimioterápicos, algunos compuestos de actinomicetos aislados de salinas han

mostrado efecto citotóxico contra una amplia gama de líneas celulares de cáncer (Ma y col., 2010).

La producción de algunas enzimas citoplasmáticas sal-resistentes, e incluso, sal-dependientes, se pueden encontrar dentro de grupos de microorganismos que mantienen altas concentraciones iónicas intracelulares, tales como las arqueas del orden *Halobacteriales*. Además, todas las exoenzimas excretadas por los halófilos son activas en presencia de las altas concentraciones de sal que se encuentran en su medio, incluso cuando los organismos que los producen mantienen bajas concentraciones iónicas intracelulares. Muchas enzimas halófilas son también consideradas termófilas (Oren, 2002a). Mientras que anteriormente, las investigaciones iban dirigidas a la producción de polímeros extracelulares halófilos y al estudio de sus propiedades reológicas, en los últimos años, ha ganado atención la producción y aplicación de los poliésteres intracelulares. Algunas bacterias halófilas o halotolerantes han demostrado ser excelentes productoras de bioplásticos como el poli- β -hidroxialcanoato, un polímero biodegradable con propiedades similares al plástico. Un ejemplo de ello es *Halomonas boliviensis* (Van-Thuoc y col., 2010).

Una historia de éxito de la biotecnología halófila es la producción y la aplicación del soluto compatible "ectoína", actualmente producida a gran escala en Alemania por el método conocido como "ordeño de bacterias" a partir de *Halomonas elongata*. La ectoína es el ingrediente activo de muchos productos cosméticos y de cuidado de la piel y cada vez se hace más importante en las preparaciones medicinales. Además, la ectoína y sus derivados se utilizan como protectores para biomoléculas y potenciadores en aplicaciones de la biología molecular tales como la PCR y las técnicas de microarrays de ADN (Graf y col., 2008).

La aplicación de microorganismos halófilos también ha sido demostrada en investigaciones para la biorremediación de suelos contaminados con petróleo. Un nuevo aislado, similar a *Alcanivorax dieselolei*, es capaz de crecer en el petróleo crudo, en combustible diesel y en hidrocarburos alifáticos pero no degrada los compuestos aromáticos. Sin embargo, un consorcio con seis cepas incluyendo *Marinobacter* y *Halomonas sp.* fue capaz de degradar varios hidrocarburos poliaromáticos sobre un rango de salinidad del 1 al 17% de NaCl (Ma y col., 2010).

1.6. Bacterias promotoras de crecimiento y agentes de biocontrol

Dentro de la gran cantidad de comunidades microbianas del suelo podemos encontrar microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas. Estos microorganismos pueden ser bacterias, hongos o algas que, asociados a las plantas promueven efectos favorables en condiciones de estrés ambiental. Las rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (PGPR, del inglés *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) están presentes en el suelo tanto en forma libre como en asociación simbiótica con sus huéspedes y, están involucradas en la fertilidad del suelo, la germinación de semillas, la proliferación de raíces y el crecimiento de las plantas (Tiwari y col., 2019).

Las bacterias promotoras de crecimiento pueden actuar mediante mecanismos directos como la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas, la solubilización de fosfato y el aumento de la disponibilidad de hierro utilizado para promover el crecimiento de las plantas mediante la secreción de sideróforos. Por otra parte, los mecanismos indirectos están relacionados con la competencia por espacio físico, producción de enzimas, antibióticos y compuestos volátiles como acetoina y el 2,3 butanodiol, la eliminación de patógenos, inducción de respuestas de defensa sistémica de las plantas, la reducción del estrés por salinidad, la remediación de metales pesados y la resistencia a la sequía (Siyar y col., 2019; Kannoja 2019; Kumari y col., 2019; Whipps, 2001).

El uso de bacterias promotoras de crecimiento para una agricultura sostenible y respetuosa con el medio ambiente ha aumentado a nivel mundial durante las últimas décadas debido al aumento de los costos de los fertilizantes químicos y su impacto negativo en el medio ambiente. Los bioestimulantes basados en bacterias promotoras de crecimiento mejoran la absorción de nutrientes y la tolerancia al estrés como la sequía, la salinidad, etc. Hay varias formulaciones registradas de PGPR en el mercado, incluidas las especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Azobacter*, *Variovorax*, *Azospirillum* y *Serratia*, sin embargo, la utilización de PGPR en la industria agrícola representa solo una pequeña fracción de la práctica agrícola en todo el mundo (Kumari y col., 2019).

Las PGPR como agentes de control biológico (BCA, del inglés *Biological Control Agents*) inducen mecanismos de defensa sistémicos en las plantas y proporcionan una mayor resistencia al huésped frente al ataque de diferentes patógenos mediante mecanismos como la competencia, el antagonismo y la producción de compuestos con actividad antibiótica frente a patógenos. Su uso es más ventajoso que los compuestos químicos usados regularmente, ya que no son tóxicos, habitan naturalmente la rizosfera, son ecológicos y no son perjudiciales para el medio ambiente (Kannoja y col., 2019).

Las características que deben poseer las bacterias PGPR son las siguientes: tener una alta competitividad rizosférica, contar con un amplio espectro de acción, tener una actividad elevada y constante, ser seguras para el medio ambiente, ser compatible con otras rizobacterias y ser resistente a la desecación, calor, agentes oxidantes y radiaciones UV (Jeyarajan y Nakkeeran, 2000).

La agricultura está sujeta a diversos factores exógenos que pueden dificultar su desarrollo, entre ellos, el estrés abiótico y el estrés biótico. En este último se incluyen las enfermedades de las plantas causadas por hongos, bacterias, virus y nematodos que generan pérdidas e incrementan costos en la producción agrícola (Agrillo, 2019).

En Andalucía la comunidad autónoma con mayor producción de aceite de oliva y aceitunas de mesa en España y el principal productor del mundo las enfermedades causadas por hongos y bacterias y que afectan al cultivo del olivar están descritas en la guía de gestión integrada de plagas del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (2014) y son: repilo (*Fusicladium oleagineum/Spilocaea oleagina*), verticilosis (*Verticillium dahliae*), emplomado o repilo plomizo (*Pseudocercospora cladosporioides*), escudete (*Bostryosphaeria dothidea*), lepra (*Phlyctema vagabunda*), tuberculosis (*Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi*), negrilla (*Capnodium* sp., *Limacinula* sp.,

Aureobasidium sp.) y antracnosis o aceituna jabonosa (*Colletotrichum spp.*). Entre estas la verticilosis es una de las principales infecciones.

1.7. Verticilosis

El marchitamiento por *Verticillium* en el olivo (*Olea europea*) o verticilosis del olivo es causado por el hongo del suelo *Verticillium dahliae* Kleb. y es una enfermedad destructiva ampliamente distribuida en todas las regiones del mundo donde crecen árboles de olivo, ocasionando grandes problemas a agricultores, viveros y a la industria del aceite de oliva (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). Se encuentra ampliamente distribuida en todos los países de la Cuenca Mediterránea. Fue descrita por primera vez en Italia por Ruggieri en 1946 y diagnosticada en España en 1979 en olivares experimentales del actual Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera (IFAPA) en Córdoba. Algunos estudios aleatorios en olivares de las provincias de Córdoba, Jaén y Sevilla entre 1980 y 1983 indicaron que ya se encontraba ampliamente establecida en el valle del Guadalquivir. Desde entonces, la distribución de la verticilosis del olivo se ha extendido a todas las provincias andaluzas, asociada aparentemente con las innovaciones agronómicas que han tenido lugar en el manejo del cultivo para incrementar su productividad (por ejemplo, la propagación viverista del material de plantación o la extensión del regadío, entre otras.), alcanzando prevalencias de hasta el 70% de los olivares e incidencias de hasta 50% de olivos enfermos en las plantaciones afectadas (Jiménez-Díaz y col., 2015). España es el principal productor de aceite de oliva, por lo que la verticilosis del olivo constituye un grave problema (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2010). En la campaña 2018/2019 se produjeron en España 1.417.417 toneladas de aceite de oliva, de las cuales el 80,52 % fueron producidas en Andalucía, donde la incidencia de *V. dahliae* es importante (Agencia de Información y Control Alimentarios, AICA).

V. dahliae es capaz de infectar e inducir la enfermedad a más de 400 especies vegetales, todas ellas dicotiledóneas. Además, el hongo es capaz de colonizar especies monocotiledóneas y malas hierbas sin causar síntomas, por lo que estas especies pueden actuar como reservorio de inóculo capaz de iniciar un brote de verticilosis (Keykhasaber y col., 2017; Berlinger y Powelson, 2000).

Los olivos tienen un período juvenil largo antes de entrar en producción y durante este tiempo es mayor la probabilidad de ser atacado por el organismo patógeno. A lo largo de su vida pueden sufrir infecciones repetidas en la misma o en sucesivas temporadas, pudiendo ocasionar retraso en el crecimiento, muerte de árboles tanto jóvenes como adultos, e importantes reducciones de rendimiento. Sin embargo, es más común que un árbol sólo sea afectado durante un determinado período de crecimiento, con una severidad variable de síntomas de marchitamiento, limitando o deteniendo el crecimiento del árbol y la producción. Como la floración ocurre en brotes de un año de edad, si éstos están afectados por la enfermedad, su producción se perderá en la siguiente temporada. No obstante, muchos árboles con verticilosis pueden llegar a superar la enfermedad como resultado de la producción de nuevos tejidos alrededor de

las lesiones necróticas, y las ramas recuperadas de árboles afectados pueden alcanzar niveles normales de rendimiento en los siguientes periodos de crecimiento (Deketelaere y col., 2017; López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

Se distinguen dos tipos de síndromes de la verticilosis en el olivo: agudo y crónico, conocidos como apoplejía y decaimiento lento, respectivamente (Jiménez-Díaz y col., 1998). La apoplejía, es de desarrollo rápido e implica marchitamiento severo de las ramas principales y secundarias y se produce principalmente a finales del invierno e inicios de la primavera bajo las condiciones de la cuenca del Mediterráneo. Inicialmente las hojas muestran clorosis o pérdida de la coloración, luego cambian a marrón claro y se doblan sobre si mismas permaneciendo unidas a las ramas (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). El marchitamiento de brotes y ramas suele comenzar desde la punta de las ramas hacia el tallo y puede ocasionar la muerte del árbol principalmente en árboles jóvenes. La corteza de las ramas afectadas puede tomar color morado o púrpura y a veces también se observa una coloración marrón en los tejidos del xilema. El decaimiento lento, se caracteriza por una fuerte defoliación de hojas verdes excepto las del extremo distal, clorosis foliar y la momificación y muerte de las inflorescencias. Estos síntomas se inician en la primavera y progresan lentamente hasta inicios del verano. En un mismo árbol se pueden observar ambos tipos de síndromes. La incidencia y severidad de la verticilosis disminuye con la edad de la planta y disponibilidad de potasio mientras que aumenta con el exceso de nitrógeno (Jiménez-Díaz y col., 1998).

La severidad de los ataques de verticilosis del olivo depende de la virulencia del patotipo de *V. dahliae* que infecta el árbol. Tradicionalmente, los aislados de *V. dahliae* que se encuentran infectando olivos se han clasificado de acuerdo a su capacidad para causar la caída completa de las hojas verdes en: patotipo defoliante (D o raza 2) y no defoliante (ND o raza 1) (Varo y col., 2016). El patotipo D es altamente virulento y causa síntomas graves, incluyendo marchitez, clorosis, defoliación, decoloración vascular, reducción drástica de peso y altura y senescencia. Puede producir la muerte de árboles enteros o la seca de ramas ocasionando un retraso en el crecimiento y mermas de producción (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011). El patotipo ND causa casi los mismos síntomas pero en niveles bajos (defoliación de las hojas) y moderados (clorosis o necrosis); del mismo modo induce reducción de peso y altura.

V. dahliae presenta micelios hialinos simples o ramificados, septados y multinucleados (Fradin y Thomma, 2006), mientras que los conidios son uninucleados y se agregan en forma de pequeñas gotas en la punta de las fiáldes, que se organizan en espirales sobre conidióforos no ramificados y erectos denominados verticilios (Jiménez-Díaz y col., 2012) (Figura 1.4).

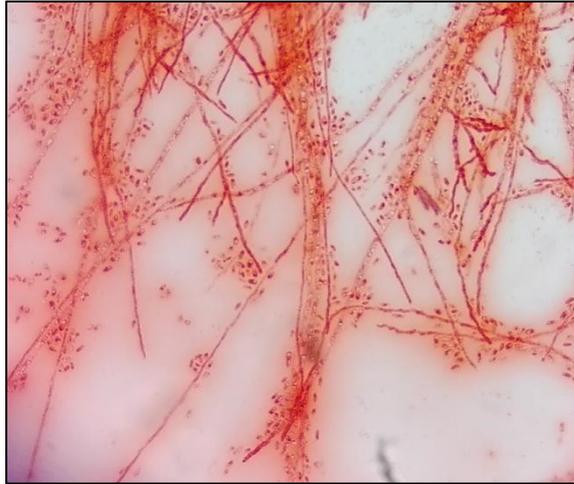


Figura 1.4. Micelio de *V. dahliae*. Tinción diferencial con safranina. Fotografía obtenida en este estudio.

V. dahliae forma estructuras de resistencia conocidas como microesclerocios que le permiten sobrevivir y diseminarse en el suelo y sobre restos de plantas afectadas. En primer lugar, una vez que las células de los microesclerocios germinan generando hifas o filamentos, son atraídas por un gradiente de nutrientes hacia las raíces (Fradin y Thomma, 2006). Estas estructuras recubren principalmente la zona de elongación de la raíces y tienen la capacidad de invadir a través de tejidos sanos o por heridas. Después de la invasión de la raíz, el micelio pasa al sistema vascular colonizando células epidérmicas y corticales, ya sea mediante la proliferación de hifas o la formación de apresorios (Prieto y col., 2009; Vallad y Subbarao, 2008, Berlanger y Powelson, 2000). Este proceso invasivo ocurre de manera similar tanto en cultivos susceptibles a la infección como en los resistentes (Vallad y Subbarao, 2008).

Tras esta primera etapa, el hongo progresa hacia el xilema del hospedador, donde la colonización lo conduce hacia los tejidos aéreos alterando la distribución del agua y de los nutrientes, ocasionando el desarrollo de los síntomas característicos de verticilosis (Figura 1.5). Una vez colonizado el sistema vascular, se aprecia un descenso de la presencia del patógeno en las raíces hasta que se vuelve indetectable (Vallad y Subbarao, 2008; Prieto y col., 2009). El progreso a través del sistema vascular se da por la formación de conidios que son transportados por el fluido xilemático hasta que quedan atrapados en cavidades, donde germinan formando nuevas hifas que colonizan tejidos vecinos (Fradin y Thomma, 2006).

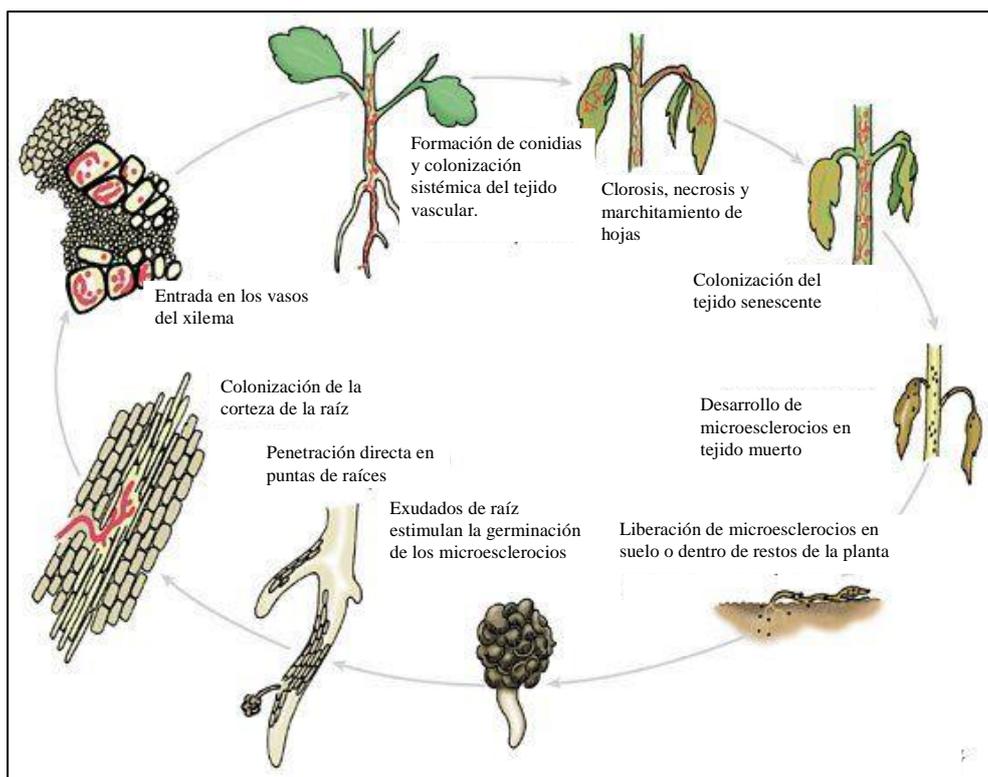


Figura 1.5. Ciclo de vida de *Verticillium dahliae* (Berlanger y Powelson, 2000. Sociedad Americana de Fitopatología).

En este punto es donde la planta puede recuperarse de la infección, ya que podría aislar el patógeno ocluyendo los vasos infectados gracias a la deposición de lignina en las raíces o de suberina en los tejidos vasculares, tras lo cual libera compuestos antimicrobianos como fitoalexinas, terpenos o compuestos fenólicos, e incluso enzimas como quitinasas y glucanasas para tratar de eliminar el hongo, además de generar nuevas capas de xilema (Fradin y Thomma, 2006; Keykhasaber y col., 2017; Gharbi y col., 2017). Otra respuesta del hospedador es la generación de especies reactivas del oxígeno (ROS), ante las cuales también se generan enzimas detoxificadoras, cuya producción es mayor en variedades resistentes (Gharbi y col., 2016). La respuesta desencadenada en las variedades resistentes es totalmente diferente que la de las susceptibles a la infección, ya que un estudio metatranscriptómico ha determinado que muy pocos genes comunes se activan tras la infección en ambas variedades (Leyva-Pérez y col., 2017). *V. dahliae* es capaz de superar estos mecanismos de defensa por la activación de la transcripción de genes relacionados con la respuesta antioxidante y de genes de virulencia como los codificantes de proteínas de unión de quitina (Jiménez-Ruiz y col. 2017). Si el hongo es capaz de superar estas barreras, la infección llega hasta las hojas e inflorescencias, donde se forman microesclerocios que servirán de nuevo de inóculo primario cuando caigan al suelo (Trapero y col., 2009).

Diversos factores dificultan el control de la verticilosis del olivo, entre los que podemos mencionar: i) la capacidad de producción y diseminación de los microesclerocios capaces de resistir en el suelo por periodos de tiempo prolongados, aproximadamente 10 años; ii) el amplio rango de hospedadores que pueden ser colonizados incluso sin

causar síntomas, lo que incrementa la capacidad de supervivencia del patógeno en el suelo; iii) la pérdida de efectividad de fungicidas debido a la ubicación patógeno dentro de los vasos del xilema durante su fase parasitaria; iv) la presencia de la variabilidad genética en las poblaciones de *V. dahliae* que residen en el suelo donde el olivo se haya establecido, lo que explica la existencia de virulencia diferencial (patotipos D y ND) (Deketelaere y col., 2017; Varo y col., 2016; López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

Entre las medidas preventivas para el control de la verticilosis del olivo se incluyen: la cuarentena, la certificación de la manipulación del material vegetal, la selección de prácticas de cultivo apropiadas, y el uso de variedades resistentes, así como de medios de control físicos, químicos y biológicos. Sin embargo, la eficacia de estos controles se ve afectada por la variabilidad genotípica y espacio-temporal de las poblaciones del fitopatógeno, además de la evolución y desarrollo de mecanismos de patogenicidad que descartan como estrategia, la selección de especies vegetales resistentes a las enfermedades. En estos casos es necesaria la eliminación de los árboles afectados y la vegetación silvestre circundante que pueda actuar como hospedadora (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

El empleo de agroquímicos es una de las medidas paliativas más utilizadas, sin embargo, su uso está restringido debido al efecto perjudicial sobre el medio ambiente. La guía de gestión integrada de plagas para el cultivo de olivar del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente recopila los productos fitosanitarios frente a la verticilosis disponibles en el mercado y de uso actual en España. Los productos de naturaleza química autorizados para la verticilosis son: Folpet (nocivo, carcinogénico categoría 3, peligroso para el medio ambiente) y Procloraz (nocivo, peligroso para el medio ambiente). Una vez que el patógeno alcanza el tejido vascular de la planta, los fungicidas químicos parecen ser ineficaces (Deketelaere y col., 2017). Esta pérdida de eficacia así como la actual sensibilización ambiental en el manejo de enfermedades y el rechazo social hacia estos insumos, han intensificado la búsqueda de métodos alternativos para el control de la verticilosis (Varo y col., 2016).

Ya que en la actualidad no existe un método eficaz para combatir la enfermedad y ninguna de las medidas de control disponibles es suficientemente eficaz cuando se aplica de forma individual, se hace necesaria la aplicación de una estrategia de manejo integral de la enfermedad. Esta estrategia debe basarse en el desarrollo y aplicación de medidas preventivas de control (antes de la siembra) y paliativas (después de la siembra) (Deketelaere y col., 2017; Tjamos, 1993; Blanco-López y Jiménez-Díaz, 1995; Tjamos y Jiménez-Díaz, 1998).

Un enfoque interesante para el control de la verticilosis es el uso de bacterias PGPR como agentes de control biológico. La interacción de estas bacterias con las plantas ofrece ventajas, pues no sólo producen metabolitos con actividad antimicrobiana sino que, además, interactúan directa e indirectamente con las plantas para protegerlas del efecto perjudicial de los patógenos, colonizando espacios y compitiendo por nutrientes, induciendo resistencia sistémica o promoviendo el crecimiento de la planta mediante la liberación de fitohormonas y nutrientes, entre otros productos (Whipps, 2001).

Entre las características deseables de un agente de biocontrol frente a la verticilosis se mencionan: la capacidad para inhibir la germinación de las esporas, colonizar el xilema

y/o la corteza y competir con el patógeno por nutrientes y/o espacio, inducir respuestas de resistencia en la planta y/o promover el crecimiento de la planta. Los potenciales agentes de biocontrol deben evaluarse y seleccionarse en condiciones similares a la situación del cultivo en el campo para aumentar las posibilidades de uso exitoso, considerando aspectos como la producción a gran escala, la formulación, las condiciones de conservación, la vida útil y los métodos de aplicación (Deketelaere y col., 2017).

Entre los microorganismos que han sido estudiados como agentes de control biológico frente a la verticilosis se mencionan: *Serratia plymuthica* cepa HRO-C48 (Müller y col., 2008), *Paenibacillus alvei* cepa K165 (Markakis y col., 2016) y ciertas especies de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* (Mercado-Blanco y col., 2004). Diferentes cepas de *Pseudomonas* spp. han sido identificadas y evaluadas en plantas de olivo (Triki y col., 2012) así como *P. fluorescens* PICF7 (Gómez-Lama-Cabanás y col., 2014) que muestra un control eficaz frente a la verticilosis en olivo en diferentes condiciones de crecimiento: controladas o semi-controladas (Prieto y col., 2009). Entre los hongos, *Trichoderma* spp está ampliamente distribuido en diversos nichos ecológicos y también ha sido estudiado como agente de control frente a la verticilosis del olivo. Existe en el mercado un preparado de dos especies de *Trichoderma*, *T. asperellum* y *T. gamsii*, el cual debe ser aplicado por personal especializado y está aprobado sólo para tratamientos de plantas de olivo en viveros antes de ser plantadas en el campo (Varo y col., 2016).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La empresa biotecnológica Xtrem Biotech S.L. junto con el Grupo de Investigación "Exopolisacáridos Microbianos" (BIO188) de la Universidad de Granada, mediante un Doctorado Industrial, se plantearon llevar a cabo un estudio de aislamiento y caracterización taxonómica de cepas bacterianas en el hábitat salino Rambla Salada en Murcia, que permitiera en primer lugar ampliar conocimientos sobre la diversidad microbiana de este hábitat, así como seleccionar agentes de control biológico de la verticilosis del olivar. De igual manera, nos planteamos evaluar las cepas bacterianas aisladas de diversos hábitats salinos de España pertenecientes a la colección de la empresa y que presentaban actividad antifúngica.

En este estudio se empleó la técnica de dilución a extinción, que favorece el aislamiento y cultivo de bacterias que aún no han podido ser cultivadas. De los aislados, además de su caracterización taxonómica se pretende evaluar su actividad como agentes de control biológico.

Ante la ausencia de tratamientos específicos en el mercado que tengan una actividad eficaz frente a *V. dahliae* y que además sean inocuos para el medio ambiente, nos planteamos en este estudio el objetivo de desarrollar un formulado de naturaleza biológica que tenga las mismas o mejores prestaciones que un fertilizante químico con la ventaja de ser compatible con el ser humano y el medio ambiente, para contribuir al manejo integrado de la verticilosis en el olivar.

Los objetivos concretos planteados en este estudio son:

1. Caracterizar taxonómicamente los microorganismos aislados de suelos de Rambla Salada (Murcia), mediante la técnica de dilución a extinción.
2. Seleccionar y caracterizar fisiológicamente el grupo de cepas de Rambla Salada y de la colección de Xtrem Biotech que presenta mayor actividad antifúngica frente a *V. dahliae*.
3. Determinar in vivo en olivos infectados por *V. dahliae* la actividad antifúngica preventiva y curativa de las cepas seleccionadas.
4. Analizar la presencia y permanencia de las cepas seleccionadas en plantas afectadas por *V. dahliae*.
5. Determinar la bioseguridad de la cepa con mayor potencial como agente de biocontrol de la verticilosis del olivar.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras de suelo

Se analizaron 6 muestras de suelo provenientes de dos zonas de Rambla Salada Murcia, tres muestras de sedimentos acuosos de una zona de surgencia de agua salada (S1, S2 y S3) y tres muestras de suelo de una zona denominada Finca La Salina (FS1, FS2 y FS3). La ubicación y la fecha de muestreo se presentan en la Tabla 3.1. Las muestras fueron recogidas en botes estériles sellados con papel de parafina y se conservaron en cámara fría a 4°C en el laboratorio hasta su análisis.

Tabla 3.1. Fecha de muestreo y ubicación de las muestras de suelo analizadas.

Muestras		Fecha	Ubicación
Zona de surgencia	S1	junio 2012	38° 07' 29.09" N; 1° 07' 42.15" W
	S2	febrero 2013	
	S3	noviembre 2013	
Finca La Salina	FS1	noviembre 2013	38° 07' 27.1" N; 1° 07' 1.4" W
	FS2	enero 2014	
	FS3	enero 2014	

3.2. Microorganismos utilizados

Las cepas bacterianas objeto de estudio en esta tesis tienen distinta procedencia. Un primer grupo de 354 cepas que se aislaron a partir de las muestras de suelo de Rambla Salada y, un segundo grupo de 72 cepas de la colección de microorganismos de la empresa biotecnológica Xtrem Biotech, S.L. aislados de ambientes hipersalinos.

Como bacterias control utilizamos *Blastomonas natatoria* CECT 4273^T, *Blastomonas ursincola* DSM 9006^T, *Roseovarius azorensis* DSM 100674^T, *Roseovarius tolerans* EL-172^T, *Roseovarius pacificus* LMG 24575^T, *Escherichia coli* MC4100 y OP50, *Pseudomonas putida* KT2440, *Burkholderia cepacia* CC-A174 y *P. aeruginosa* PAO 32. La conservación de las cepas bacterianas a corto plazo se realizó mediante siembras en medios sólidos que se almacenaron a 4°C. A largo plazo, se conservaron en medio líquido con glicerol 10% v/v y se llevaron a congelación a -80°C.

Para evaluar la actividad antifúngica se utilizaron los siguientes hongos: *Verticillium dahliae* V024 patotipo D (Dpto. Producción Vegetal, Universidad de Córdoba), *Phytophthora cinnamomi* (Dpto. Ingeniería Forestal y del Medio Natural, Universidad de

Extremadura), *Sclerotinia sclerotiorum* CECT2769, *Magnaporthe oryzae* CECT20276, *Thanatephorus cucumeris* CECT2813, *Phytium ultimum* CEC2364, *Botrytis cinerea* (Dpto. Producción Animal y Ciencia de los Alimentos, Universidad de Zaragoza), *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* (Dpto. de Microbiología, Facultad de Biológicas, Universidad Complutense de Madrid). Asimismo se empleó y el nematodo *Caenorhabditis elegans* estirpe silvestre N2 para los estudios de toxicidad (Instituto del Agua, Universidad de Granada). La conservación a corto plazo de los hongos se realizó por resiembras en PDA a 4°C mientras que la conservación a largo plazo se llevó a cabo mediante congelación a -20°C de cortes de 4 mm de diámetro del hongo crecido en dicho medio sólido. La conservación y cultivo del nematodo *C. elegans* se describe posteriormente en el apartado 3.15.3.

3.3. Plantas de olivos

Se utilizaron 4 grupos de plantones de olivo del cultivar Picual, susceptibles a la infección por *V. dahliae*, y olivos de edad adulta también del cultivar Picual con síntomas de infección por *V. dahliae* pertenecientes a una finca de Colomera, Granada (DD) 37.421499, -3.744019. Las condiciones de luz, temperatura y riego se describen para cada grupo en el apartado 3.16.

3.4. Medios de cultivo

3.4.1. Medio salino S3 líquido y sólido (Sait y col., 2006)

El medio S3 fue utilizado para el cultivo y aislamiento de las cepas procedentes de Rambla Salada. Su composición se describe en las Tablas 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 y 3.6. El pH del medio se ajustó a 7 en el medio sólido, mientras que en el medio líquido se utilizaron los pH 5,5; 7 y 10.

Tabla 3.2. Composición del medio de cultivo S3.

Componentes	
Extracto de suelo*	200 ml
Solución traza*	2 ml
Solución de vitaminas I*	2 ml
Solución de vitaminas II*	6 ml
Sales Subow*	333 ml
Proteosa peptona	500 mg
Solución selenito/tungsteno	2 ml
Agar purificado	20 g
H ₂ O destilada c.s.p	1000 ml

*descritos a continuación.

El extracto de suelo fue preparado diluyendo 1 g de la muestra en 1000 ml de agua destilada. Esta suspensión inicial se sonicó durante 15 minutos y se dejó decantar durante una noche. El sobrenadante fue transferido a un nuevo matraz y se filtró con papel Whatman™ grado 1. Posteriormente se autoclavó a 112°C durante 30 minutos, se dejó enfriar y se almacenó en cámara fría a 4°C hasta su uso. Cada muestra que se procesó para el aislamiento de microorganismos fue sembrada en medio S3 que contenía 1/5 v/v de su propio extracto de suelo.

Tabla 3.3. Composición de la solución traza

Componentes	
HCl 25%	10 ml
FeCl ₂ x 4H ₂ O	1,5 g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	190 mg
Na ₂ MnO ₄ x 2H ₂ O	36 mg
MnCl ₂ x 4H ₂ O	100 mg
KI	2 mg
ZnCl ₂	70 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
NiCl ₂ x 6H ₂ O	24 mg
CuCl ₂ x 2H ₂ O	2 mg
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Tabla 3.4. Composición de la solución de vitaminas I

Componentes	
4- aminobenzoato	40 mg
Biotina	10 mg
Hemicalcio D+/- pantotenato	100 mg
Piridoxamina hidroclicorada	50 mg
Tiamina clorada hidrogenada	150 mg
Cianocobalamina	100 mg
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Tabla 3.5. Composición de la solución de vitaminas II

Componentes	
DL-6,8 - ácido nicotínico	10 mg
Riboflavina	10 mg
Ácido fólico	4 mg
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Tabla 3.6. Composición de sales Subow 30% (p/v) (Rodríguez-Valera y col., 1981)

Componentes	
NaCl	205,2 g
MgCl ₂ • 6H ₂ O	36 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	52 g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0,8 g
KCl	5,2 g
NaHCO ₃	0,2 g
NaBr	0,6 g
FeCl ₃ • 6H ₂ O 0,5 % (p/v)	0,6 ml
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Se pesaron y mezclaron los componentes descritos anteriormente, excepto las soluciones de vitaminas, se ajustó el pH a 7,2 y se autoclavó a 112°C durante 30 minutos. Se dejó enfriar a 50°C aproximadamente y se añadieron las soluciones de vitaminas I y II. Por último, el medio se vertió en placas de Petri y se almacenó a 4°C tras su solidificación. Para preparar medio S3 líquido seguimos el mismo procedimiento pero sin añadir el agar.

3.4.2. Medio R2A

El medio deshidratado (Difco®) empleado habitualmente para el mantenimiento de las cepas se suplementó con 3% de sales de Subow. Este medio sólido también se empleó para evaluar el crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de sales Subow. El pH final del medio se ajustó a 7.

3.4.3. Medio R2 líquido

Medio empleado como base de otros medios y pruebas. Su composición se describe en la Tabla 3.7. El pH final del medio se ajustó a 7.

Tabla 3.7. Composición del medio líquido R2

Componentes	
Proteosa peptona	0,5 g
Extracto de levadura	0,5 g
Casaminoácidos	0,5 g
Dextrosa	0,5 g
Almidón soluble	0,5 g
Piruvato sódico	0,3 g
K ₂ HPO ₄	0,3 g
MgSO ₄	0,05 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

3.4.4. Medio patata dextrosa, agar y patata, dextrosa caldo (PDA y PDB)

Medio deshidratado (Difco®) utilizado para el mantenimiento y conservación de los hongos así como para los ensayos de actividad antifúngica. En los caso necesarios se suplementó con antibióticos: estreptomina y penicilina G con una concentración final de 100 mg/l y 25 mg/l respectivamente.

3.4.5. Caldo y agar nutritivo (CN y AN)

Medio empleado para el recuento y mantenimiento de cepas. Su composición se describe en la Tabla 3.8. Para la preparación del medio sólido se adicionó agar (15 g/l).

Tabla 3.8. Composición del caldo nutritivo

Componentes	
Extracto de carne	1 g
Extracto de levadura	2 g
Peptona	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

3.4.6. Caldo marino

Este caldo deshidratado (Difco®) fue empleado para el cultivo de las cepas. En los casos requeridos este caldo fue adicionado de agar (15 g/l) para obtener placas de agar marino (MA).

3.4.7. Medio Luria-Bertani LB

Medio empleado para el cultivo y mantenimiento de diversas cepas entre ellas, *E. coli* DH5 α . Para su preparación se utilizaron 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl, agar 15 g y agua c.s.p. 1000 ml ajustando el pH a 7,0. Se esterilizó a 121°C durante 20 minutos.

3.4.8. Medio Molp

Medio empleado para incrementar la producción bacteriana de metabolitos secundarios (lipopéptido) (Ahimoua y col., 2000). Su composición se detalla en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9. Composición del medio Molp

Componentes	
Peptona	30 g
Sacarosa	20 g
Extracto de levadura	7 g
KH ₂ PO ₄	1,9 g
MgSO ₄	0,45 mg
CuSO ₄	0,0001 mg
FeCl ₃ • 6H ₂ O	0,0005 mg
Na ₂ MoO ₄	0,004 mg
KI	0,002 mg
MnSO ₄ • H ₂ O	3,6 mg
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	0,14 mg
H ₃ BO ₃	0,01 mg
C ₆ H ₈ O ₇	10 mg
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

3.4.9. Medio NGM (*Nematode Growth Media*)

Medio utilizado para los ensayos de toxicidad con el nematodo *C. elegans* (Stiernagle, 2006). Para su preparación se mezclaron los componentes de la solución I (Tabla 3.10) en un matraz de 2 litros de capacidad y se autoclavaron durante 50 minutos a 121°C. Una vez esterilizado y enfriado a 50°C se añadieron los componentes de la solución II (Tabla 3.10) esterilizados por filtración. Se mezcló bien y se dispensó en placas de Petri.

Tabla 3.10. Composición del medio NGM

Solución I	
Peptona	2,5 g
NaCl	3 g
Agar	17 g
H ₂ O	975 ml
Solución II	
MgSO ₄ 1M	1 ml
CaCl ₂ 1M	1 ml
Colesterol 5 mg/ml etanol	1 ml
KPO ₄ 1 M	25 ml

3.4.10. Medio NP10 Sorensen's

Medio semi-selectivo utilizado para el aislamiento de *V. dahliae* a partir de muestras de suelo. Se preparó de acuerdo al procedimiento descrito por Kabir y col., 2004. Inicialmente, se prepararon las soluciones I y II (Tabla 3.11) y se autoclavaron a 121°C durante 15 minutos. Una vez enfriadas hasta 50°C se mezclaron en proporción 1:1, se adicionaron los antibióticos cloranfenicol y estreptomycin a 50 mg/l cada uno y se dispensaron en placas petri.

Tabla 3.11. Composición del medio NP10 Sorensen's

Solución I	
ácido poligalacturónico (PGA)	5 g
NaOH 5 M	2,5 ml
H ₂ O c.s.p.	500 ml
Solución II	
KNO ₃	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
KCl	0,5 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,5 g
Tergitol	0,5 ml
Agar	15 g
H ₂ O c.s.p.	500 ml

3.4.11. Medio Cooper

Medio utilizado para el crecimiento de las cepas y el ensayo de toxicidad con *V. fischeri* ATCC 49387. Inicialmente se pesaron y mezclaron todos los componentes que se muestran en la Tabla 3.12, y a continuación se adicionó 1 ml de solución de sales traza 100X (Tabla 3.13). Se ajustó el pH final a 7,5 y se autoclavó a 115°C durante 20 minutos.

Tabla 3.12. Composición del medio Cooper

Componentes	
Glucosa	40 g
NH ₄ NO ₃	4 g
Na ₂ HPO ₄	5,68 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2 g
KH ₂ PO ₄	4,08 g
NaCl	50 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Tabla 3.13. Solución de sales traza 100X para medio Cooper

Componentes	
CaCl ₂ • 2 H ₂ O	0,1 g
FeSO ₄ • 7 H ₂ O	0,11 g
EDTA • 2 H ₂ O	0,15 g
MnSO ₄ • H ₂ O	0,07 g
H ₂ O c.s.p.	100 ml

3.4.12. Medio SG

Medio utilizado para el cultivo de bacterias y extracción de lipopéptidos (Schaeffer y col., 1965, Leighton y Doi, 1971). Inicialmente se preparó una solución de sales stock de acuerdo con la Tabla 3.14 y a continuación, se utilizó para preparar el medio junto con el resto de los componentes que se muestran en la Tabla 3.15. El pH final se ajustó a 7,2.

Tabla 3.14. Composición de la solución de sales stock para el medio SG

Solución de sales stock	
Ca(NO ₃) ₂	19 g
MnCl ₂	19,6 g
FeSO ₄ • H ₂ O	0,4 mg
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Tabla 3.15. Composición del medio SG

Componentes	
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
KCl	2 g
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,5 g
NaCl	10 g
Sacarosa	2 g
Solución de sales	250 ml
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

3.4.13. Medio K

Este medio fue utilizado en los ensayos de toxicidad con el nematodo *C. elegans*. Se preparó con 2,36 g de KCl, 3 g de NaCl y H₂O c.s.p. 1000 ml (Boyd y col., 2012).

3.4.14. Medio K+

Este medio es también conocido como medio K completo, fue utilizado en los ensayos de toxicidad con el nematodo *C. elegans*. Se preparó con 1000 ml de medio K, 1 ml de colesterol (5 mg/ml), 1 ml de CaCl₂ 1M y 1 ml de MgSO₄ 1 M (Boyd y col., 2012).

3.4.15. Medio mínimo salino 9 (MM9)

Este medio fue utilizado para la preparación del medio CAS. Se preparó con 15 g de KH₂PO₄, 25 g NaCl y 50 g de NH₄Cl en 500 ml de agua destilada. Se esterilizó por filtración (Louden y col., 2011).

3.4.16. Medios M1 y M2

Medios de cultivo desarrollados por la empresa Xtrem Biotech S.L. bajo secreto industrial a partir de materias primas de origen vegetal con el propósito de ser utilizados en la producción de los agentes de control biológico a gran escala.

3.5. Soluciones

3.5.1. Antimicrobianos

Se utilizó ampicilina, estreptomicina, cloranfenicol y rifampicina para suplementar algunos medios de cultivo. Las soluciones madres se prepararon en agua bidestilada excepto la rifampicina que se preparó en metanol. La esterilización de estas soluciones se realizó por filtración utilizando filtros de 0,22 µm y posteriormente se almacenaron a -20°C en alícuotas.

En los casos requeridos, estas soluciones antimicrobianas se añadieron a los medios de cultivos a las siguientes concentraciones: cloranfenicol (Cm) 12,5 µg/ml, ampicilina (Amp) 100 µg/ml, estreptomicina (Sm) 100 µg/ml y rifampicina (Rif) 100 µg/ml.

3.5.2. X-gal

La solución de 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galactopiranosido (X-gal) (Sigma) se preparó a una concentración final de 20 mg/ml utilizando N,N- dimetilformamida (Panreac®) como disolvente, y se conservó a -20°C.

3.5.3. Tampón TE

La solución Tris-EDTA (TE) se utilizó para resuspender el ADN. Su composición final fue 1 mM EDTA y 10 mM Tris-Cl; se ajustó a pH 7,5.

3.5.4. Tampón TAE

La solución Tris-Acetato-EDTA para la electroforesis en geles de agarosa se preparó diluida (TAE 1X) a partir de una solución concentrada TAE 10X (400mM Tris-acetato, 10mM EDTA, pH 8).

3.5.5. Tampón CTAB

Esta solución fue utilizada para las extracciones de ADN a partir de material vegetal. Está constituido por bromuro de cetil-trimetil amonio 2%, NaCl 1,4 M, 2-mercaptoetanol 0,2%, EDTA 20 mM y Tris-HCl 100 mM, pH 8.

3.5.6. Tampón M9

Esta solución fue utilizada en los ensayos de toxicidad con el nematodo *C. elegans*. Se preparó con 3 g de KH₂PO₄, 6 g de Na₂HPO₄, 5 g de NaCl, 1 ml de MgSO₄ 1 M y H₂O c.s.p. 1000 ml; el pH se ajustó a 7,2.

3.5.7. Solución salina citrada (SSC 0,1X)

Esta solución se utilizó para determinar el contenido de G+C de los genomas bacterianos. Se realizó a partir de un stock 1X el cual se preparó con 4 g de citrato sódico, 0,8 g de NaCl y agua destilada c.s.p. 100 ml.

3.6. Técnica de aislamiento de dilución a extinción

Esta técnica de alta eficiencia se utilizó para aislar y cultivar bacterias que no han podido ser cultivadas por técnicas convencionales. En el tratamiento de nuestras muestras se empleó la técnica descrita por Button y col., (1993) con modificaciones.

3.6.1. Procesamiento y estimación del número de microorganismos de las muestras

Se prepararon diluciones de 10^{-1} hasta 10^{-7} de las muestras de suelo y sedimentos acuosos en solución salina fisiológica a partir de 1 gramo de cada una de las muestras y se determinó el número de microorganismos por gramo de suelo con el empleo de una cámara de recuento para bacterias Petroff Hausser y azul de metileno como contraste.

3.6.2. Inoculación de las placas de microtitulación

Una vez obtenido el número de microorganismos por gramo de muestra, se prepararon las diluciones necesarias para conseguir que solo una o pocas bacterias estuvieran presentes en un volumen de cultivo determinado. En nuestro caso, se prepararon las diluciones necesarias hasta obtener 100 microorganismos por ml. Se sembraron 10 μ l en cada pocillo de una placa de microtitulación de 48 pocillos (1 microorganismo aproximadamente) con medio salino S3 (apartado 3.4.1) en un volumen final de 500 μ l.

Las placas fueron incubadas a 20°C realizándose observaciones semanales hasta la aparición de la turbidez en los pocillos. En estos casos, se tomaron 20 μ l del medio y se inocularon en placas con medio salino S3 sólido y se incubaron nuevamente a 20°C. De igual forma, se transfirieron 100 μ l de cultivo de los pocillos con turbidez a tubos de criopreservación con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) que fueron almacenados a -80°C para futuros análisis.

3.6.3. Análisis estadístico

El porcentaje de cultivo fue determinado por la ecuación $V = -\ln(1-p)/X$, donde: V es el estimado de cultivo, p es la proporción de pocillos positivos con crecimiento dividido por el número de pocillos inoculados totales y X es el inóculo inicial de células añadidas en cada pocillo (Button y col., 1993; Connon y Giovannoni, 2002).

3.7. Pruebas fenotípicas

3.7.1. Gram, catalasa, oxidasa y movilidad

A cada uno de los aislados bacterianos obtenidos en medio sólido S3 se le realizaron las pruebas de Gram, catalasa, oxidasa y movilidad en gota siguiendo los protocolos de rutina.

3.7.2. Crecimiento a distintas concentraciones de sales, temperatura y pH

Las bacterias se sembraron en medio líquido R2 (apartado 3.4.3) adicionado con un 5% de sales Subow (apartado 3.4.1) y tras su incubación a 25°C durante 3 días se utilizaron como inóculo para ensayar las siguientes condiciones de crecimiento:

3.7.2.1. Concentraciones de sales: Se empleó como medio base el medio R2A adicionado con distintas concentraciones de sales Subow: 1, 3, 5, 7,5, 10, 15, 20 y 25 (% v/v). El pH y la temperatura de incubación empleados fueron 7 y 25°C, respectivamente.

3.7.2.2. Temperaturas: Se empleó el medio R2A adicionado con 3% de sales Subow y se realizó la incubación a las siguientes temperaturas: 4, 15, 20, 25, 30, 32, 35 y 40°C. El pH utilizado fue 7.

3.7.2.3. Valores de pH: Se empleó el medio R2A adicionado con un 3% de sales Subow ajustado a distintos pH: 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11. La incubación se realizó a 25°C.

La evaluación del crecimiento a distintas concentraciones de sales (a 25°C) y distintas temperaturas se realizó durante 21 días, mientras que, la evaluación del crecimiento a distintos valores de pH se realizó durante 15 días.

3.7.3. Crecimiento en anaerobiosis

Para evaluar el crecimiento en condiciones de anaerobiosis, las cepas sembradas en medio R2A con 3% de sales Subow se incubaron durante 7 días a 30°C en jarras de anaerobiosis comercializadas por Oxoid utilizando para ello el sistema anaeróbico Anaerogen de la misma casa comercial para crear una atmosfera exenta de oxígeno. Paralelamente se realizó un control en aerobiosis del mismo inóculo y medio.

3.7.4. Pruebas enzimáticas

Se evaluó la capacidad de las cepas aisladas para degradar la quitina, hidrolizar la caseína, producir lecitinasa, producir ADNasa, hidrolizar el almidón, degradar la

celulosa, hidrolizar la gelatina e hidrolizar el Tween 20 y el Tween 80. Para algunas cepas seleccionadas se evaluó igualmente la actividad fosfatasa ácida y alcalina, la producción de sideróforos y la presencia de ACC desaminasa. En todas las pruebas se realizó la incubación a 30°C.

3.7.4.1. Hidrólisis del almidón

Con esta prueba se determinó la actividad amilasa de los aislados (Mourey y Kilbertus, 1976). El medio se preparó añadiendo al medio R2 un 1% (p/v) de almidón y agar 15 g/l. La incubación se realizó durante 2 días. Para el revelado se empleó lugol vertido sobre el crecimiento en las placas.

3.7.4.2. Hidrólisis de la caseína

Para evaluar la actividad proteolítica de las cepas se utilizó el método descrito por Barrow y Feltham, 1993. Inicialmente se preparó el medio R2 con la mitad de la cantidad de agua necesaria (500 ml) y agar 15 g/l y, una vez esterilizado, se le añadió 500 ml de leche desnatada estéril. Las bacterias se sembraron con asa y se incubaron durante 5 días. Se consideraron positivas para la hidrólisis de la caseína las bacterias que presentaron un halo traslucido alrededor de su crecimiento.

3.7.4.3. Hidrólisis de Tween 20 y Tween 80

Se evaluó la actividad lipolítica de las cepas de acuerdo con el método de Mourey y Kilbertus, 1976. Para su preparación se añadió 1 % (v/v) de Tween 20 o Tween 80 (derivados del polioxietilén sorbitán) y agar 15 g/l al medio R2. Se tomaron como positivas las bacterias que presentaron un halo opaco alrededor del crecimiento tras 10 días e incubación, producto de la precipitación de la sal cálcica del ácido liberado.

3.7.4.4. Quitinasa

Se evaluó la actividad quitinolítica de las cepas según el protocolo descrito por Wu y col., 2009. El medio se preparó añadiendo al medio sólido R2A un 1% (p/v) de quitina coloidal. Para su preparación, la quitina fue solubilizada en HCl 10 N y precipitada en etanol 98% (p/v) frío. El precipitado se lavó con agua abundantemente y se dejó secar. Se tomaron como positivas las cepas que presentaron un halo claro alrededor de su crecimiento tras 10 días de incubación.

3.7.4.5. Fosfatasa alcalina

Se evaluó la producción de la enzima fosfatasa según el método descrito por Baird-Parker, 1963. El medio se preparó añadiendo 1 ml de fosfato de fenolftaleína 0,01 % (p/v) (Merck) al medio R2A tras su esterilización en autoclave. Las bacterias se sembraron con asa o depositando una gota desde cultivo líquido. Transcurridos 7 días de incubación la actividad fosfatasa se reveló con una solución de amoníaco sobre la placa. Se consideró la prueba positiva cuando la masa bacteriana o la zona de alrededor se coloreó de rosa.

3.7.4.6. Fosfatasa ácida

Con esta prueba se evaluó la capacidad de las bacterias de solubilizar el fosfato tricálcico (Pikovskaya, 1948). Su composición se describe en la Tabla 3.16. El pH final fue ajustado a 7,5. Las bacterias se sembraron con asa o depositando una gota desde un cultivo líquido, se incubaron durante 10 días y se tomaron como positivos los aislados que presentaron un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano.

Tabla 3.16. Composición del medio para la prueba de la fosfatasa ácida

Componentes	
Glucosa	5 g
MgCl ₂	2,5 g
MgSO ₄	0,1 g
KCl	0,1 g
NH ₄ NO ₃	2 g
Ca ₃ (PO ₄) ₂	2,5 g
Agar	15 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

3.7.4.7. DNAsa

Prueba utilizada para detectar la producción de la enzima DNAsa. Las bacterias fueron sembradas en el medio Agar DNAsa (Cultimed®) con asa o en gota desde cultivo líquido, y se incubaron durante 7 días. Para hacer la lectura se añadió sobre el crecimiento HCl 1N. Se tomaron como positivas las bacterias que presentaron un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano.

3.7.4.8. Gelatinasa

Con esta prueba se evaluó la capacidad de producción de enzimas proteolíticas (gelatinasas) que hidrolizan la gelatina empleando el medio deshidratado de gelatina nutritiva (Difco®). La prueba se realizó en tubos de ensayo con 2,5 ml de medio, la inoculación de la bacteria se realizó con asa y, transcurridas 48 horas, los tubos se

enfriaron a 4°C hasta que el control no inoculado solidificó. Se tomaron como positivos los tubos que permanecieron líquidos.

3.7.4.9. Lecitinasa

Prueba utilizada para detectar la producción de lecitinasa (Larpent y Larpent-Gourgand, 1957). El medio se preparó añadiendo una emulsión de una yema de huevo estéril preparada en 100 ml de solución salina a 900 ml de medio base (R2A). La lectura de la prueba se realizó a los 7 días posteriores a la siembra. La actividad lecitinasa se consideró positiva en todas aquellas bacterias en donde se observó un halo opaco alrededor de la zona de crecimiento.

3.7.4.10. Hidrólisis de la celulosa

Prueba empleada para detectar la producción de enzimas celulíticas (Villalba y col., 2014). Como medio base se empleó R2A sin piruvato o AN suplementado con 1 % p/v de celulosa. Las bacterias fueron sembradas depositando una gota de un cultivo líquido y pasados 15 días de incubación se determinó la presencia de un halo claro alrededor de las bacterias que poseen actividad celulolítica.

3.7.4.11. Fijación nitrógeno

Para determinar la capacidad de fijación de nitrógeno se empleó el medio Burk (Stella y Suhaimi, 2010). Inicialmente las bacterias fueron sembradas en Burk líquido y mantenidas en incubación durante 5 días y, posteriormente, estos cultivos líquidos se sembraron en placas del mismo medio sólido incubándose durante 7 días (Tabla 3.17).

Tabla 3.17. Composición del medio de Burk

Componentes	
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0,2 g
CaSO ₄ • 2H ₂ O	0,05 g
KH ₂ PO ₄	0,16 g
K ₂ HPO ₄	0,64 g
Sacarosa	20 g
NaCl	0,2 g
Agar	20 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml

Una vez mezclados todos los componentes se ajustó el pH a 7,3 y se autoclavó a 121°C durante 15 minutos. Se preparó una solución de Na₂MoO₄ • 2H₂O al 0,05% p/v y otra de FeSO₄ • 7H₂O al 0,3% p/v, se esterilizaron por filtración y se añadieron 5 ml de cada una

al medio autoclavado. La actividad nitrogenasa se consideró positiva en todas aquellas bacterias que crecieron en el medio sólido.

3.7.4.12. Actividad ACC desaminasa

Se utilizó el procedimiento descrito por Poonguzhali y col., 2006 con modificaciones, para conocer la capacidad de las cepas de desaminar el 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC), un precursor de la síntesis de etileno. Inicialmente las bacterias fueron sembradas en medio Burk líquido y se mantuvieron en incubación durante 5 días y, posteriormente, estos cultivos líquidos se sembraron en placas del mismo medio sólido suplementado con 1-aminociclopropano-1-carboxilato 0,3 g/l.

3.7.5. Producción de sideróforos

Se utilizó el medio cromo azurol (CAS) descrito por Louden y col., 2011. Este medio utiliza como indicadores, sulfonato de chromo azurol (CAS) y bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HDTMA) y, piperazina - N, N'-bis (ácido 2-etanosulfónico) (PIPES) como tampón del medio. Para su preparación, se disolvieron con agitador magnético 60 mg de CAS en 50 ml de agua, 10 ml de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 mM (en HCl 10 mM) y 72 mg de HDTMA en 40 ml de agua. La solución azul oscura resultante se autoclavó a 121°C durante 15 minutos. A continuación se prepararon 4 soluciones stock, 500 ml de medio mínimo salino MM9 (apartado 3.4.15), 100 ml de glucosa al 20%, 150 ml de NaOH 4,2 M (comprobando su pH alrededor de 12) y una solución de casaminoácidos (3 g en 27 ml de agua) y se esterilizaron por filtración. Finalmente para la preparación del agar CAS, se disolvieron 100 ml de MM9 en 750 ml de agua destilada y 32,24 g de PIPES. La disolución de PIPES se realizó manteniendo el pH por encima de 6 utilizando la solución stock de NaOH. Una vez disuelto completamente el PIPES, el pH se ajustó hasta 6,8. A continuación se adicionaron 15 g de agar y se autoclavó a 121°C durante 15 minutos. Se dejó enfriar a 50°C y se adicionaron 30 ml de la solución stock de casaminoácidos y 10 ml de la solución stock de glucosa. Finalmente se adicionaron 100 ml de la solución CAS inicial y se mantuvo a 4°C hasta su uso.

Inicialmente las bacterias fueron sembradas en placas de agar (R2A o agar nutritivo) como medio base y una vez crecidas las bacterias, se añadieron 10 ml de medio CAS a sobrefusión y las placas se incubaron nuevamente a 28°C entre 15 minutos y las 24 horas. Se consideraron positivas aquellas bacterias que produjeron un cambio de color de azul a púrpura o naranja en el medio CAS debido a la transformación del Fe^{+3} a Fe^{+2} por la acción de los sideróforos.

3.7.6. Sistemas miniaturizados

Para la caracterización de bacterias que pudieran constituir nuevas taxa, se emplearon los sistemas estandarizados API 20NE (identificación de bacterias Gram negativas no enterobacterias), API 50CH (fermentación de carbohidratos), API ZYM (producción de

enzimas) de la casa comercial Biomerieux® (Tabla 3.18). Los pocillos con los sustratos deshidratados se inocularon con las suspensiones de las bacterias a evaluar en medio R2 suplementado con 3% de sales Subow, las cuales habían sido previamente estandarizadas al 0,5 de la escala de MacFarland (10^8 UFC/ml). Las reacciones producidas durante el periodo de incubación se evidenciaron por cambios de color o se revelaron mediante la adición de reactivos siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 3.18. Pruebas determinadas mediante los sistemas miniaturizados API

API 20NE		API ZYM		
Prueba	Reacción/Enzima	Enzima	Sustrato	
NO ₃	Reducción NO ₃ y NO ₂	Fosfatasa alcalina	2-naftil fosfato	
TRP	Producción de indol	Esterasa (C4)	2-naftil butirato	
GLU	Fermentación/oxidación	Esterasa lipasa (C8)	2-naftil caprilato	
ADH	Arginina deshidrolasa	Lipasa (C14)	2-naftil meristato	
URE	Ureasa	Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamida	
ESC	Esculetina citrato ferrico	Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamida	
GEL	Gelatinasa	Cisteína arilamidasa	L-cistil-2-naftilamida	
PNPG	B-galactosidasa	Tripsina	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida	
GLU	Asimilación glucosa	α- quimotripsina	N-glutaril-fenilalanina-2-naftilamida	
ARA	Asimilación L-rabinosa	Fosfatasa acida	2-naftil fosfato	
MNE	Asimilación D-manosa	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	Naftol-AS-BI-fosfato	
MAN	Asimilación D-manitol	α-galactosidasa	6-Br-2-naftil-αD-galactopiranosido	
NAG	Asimilación N-acetil-glucosamina	β-galactosidasa	2-naftil-βD-galactopiranosido	
MAL	Asimilación D-maltosa	β-glucoronidasa	Naftol-AS-BI-βD-glucurónido	
GNT	Asimilación gluconato potasio	α-glucosidasa	2-naftil-αD-glucopiranosido	
CAP	Asimilación ac. cáprico	β-glucosidasa	6-Br-2-naftil-βD-glucopiranosido	
ADI	Asimilación Ac. adipico	N-acetil-β-glucosaminidasa	1-naftil-N-acetil-βD-glucosaminida	
MLT	Asimilación Ac. malico	α-manosidasa	6-Br-2-naftil-αD-manopiranosido	
CIT	Asimilación citrato trisódico	α-fucosidasa	2-naftil-αL-fucopiranosido	
PAC	Asimilación ac. fenilacético			
API 50CH				
Glicerol	Glucosa	1-metil-D-glucósido	Sacarosa	D-lixosa
Eritrol	Fructosa	N-acetil glucosamina	Trehalosa	D-tagatosa
D-arabinosa	Manosa	Amigdalina	Inulina	D-fucosa
L-arabinosa	Sorbosa	Arbutina	Melezitosa	L-fucosa
Ribosa	Rhamnosa	Esculina	Rafinosa	D-arabitol
D-xylosa	Dulcitol	Salicina	Almidón	L-arabitol
L-xilosa	Inositol	Celobiosa	Glicógeno	Gluconato
Adonitol	Manitol	Maltosa	Xilitol	2-keto-gluconato
β-metil-D-xilosa	Sorbitol	Lactosa	Gentiobiosa	5-ketogluconato
Galactosa	1-metil-D-manosido	Melibiosa	DTUranosa	Control

3.8. Determinación de ácidos grasos, lípidos polares y quinonas respiratorias

La determinación de ácidos grasos se realizó a partir de las cepas cultivadas en medio agar marino MA (apartado 3.4.6) durante 48 horas de incubación a 30°C. Tras este tiempo, los cultivos a 4°C se enviaron a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) donde se analizaron mediante cromatografía de gases.

El análisis de lípidos polares, poliaminas y quinonas respiratorias se llevó a cabo en el Servicio de Identificación de la Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares (DSMZ, Braunschweig, Alemania) donde fueron analizadas mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). Las cepas se cultivaron en caldo marino a 30°C durante 48 horas. El sedimento obtenido tras su centrifugación se liofilizó y se envió para su análisis.

3.9. Análisis genéticos y filogenéticos

3.9.1. Extracción de ADN de bacterias

Para la extracción de ADN genómico de bacterias se empleó el método descrito por Martín-Platero y col., 2007 con modificaciones. Para ello, se utilizaron tres soluciones. La solución I se preparó con 5 g de sacarosa, 1,25 ml de Tris-HCl 1 M pH 8 y agua destilada c.s.p. 50 ml. La solución II se preparó con 5 ml de Tris-HCl 1 M pH8, 10 ml de EDTA 0,5 M, 20 µl de NaCl 5M, 1 ml de SDS 10 % (p/v) y agua destilada c.s.p. 50 ml, y la solución III con acetato sódico 3 M pH 5.

El procedimiento se realizó como se describe a continuación: se suspendieron las células bacterianas procedentes de 1 ml de cultivo en fase estacionaria en 100 µl de solución I (suplementada con lisozima 10 mg/ml) y se incubó durante 30 minutos a 37°C. A continuación se adicionó 40 µg/ml de ARNasa a esta solución (4 µl de una solución stock de 10 mg/ml de ARNasa) y 600 µl de solución II y posteriormente se realizó la incubación a 37°C durante 10 minutos con agitaciones suaves por inversión. Se adicionaron 4 µl de proteinasa K (10 mg/ml) o 10 µl pronasa (10 mg/ml) y se incubó durante 15 minutos a 55°C. Posteriormente, se incubó a 80°C durante 5 minutos y se dejó enfriar durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 200 µl de solución III, agitando vigorosamente durante 15 segundos y posterior incubación en hielo durante 15 minutos. Se centrifugó a 13.000 g durante 15 minutos transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga. La precipitación del ADN del sobrenadante se llevó a cabo con un volumen de isopropanol (aproximadamente 600 µl), agitando 10 veces por inversión. Finalmente, se centrifugó a 13.000 g durante 10 minutos retirándose el sobrenadante. Se lavó el sedimento celular con 1 ml de etanol al 70% (v/v) y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. El sedimento se secó al vacío y se resuspendió en 100 µl de agua estéril previamente calentada a 37°C. El ADN obtenido se conservó a -20°C hasta su uso.

3.9.2. Extracción de ADN del material vegetal

Para la extracción de ADN total de plantas se utilizó la metodología descrita por Doyle y Doyle, (1990), con algunas modificaciones. Inicialmente, se preparó el buffer de extracción con CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) al 2%, NaCl 1,4 M, EDTA 20 mM pH 8 y TRIS-HCl 100 mM pH 8,0. Justo antes de realizar la extracción se añadió β -mercapto etanol al 0,2% v/v. Se precalentó un tubo eppendorf a 60°C que contenía 750 μ l del buffer. Se pesaron 120 mg de muestra vegetal, se pulverizaron en un mortero con nitrógeno líquido y se adicionaron al tubo con buffer, incubándose en baño maría a 65°C durante 1 hora mezclando por inversión cada 10 min. A continuación, se realizó una extracción con un volumen de cloroformo y se mezcló suavemente. Se centrifugó a 9.300 g durante 5 minutos, y la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio. Posteriormente se añadieron 2/3 de volumen de isopropanol frío, mezclándolo para precipitar el ADN. Se incubó durante toda la noche (12 horas) a 25°C y se centrifugó a 9300 g durante 5 minutos. Finalmente, el pellet se lavó con 1 ml de etanol 70% (dos veces). En el primer lavado, se centrifugó a 9300 g durante 10 minutos y en el segundo, se centrifugó a 2.300 g durante 5 minutos. El sedimento celular se dejó secar y se resuspendió en 20 μ l de agua destilada estéril.

3.9.3. Determinación de la concentración de ADN

La concentración de ADN se determinó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo®) adoptando las recomendaciones del manual de Sambrook y Russell, 2001. La concentración de ADN de la muestra se expresó respecto al valor estándar de $DO_{260}=1$ para soluciones con 50 μ g de ADN de cadena doble de *E. coli*. La pureza de la muestra viene dada por la relación DO_{260}/DO_{280} de forma que un valor de esta relación por debajo de 1,8 es indicativo de contaminación por proteínas o polisacáridos.

3.9.4. Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa se utilizó para la identificación taxonómica de las cepas a través del gen ribosomal 16S, para la secuenciación de productos de PCR clonados en pGEM-T y, para la detección de *V. dahliae* a partir de muestras vegetales.

La mezcla de reacción se preparó con 1 μ g de ADN, buffer 1X (Bioline), $MgCl_2$ 2 mM (Bioline), dNTPs 0,2 mM (Sigma), primers 25 μ M, 5 U Taq ADN polimerasa (Bioline) y H_2O bidestilada c.s.p. 50 μ l. Las secuencias de los primers utilizados se recogen en la Tabla 3.19.

Las reacciones para la identificación taxonómica y la secuenciación de productos de PCR clonados en pGEM-T se llevaron a cabo con los siguientes ciclos: 4 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 40 segundos a 56°C y 2 minutos a 72°C con una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Por otra parte, la detección de *V. dahliae* se realizó con dos pares de primers (19c / 22c y Vd_f / Vd_r) en dos amplificaciones independientes con los siguientes ciclos: 4 minutos

a 94°C, seguido de 40 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 52°C y 1 minuto a 72°C.

Tabla 3.19. Oligonucleótidos utilizados para las PCR

Primer	Secuencia 5'- 3'	Uso	Referencia
16F_B27	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	Identificación taxonómica	Lane, 1991
16R_B1488	CGGTTACCTTGTTAGGACTTCACC		
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Secuenciación productos clonados en pGEM-T	Promega
SP6	GATTTAGGTGACACTATAG		
<i>pufLf</i>	CTKTTGACTTCTGGGTSGG	Detección de genes de bacterioclorofila α	Hiraishi y col., 1998
<i>pufMr</i>	CATSGTCCAGCGCCAGAA		
19	CGGTGACATAATACTGAGAG	Detección de <i>V. dahliae</i>	Carder y col., 1994
22	GACGATGCGGATTGAACGAA		
Vd_f	GGCTCAAGTAACTACGG	Detección de <i>V. dahliae</i>	Maurer y col., 2013
Vd_r	CTGTCATGTATATAAGATACTACTG		

3.9.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los ADN genómicos, los fragmentos de PCR y los plásmidos se analizaron mediante electroforesis en geles horizontales de agarosa al 1% teñidos previamente con RedSafe (Labotaq®) disueltos en TAE 1X (apartado 3.5.4). Por cada 5 µl de muestra a analizar, se añadió 1 µl de tampón de carga 5X (Bioline®) y la mezcla se depositó en un pocillo del gel sumergido en una cubeta con el tampón TAE 1X. La separación se realizó por electroforesis horizontal a un voltaje de 90 V. El ADN se visualizó tras la exposición del gel a la luz ultravioleta (254 nm) en un transiluminador Universal Hood (Biorad®). Las imágenes se recogieron con una cámara digital acoplada al transiluminador empleando el programa Gel Doc 2000 (Quantity One, Biorad®). Como marcador de peso molecular se utilizó Hyperladder I de 10Kb (Bioline®). Los fragmentos de ADN amplificados se purificaron mediante el kit Illustra GFX PCR (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.9.6. Reacción de ligación y clonación de ADN

Para insertar los amplificados del gen del ARNr 16S de los aislados, se utilizó el plásmido pGEM-T (ApR) de la casa comercial Promega®. El procedimiento fue realizado de acuerdo con las instrucciones del fabricante utilizando la enzima T4 ligasa (Promega®) en un volumen de 10 µl. La relación molar vector:inserto fue de 1:2. Las cepas transformadas con el plásmido que contenía el inserto se seleccionaron en placas de LB (apartado 3.4.7) con ampicilina y 300 µl de X-gal (apartado 3.5.2).

3.9.7. Secuenciación de los amplificados

La secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación automática del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (CSIC) de Granada utilizando un secuenciador Applied Biosystems (modelo 373 Strect). El método seguido fue el comercializado por Perkin Elmer, ABI PRISMTM *Big Dye Terminators*, que utiliza en la reacción de extensión el enzima AmpliTaq ADNpolimerasa y emplea dideoxinucleótidos marcados con cromóforos fluorescentes.

Las mezclas de reacción para la aproximación taxonómica de las cepas se prepararon mezclando 80 ng del fragmento de ADN amplificado, 6,4 pmol de primers y agua c.s.p. 12 μ l. Mientras que, las mezclas de reacción para la secuenciación del gen del ARN ribosomal 16S insertado en el plásmido pGEM-T se prepararon mezclando 800 ng de ADN plasmídico, 6,4 pmol de primers y agua c.s.p. 12 μ l.

3.9.8. Contenido de G+C

El contenido en bases guanina más citosina del ADN (G+C moles %) fue determinado a partir de la temperatura media de desnaturalización (T_m), mediante el método gráfico descrito por Ferragut y Leclerc (1976). Se empleó para ello el perfil de desnaturalización térmica (Marmur y Doty, 1962) dado por un espectrofotómetro UV-Vis Lambda3B (Perkin-Elmer), a una longitud de onda de 260nm. El ADN bacteriano fue extraído mediante el protocolo descrito en el apartado 3.9.1 y a continuación, se calentó desde 40°C hasta 110°C a una velocidad constante de 1°C por minuto mediante el programador de temperatura modelo PTP-1 (Perkin-Elmer) determinando la densidad óptica a las distintas temperaturas. La variación de la densidad óptica (DO) con la temperatura se representó gráficamente. A continuación, se determinó la temperatura que produce el incremento del 50% de la densidad óptica (T_m) y se calculó el porcentaje de G+C utilizando la ecuación de Owen y Pitcher (1985). Se escogió como referencia la temperatura media de desnaturalización de 74,6°C en SSC 0,1X (apartado 3.5.7) de *E. coli* NCTC 9001^T y su porcentaje de G+C de 50,9 moles %. Dicha ecuación se expresa como: $G+C \text{ moles\%} = 50,9 + 2,09 (T_m - 74,6)$. El ensayo se realizó por triplicado.

3.9.9. Secuenciación de genomas

El ADN genómico de las cepas seleccionadas se extrajo empleando la metodología descrita por Marmur, 1961. A continuación se determinó la concentración de ADN (apartado 3.9.3) y se comprobó su integridad en un gel de agarosa al 0,8% p/v. Las muestras se enviaron a la empresa Stabvida, Caparica, Portugal para su secuenciación empleando la plataforma de secuenciación Illumina MiSeq. Se calculó la identidad promedio de nucleótidos empleando blast (ANiB) y se llevó a cabo la hibridación *in silico* ADN-ADN entre especies filogenéticamente relacionadas. Se realizó un análisis comparativo de genomas empleando el software BRIG (Alikhan y col., 2011).

3.10. Análisis filogenético

Las secuencias del gen del ARNr 16S fueron revisadas y editadas con el programa BioEdit (Hall, 1999). Seguidamente, fueron analizadas y comparadas con las disponibles en las base de datos EzTaxon (Yoon y col., 2017) y GenBank mediante el programa Blast, Basic Local Alignment Search Tool (Altschul y col., 1997) disponibles en el servidor del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las secuencias fueron alineadas empleando el programa Clustal Omega (Sievers y col., 2011).

El análisis filogenético de las secuencias obtenidas fue realizado empleando el programa MEGA (*molecular evolutionary genetics analysis*) versión 7.0 (Kumar y col., 2016). Las distancias evolutivas, incluyendo un factor de corrección para las mutaciones reversas (Jukes y Cantor, 1969), se calcularon en función del número de pares de bases en que difieren o asemejan dos genes mediante los métodos *neighbor joining* (Saitou y Nei, 1987), *maximum parsimony* (máxima parsimonia) y *maximum likelihood* (Máxima Verosimilitud); así mismo, se determinaron los valores de remuestreo o *bootstrap* basados en 1000 repeticiones. Para inferir posibles relaciones de parentesco entre los microorganismos en estudio, se utilizaron secuencias de referencia y las secuencias de máxima identidad obtenidas por BLAST. La consistencia de una determinada relación filogenética se evaluó por un lado, por su permanencia en un cluster independientemente del algoritmo usado (Chelo y col., 2007) y por otro, por el valor de remuestreo o *bootstrap* de la agrupación, mediante el cual se comprobó estadística y aleatoriamente si el orden en que se habían introducido las secuencias afectaba a las características del modelo empleado.

3.11. Recuento de microorganismos

Para realizar los recuentos de bacterias, se prepararon diluciones de la muestra (10^{-1} hasta 10^{-6}) en solución salina fisiológica estéril. Seguidamente se extendieron con el asa de Digralsky 20 μ l de cada una de estas diluciones en placas de agar. Las placas se incubaron a 28°C en aerobiosis durante 24 horas.

Los recuentos de los hongos se realizaron con la misma metodología usada para las bacterias con algunas modificaciones. La siembra se realizó por duplicado en medio PDA (con antibiótico) con un volumen de 100 μ l por placa y se extendió con el asa de Digralsky. Las placas se incubaron a 20°C durante 4 días. El resultado se expresó como el número de esporas/ml.

En el caso de *V. dahliae* y para determinar el número de esporas o propágulos presentes en el suelo se siguió la metodología descrita por Kabir y col., (2004) con modificaciones. Inicialmente se trituraron 5 gramos de suelo en un mortero y se secaron en una estufa a 37°C durante 2 días y a continuación, el polvo seco se transfirió a un tubo de 15 ml de

capacidad que contenía 2,5 ml de solución de metionina (0,0075 g/ml en agua destilada) y se incubó abierto a 30°C durante 2 días hasta sequedad. A continuación el producto seco se pulverizó nuevamente en mortero y se sembró en capa fina sobre 4 placas de medio NP10 Sorensen's (apartado 3.4.10) o PDA (apartado 3.4.4) adicionados con cloranfenicol y estreptomycin a 50 mg/l cada uno. Las placas se incubaron a 20°C durante 15 días protegidas de la luz. Transcurrido este tiempo, la superficie de las placas se lavó con agua destilada estéril para eliminar restos de suelo y el número de esporas en cada placa se contaron en una lupa 10X. Los resultados se expresaron como el número de esporas por gramo de suelo.

3.12. Ensayos *in vitro* para determinar la actividad antifúngica

3.12.1. Actividad antifúngica en medio sólido

Para el análisis de la actividad antifúngica en medio sólido se utilizaron placas del medio PDA. En un extremo de la placa se sembraron las cepas bacterianas (10µl de un cultivo de 18 horas) y, a 3-4 cm de la cepa, se colocó un trozo del micelio del hongo de 4 mm de diámetro obtenido de un cultivo en una placa de PDA. Las placas se incubaron a 25°C durante 20 días y la lectura se realizó midiendo el radio máximo y mínimo del micelio para calcular el porcentaje de reducción del micelio.

Para un grupo de cepas seleccionadas, se determinó el porcentaje de inhibición de *V. dahliae* mediante la lectura de las áreas de crecimiento utilizando el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ 1.52a (Collins, 2007).

3.12.2. Actividad antifúngica en medio líquido

El análisis de la actividad antifúngica en medio líquido (Trujillo, 2014, comunicación personal) se realizó en placas microtiter Cellstar de 1,7 ml de capacidad. Los hongos se cultivaron en caldo patata dextrosa (PDB) en agitación a 23°C durante 7 días. Transcurrido este tiempo se homogenizaron los cultivos con un mezclador comercial (tipo túrmix) previamente esterilizado. El cultivo homogeneizado fue filtrado con una gasa estéril y posteriormente diluido en medio PDB hasta una concentración de 1×10^6 esporas/ml de acuerdo con el recuento en cámara de Neubauer. La viabilidad y el porcentaje de germinación de las esporas se determinaron por siembra y recuento de diluciones en medio PDA. A la suspensión de esporas estandarizada se le adicionó estreptomycin y penicilina G a una concentración final de 100 mg/L y 25 mg/L respectivamente.

Las bacterias a analizar se cultivaron 72 horas en caldo nutritivo a 30°C y se centrifugaron a 12.000 g durante 5 minutos para obtener los sobrenadantes. A continuación se enfrentaron en cada pocillo el sobrenadante del cultivo bacteriano y el cultivo estandarizado de esporas en una relación 1:3 (v/v), respectivamente. Como control negativo se utilizó una solución de solución de cicloheximida 50 µg/ml en

contacto con el hongo, y sin cicloheximida como control positivo. La lectura se realizó observando la turbidez y comparando con los respectivos controles.

3.12.3. Actividad antifúngica de los compuestos volátiles

También se determinó la actividad antifúngica de los compuestos volátiles en medio sólido en placas divididas en dos compartimentos mediante una pared central. En un compartimento se sembró el hongo en PDA, y en el otro, la cepa en agar Molp. Tras la incubación se determinó la inhibición de *V. dahliae* por compuestos volátiles producidos por las cepas ensayadas. Se calculó el porcentaje de inhibición del hongo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{\text{área del control} - \text{área tratamiento}}{\text{área del control}} \times 100$$

3.13. Crecimiento de las cepas bacterianas seleccionadas en distintos medios de cultivo

Se evaluó el crecimiento de las cepas XT1, XT5, XT6, XT7, XT8 y XT212 en medio SG, Molp y M2. El inóculo inicial se realizó a partir de un cultivo de 24 horas (2% v/v). Para ello, las cepas se incubaron a 28°C y se realizaron recuentos en agar nutritivo a las 2, 4, 6, 8 y 24 horas.

3.14. Estudios de compatibilidad entre las bacterias

Para evaluar la compatibilidad entre las bacterias se utilizaron dos métodos en medios sólidos.

En el primer método, se emplearon placas con 10 ml de agar nutritivo (apartado 3.4.5) sobre cuya base se dispusieron 6 torres de Oxford. A continuación se adicionaron 15 ml del mismo medio a sobrefusión y una vez solidificado, se retiraron las torres para descubrir los pocillos resultantes. A partir de una suspensión de las bacterias a evaluar (10^5 UFC/ml) en solución salina fisiológica y con la ayuda de un bastoncillo estéril se inoculó la superficie de las placas para obtener un césped homogéneo. Seguidamente, 20 μ l de distintas suspensiones bacterianas se introdujeron en los pocillos y se incubaron a 28°C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se determinó la existencia o no, de zonas de inhibición de crecimiento.

En el segundo método, se evaluó el crecimiento de cada cepa en medios de cultivo preparados con distintas concentraciones de los sobrenadantes de las distintas cepas

a ensayar. Para ello, el agua utilizada para hidratar el agar nutritivo fue sustituida, completamente y a la mitad del volumen, con los sobrenadantes bacterianos. De este modo se evaluó si alguno de los sobrenadantes de las distintas cepas ejerce un efecto antagónico o sinérgico sobre el crecimiento de alguna otra cepa. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Se utilizó la prueba *t* de Student para el análisis de los resultados. Los valores de $P \leq 0,05$ se consideraron significativos.

3.15. Ensayos *in vivo* de la actividad antifúngica de las cepas en olivos infectados con *V. dahliae*

Se evaluó la eficacia de las cepas seleccionadas en platones de olivo de la variedad Picual, inoculados de forma artificial con la cepa V-024 (patotipo defoliante) de *V. dahliae* después del tratamiento preventivo con dichas cepas. Estos estudios se realizaron en invernadero y en condiciones de semi-campo. Igualmente se hicieron ensayos en condiciones de semi-campo en los que se inocularon las cepas bacterianas tras la infección por el hongo y finalmente se hicieron ensayos en campo para determinar la actividad curativa de la cepa con mayor actividad con olivos afectados por este hongo. Un resumen de las cinco experiencias realizadas y de los parámetros analizados se indica en la Tabla 3.20.

Tabla 3.20. Resumen de experiencias realizadas en olivos para determinar la actividad antifúngica de las cepas

Tipo ensayo	Condiciones	Ubicación	Cepas utilizadas	Olivos	Controles	Duración	Parámetros determinados
Invernadero Actividad: Preventiva	Temperatura: 19-24°C Humedad relativa: 30 - 60% Riego por goteo	Granada	XT1, XT5, XT6, XT7, XT8 y XT212 Medio: Molp Dosis: 2% 200 ml/kg sustrato	70 olivos de 6 meses de edad Macetas con 1,5 l de sustrato	- olivos infectados, sin tratar	90 días	-Malondialdehído (MDA) -Compuestos fenólicos totales -Actividad polifenol oxidasa (PPO) -Número de esporas de <i>V. dahliae</i> /g suelo -Incidencia de infección -Severidad de síntomas - <i>V. dahliae</i> a nivel foliar mediante PCR
Invernadero Actividad: Preventiva	-En cámara de cultivo a 18-20°C, 48 h. -En invernadero a 16- 25°C hasta final Riego por goteo	Córdoba	XT1, XT5, XT6, XT7 y XT8 Medio: SG Dosis: 2% 150 ml/kg sustrato	70 olivos de 12 meses de edad Macetas con 0,8 l de sustrato	-olivos infectados, sin tratar -olivos infectados, tratados con Bioten®	14 semanas	-Severidad de los síntomas -Incidencia de infección -Curva de progreso de la enfermedad -Detección de <i>V. dahliae</i> por crecimiento en PDA
Semi-campo Actividad: Preventiva	Cielo abierto Riego por goteo	Granada	XT1, XT5, XT6 y XT8. Medios: SG y M1 Dosis: 1 y 2% 100 ml/kg sustrato	51 olivos de 12 meses de edad Macetas con 4,3 l sustrato	-olivos sin infectar y sin tratar -olivos infectados y sin tratar	19 meses	-A los 5 meses: severidad y altura de las plantas -A los 19 meses altura de las plantas
Semi-campo Actividad: Post infección	Sombra Riego por goteo Temperatura máxima 39,8 Temperatura mínima 4,1	Murcia	XT1 Medio: Molp Dosis: 1%, 2% y 4% 100 ml/kg sustrato	40 olivos de 4 meses de edad Macetas con 3 l de sustrato	-olivos infectados, tratados con agua -olivos infectados, tratados con medio -olivos infectados, tratados con Tellus® -olivos infectados, tratados con Cercobin®	166 días	A los 68 días: altura de la planta y peso fresco de raíz y parte aérea. A los 166 días: altura de la planta y peso fresco de raíz y parte aérea (n=3)
Campo Actividad curativa	Cielo abierto Cultivo de secano	Granada	XT1 Medio: Dosis: 20 litros por planta (2% v/v), inyectado en suelo	25 olivos de 10 años de edad.	olivos que manifiestan síntomas de seca sin tratar	24 meses	Al inicio y a los 6 meses: recuentos de esporas/g de suelo A los 24 meses: severidad de los síntomas y recuentos de árboles vivos

3.15.1. Actividad antifúngica preventiva en condiciones de invernadero

La actividad antifúngica preventiva frente a *V. dahliae* de las cepas seleccionadas se estudió en condiciones controladas en invernadero. Se emplearon dos invernaderos localizados en Granada y Córdoba.

3.15.1.1. Invernadero en Granada

El ensayo realizado en Granada, se llevó a cabo con un total de 70 plántones de olivos de 6 meses de edad con los cuales se evaluó el efecto de las cepas XT1, XT5, XT6, XT7, XT8 y XT212. Se utilizaron los caldos bacterianos en medio Molp diluidos al 2% en agua y se aplicaron durante 90 días. La aplicación de las cepas bacterianas se realizó 15 y 2 días antes de la inoculación con el patógeno y, 4 y 7 días después de ésta. El patógeno se inoculó por inmersión del sistema radicular en una suspensión conidial (1×10^7 conidios/ml) y posteriormente se trasplantó a macetas nuevas con sustrato de cultivo. Se incluyeron plantas infectadas con *V. dahliae* como control, que fueron tratadas con agua. La dosis de aplicación de los tratamientos fue de 200 ml por kilogramo de sustrato. El ensayo fue realizado en condiciones controladas de temperatura (19-24°C), humedad relativa (30-60%) y riego por goteo en un invernadero experimental. Tras la inoculación con el patógeno, los plántones se trasplantaron a macetas de 1,5 litros de capacidad con sustrato de cultivo. Se realizaron observaciones cada dos semanas para evaluar la aparición y severidad de los síntomas de la infección. Este ensayo fue realizado en un invernadero dispuesto por la empresa Innoplant S.L. bajo la contratación de Herogra Especiales S.L.

A los 30 días de inoculación con el patógeno se determinaron para cada tratamiento los siguientes parámetros:

- Contenido en malondialdehído (MDA) en hojas.
- Contenido en compuestos fenólicos totales (CFT) en hojas.
- Actividad polifenol oxidasa (PPO) en hojas.
- Número de esporas de *V. dahliae* por gramo de suelo (apartado 3.11.2).
- Presencia de *V. dahliae* a nivel foliar mediante PCR.

A los 90 días de inoculación con el patógeno se determinaron nuevamente los parámetros del muestreo anterior y se cuantificó el grado de infección para cada tratamiento mediante la determinación de la incidencia de la infección y la severidad de los síntomas.

- La incidencia de infección: referido al porcentaje de plantas afectadas en cada tratamiento.
- La severidad de los síntomas: clorosis, marchitez, necrosis, defoliación y se calculó según una escala del 0 al 4, donde 0= planta sana o sin síntomas; 1= planta afectada en 1-33%; 2= 34-66%; 3= 67-99%; 4= planta muerta (López Escudero y col., 2004).

Se analizó la significación estadística de las diferencias entre los contenidos de MDA, CFT y PPO entre los grupos de plantas tratadas y no tratadas usando la prueba *t* de Student (Gauvreau y Pagano, 1993). Los valores de $P \leq 0,05$ se consideraron significativos. Para el análisis estadístico del número de esporas de *V. dahliae* se empleó el test de Tukey (Tukey, 1949) mediante el programa GraphPad Prism version 8.2.1 para Windows.

3.15.1.2. Invernadero en Córdoba

El ensayo se llevó a cabo en un invernadero del Departamento de Agronomía de la Universidad de Córdoba donde se evaluaron las cepas XT1, XT5, XT6, XT7 y XT8 crecidas en medio SG. Como control de comparación, se utilizó el producto de uso agrícola Bioten® WP compuesto por *Trichoderma asperellum* y *T. gamsii* empleado frente a *V. dahliae* en olivo. Cada tratamiento estuvo constituido por un total de 10 plantones. Se incluyeron plantas infectadas con *V. dahliae* sin tratar, y plantas no infectadas sin tratamiento. La aplicación de las cepas bacterianas se realizó 15 y 2 días antes de la inoculación con el patógeno y, 4 y 7 días después de ésta. El patógeno se inoculó por inmersión del sistema radicular en una suspensión conidial (1×10^7 conidios/ml) y posteriormente se trasplantó a macetas nuevas con sustrato de cultivo. La dosis de aplicación de los tratamientos bacterianos fue de 150 ml por kilogramo de sustrato. Tras la inoculación, las plantas se mantuvieron en cámara de ambiente controlado a una temperatura de 18 a 20°C durante 48 h y posteriormente se trasladaron a invernadero, con temperaturas entre 16 y 25°C hasta la aparición de síntomas.

La evaluación de la enfermedad se llevó a cabo atendiendo a la severidad de los síntomas como se ha indicado previamente (López Escudero y col., 2004). Los valores de incidencia se compararon mediante el test de comparación múltiple de proporciones de Zar (Analytical Software, 2013). Se realizaron análisis de la varianza de los valores de severidad y comparación de medias mediante el test LSD al nivel de probabilidad del 5%. Al final del experimento se realizaron aislamientos, en medio PDA, de las plantas afectadas, a fin de confirmar la infección por *V. dahliae*.

3.15.2. Actividad antifúngica preventiva en condiciones de semi-campo

La actividad antifúngica preventiva de las cepas seleccionadas se estudió asimismo en condiciones de semi-campo con sol directo (Granada) y sombra (Murcia).

3.15.2.1. Condiciones de semi-campo en Granada

En condiciones de semi-campo y con sol directo se evaluó el efecto preventivo de las cepas, XT1, XT5, XT6 y XT8 crecidas en dos medios de cultivos: medio SG (apartado 3.4.12) y medio M1 (apartado 3.4.16) sobre *V. dahliae*. Se ensayaron los cultivos diluidos al 1 % y al 2 % en agua. Igualmente se hicieron mezclas con las distintas cepas.

Se incluyeron dos grupos control: sin tratamiento e inoculado con el patógeno y el segundo sin tratar y sin infectar. Se utilizaron 51 plántones de olivo de 1 año de edad que se ubicaron en la terraza de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada en condiciones de semi-campo, a cielo abierto durante 19 meses. Se instaló un sistema de riego que suministraba 100 ml de agua por día a cada planta. Las cepas bacterianas se aplicaron 15 y 2 días antes de la inoculación con el patógeno y, 4 y 7 días después de ésta. La dosis de aplicación de las cepas fue de 100 ml por kilogramo de sustrato para cada planta. La inoculación con el patógeno se realizó por inmersión del sistema radicular en una suspensión conidial (1×10^7 conidios/ml) tras lo cual, se trasplantaron a macetas de 4,3 litros de capacidad con sustrato de cultivo.

Se realizaron observaciones mensuales para evaluar la aparición y severidad de los síntomas de la infección. Tras 5 meses de ensayo, se determinó la longitud de la parte aérea de las plantas y el número de hojas, tomando en consideración las hojas marchitas, con clorosis y caídas y, tras 14 meses (19 meses totales), se determinó el peso fresco y seco de las partes aéreas. Se analizó la significación estadística de las diferencias entre los grupos de plantas tratadas y no tratadas usando la prueba *t* de Student (Gauvreau y Pagano, 1993). Los valores de $P \leq 0,05$ se consideraron significativos.

3.15.2.2. Condiciones de semi-campo en Murcia

En condiciones de semi-campo pero en situación de sombra se evaluó la actividad antifúngica de la cepa XT1 frente a *V. dahliae* en plántones de olivos de la variedad Picual de 4 meses de edad, a través de la empresa Métodos Servicios Agrícolas S.L. en Murcia. La cepa XT1 se evaluó a distintas concentraciones (1%, 2% y 4% v/v), dos productos de uso agrícola, Tellus® WP (*T. gamsii* 2% y *T. asperellum* 2% p/p) y Cercobin® 70WG (Metil tiofanato 70% p/p) a las concentraciones recomendadas para el manejo de plagas. Se utilizaron como controles dos grupos de olivos inoculados con *V. dahliae*, uno tratado con agua y otro tratado con medio de cultivo. Se utilizaron 5 plántones de olivos en cada grupo de ensayo. Los olivos se trasplantaron en macetas de 3 litros de capacidad con una mezcla de sustrato de cultivo constituida por turba:arena 1:1 v/v. La inoculación del patógeno se realizó adicionando 100 ml de una suspensión de *V. dahliae* en agua estéril (10^7 conidios/ml) por kilogramo de suelo, en la zona de la raíz. La concentración final fue de 10^6 conidios/gramos de suelo. Tras 72 horas de la inoculación del suelo se adicionaron 100 ml por kilogramo de suelo de los distintos tratamientos. Los tratamientos se repitieron 2 veces más a intervalos de 14 días. Se realizaron dos evaluaciones, a los 68 días y a los 166 días después de la última aplicación. En cada evaluación se determinó la altura de la planta (cm), el peso fresco de la raíz (g) y el peso fresco de la planta (g). El análisis de los resultados se realizó utilizando el Test de Duncan (Duncan's New Multiplate Range Test, MRT) (Duncan, 1955).

3.16. Ensayo de campo de la actividad antifúngica curativa de la cepa XT1 en olivos con síntomas de infección por *V. dahliae*

Se evaluó la actividad antifúngica de una formulación con la cepa XT1 (Heroprotec Micro® 2% v/v) en una finca de secano de la provincia de Granada con 20 olivos que manifestaban síntomas de verticilosis. Cada olivo se trató con 20 litros de la formulación en la zona de la raíz mediante el uso de una piqueta. A los 7 meses se repitió la aplicación en iguales condiciones. La severidad de la enfermedad se determinó mediante observaciones a los 7 y a los 14 meses, registrando número de ramas secas por árbol, número de esporas de *V. dahliae* por gramo de suelo y estado general del olivo. Como control, se hizo un seguimiento de la evolución de los síntomas de la enfermedad en 5 árboles con verticilosis que no fueron tratados con la formulación y que se encontraban adyacentes al grupo tratado.

3.17. Determinación de la presencia y permanencia de las cepas bacterianas seleccionadas en olivos

3.17.1. Obtención de mutantes resistentes a rifampicina

Para determinar la presencia y permanencia de las cepas bacterianas en muestras vegetales y de suelos, se obtuvieron mutantes resistentes a rifampicina de las cepas XT1 y XT212 siguiendo el protocolo de rutina del Instituto para la Biología Integrativa de la Célula (I2BC) de la Universidad de Paris-Sud, Francia, cedido amablemente por la Dra. Marta Torres-Béjar. Esta técnica permite la selección y el recuento de las cepas de interés en medios suplementados con este antibiótico.

Las bacterias se incubaron a 28°C durante 24 horas en 5 ml de caldo nutritivo y se centrifugaron a 6.000 g durante 30 segundos. Se descartó el medio de cultivo y el precipitado se resuspendió en 200 µl de solución salina fisiológica. Se sembraron 100 µl de la suspensión en placas con agar nutritivo suplementado con rifampicina 100 µg/ml. Se extendió con asa y se incubó a 28°C durante 48 horas. Tras la incubación, se realizaron pases de las colonias en medio de cultivo nuevo con la presión selectiva del antibiótico y alternando siembras en medio sin antibiótico y con antibiótico para asegurar la transferencia y estabilidad de la resistencia antibiótica en la progenie.

3.17.2. Aplicación de los mutantes rif+ sobre plantas y sustratos

Los mutantes resistentes a rifampicina se crecieron en caldo Molp sin antibiótico y se aplicaron en las plantas de olivo en macetas mediante riego a la dosis de 100 ml por kilogramo de suelo a partir de una dilución al 2% v/v, y se repitió la aplicación a los 15 días. Como control de ensayo se incluyó un grupo de 3 plantas sin tratar.

3.17.3. Recuento de microorganismos rif⁺ de las muestras vegetales

Para evaluar la permanencia y carácter endofítico de nuestras bacterias, las muestras vegetales (hojas y raíces) se lavaron inicialmente con abundante agua destilada estéril y etanol 70% hasta visualizar las partes limpias. Se separaron las raíces de los tallos de las plantas y se sumergieron en una solución de lejía comercial diluida al 50% v/v en agua estéril durante 1 minuto y 30 segundos. Mediante vortex durante 20 segundos, se descartó la solución de lejía y se lavó tres veces con abundante agua destilada estéril en iguales condiciones. Las raíces y tallos se transfirieron a un tubo plástico de 15 ml y con la ayuda de una varilla estéril, se homogenizaron en 4,5 ml de solución salina estéril. A continuación, se prepararon diluciones (10^{-1} hasta 10^{-5}), sembrándose en placas con agar nutritivo suplementado con rifampicina y se incubaron a 28°C durante 48 horas. En todos los ensayos, se comprobó paralelamente que no crecían microorganismos resistentes a la rifampicina, ni en suelos ni en plantas sin tratar.

3.18. Análisis de metabolitos implicados en la actividad antifúngica

3.18.1. Actividad antifúngica de los sobrenadantes de las cepas XT1, XT5, XT6, XT8 y XT212.

Para el ensayo con sobrenadantes, se emplearon los cultivos de las distintas cepas en medio Molp con 3 días de incubación. Tras la centrifugación a 5.000 g durante 5 minutos, los sobrenadantes fueron utilizados para hidratar el medio PDA. Para ello, el agua para hidratar el medio de cultivo fue sustituida completamente y a la mitad del volumen. El pH se ajustó a $5,6 \pm 0,2$ y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. A continuación se colocó un trozo del micelio del hongo sobre las placas y se incubó a 20°C durante 20 días. El control negativo se realizó con una placa de PDA hidratada completamente con agua. El porcentaje de inhibición del crecimiento del fitopatógeno fue calculado usando el programa de procesamiento de imagen ImageJ 1.52a. Por otra parte, se evaluó la actividad antifúngica de los sobrenadantes de las distintas cepas bacterianas tras ser sometidos a 121°C durante 20 minutos.

3.18.2. Actividad antifúngica de los lipopéptidos producidos por XT1 y XT212

Los lipopéptidos de las cepas XT1 y XT212 se extrajeron tras su cultivo en dos medios distintos, medio Molp y medio M2, empleando la metodología descrita por Romero y col., 2007. El ensayo antifúngico se llevó a cabo como se ha descrito en el apartado 3.12. El lipopéptido se evaluó a las siguientes concentraciones finales: 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 20 mg/mL con un volumen final de 1200 μ l por pocillo. Además del control de crecimiento del hongo y del control de inhibición con cicloheximida, se incluyó un pocillo control con el medio PDB para comprobar su esterilidad y un segundo control con lipopéptido (10 mg/ml) obtenido de la cepa XT1.

3.19. Ensayos de bioseguridad

3.19.1. Ensayo de sensibilidad con *E. coli* MC4100

En este ensayo se evaluó la supervivencia de *E. coli* MC4100 frente a sobrenadantes de la cepa XT1 utilizando la metodología descrita por Vílchez y col., 2016. Para ello, se mezclaron 0,5 ml del sobrenadante de un cultivo en fase estacionaria de XT1 con 0,5 ml de una suspensión en fase exponencial de *E. coli* MC4100 (10^8 - 10^9 UFC/ml) en tampón M9 (apartado 3.5.6) incubándose durante 1,5 horas a 25°C. A continuación, se realizaron diluciones en el mismo tampón y se sembraron en placas con medio TSA para determinar el número de UFC/ml. Para permitir la comparación, se incluyeron en este ensayo, los sobrenadantes de *P. putida* KT2440, *B. cepacia* CC-A174 y un producto de uso agrícola a base de sulfato de cobre utilizado a la concentración recomendada para el manejo de plagas en olivos. El control negativo se realizó con medio TSB en lugar de los sobrenadantes. Tras la incubación, se determinaron las UFC/ml de *E. coli* MC4100 en cada tratamiento y se calculó su significancia con respecto al control en medio M9 ($P < 0,05$ Prueba *t* de student).

3.19.2. Ensayo de toxicidad con *V. fischeri*

Para evaluar el impacto potencial de los productos liberados por la cepa XT1 sobre el metabolismo de otros microorganismos se empleó el sistema Microtox® (Johnson, 2005) el cual examina la toxicidad aguda de muestras medioambientales y compuestos puros basándose en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *V. fischeri* ATCC 49387 en presencia de agentes nocivos (Bulich, 1979, Vílchez y col., 2016). Esta metodología se llevó a cabo en Instituto del Agua de la Universidad de Granada, donde se evaluaron sobrenadantes obtenidos a partir de un cultivo en fase estacionaria en medio Cooper (apartado 3.4.11) siguiendo las instrucciones del fabricante. La toxicidad se expresó como la concentración de agente que produce la reducción del 50% de la luminiscencia inicial (EC50) (Onorati y Mecozzi, 2004).

3.19.3. Ensayo de toxicidad con el nematodo *C. elegans*

Para llevar a cabo este ensayo, se utilizó la cepa N2 de tipo salvaje de *C. elegans* proveniente del departamento de Fisiología de la Universidad de Granada con la que se han llevado a cabo ensayos de toxicidad en medio sólido (Tan y col., 1999) y en medio líquido (Williams y Dusenbery, 1990). El método en medio sólido fue utilizado para comparar la toxicidad de cultivos de la cepa XT1 con la de *P. aeruginosa* (PAO 32), una bacteria que causa la muerte del nematodo (Darby y col., 1999; Tan y col., 1999). El método en medio líquido se utilizó para evaluar la toxicidad y calcular la LC50 (concentración letal que causa la muerte del 50 % de los animales ensayados) de dos

productos de uso agrícola (sulfato de cobre y abamectina) y, compararlos con un cultivo en fase estacionaria de la cepa XT1.

3.19.3.1. Cultivo de *C. elegans*

Como fuente de alimentación del nematodo se empleó un cultivo de la cepa *E. coli* OP50, una bacteria auxótrofa para el uracilo cuyo crecimiento es limitado en el medio NGM, lo que facilita la observación y el recuento de los gusanos y de los huevos. Para su obtención, se prepararon tubos con 5 ml de caldo Luria Bertani (LB), se inocularon con *E. coli* OP50 y se incubaron a 37°C en agitación durante 24 horas. La suspensión obtenida fue sembrada sobre placas de NMG conservándose el resto a 4°C para los siguientes ensayos, hasta un máximo de 7 días (Stiernagle, 2006).

El cultivo y mantenimiento del nematodo se realizó en placas de medio NGM (apartado 3.4.9), las cuales se sembraron con 50 µl del cultivo de *E. coli* OP50 en el centro de cada placa y extendiendo con la ayuda del asa de siembra y evitando siempre tocar los bordes. A continuación, se incubaron a 30°C durante 14 horas y se enfriaron a 18°C antes de adicionar los nematodos. Las placas que no se utilizaron inmediatamente se guardaron cerradas herméticamente a 4°C durante 3 semanas para siguientes ensayos.

La transferencia y sincronización de los huevos de *C. elegans* se realizó a partir de una placa madre con huevos y larvas en diferentes estadíos. Inicialmente se lavó la superficie varias veces con agua destilada estéril para arrastrar los huevos y las larvas y se recolectaron en fracciones de 3,5 ml en 2 tubos de plástico de 15 ml de capacidad. A cada tubo se le adicionaron 500 µl de NaOH 5N y 1 ml de solución de hipoclorito de sodio al 5%. Los tubos se agitaron 5 veces en vortex durante 10 segundos a intervalos de 2 minutos, y se centrifugaron a 1.300 g durante 30 segundos. Cuidadosamente se aspiró el sobrenadante hasta dejar un volumen aproximado de 100 µl de sedimento. Se lavó 2 veces con 5 ml de agua destilada estéril y se centrifugó nuevamente a 1.300 g durante 30 segundos. Tras la segunda centrifugación, el sobrenadante se aspiró dejando aproximadamente 500 µl de sedimento (Stiernagle, 2006) para ser usados en los métodos de toxicidad sólido y líquido.

3.19.3.2. Evaluación de la toxicidad en medio sólido

Este método fue realizado de acuerdo al protocolo descrito por Navas y col., 2007 con algunas modificaciones. Inicialmente, se transfirieron 50 µl del sedimento obtenido en el apartado anterior, en los bordes de placas de medio NGM y césped de *E. coli* OP50. A las 18 horas de incubación a 20°C los huevos eclosionaron y las larvas se desplazaron hacia el interior del césped de *E. coli* OP50. Con la ayuda de agujas de jeringas de 0,5 ml se transfirieron 5 larvas a placas con medio NGM y césped de la cepa XT1. Como control de crecimiento se sembraron larvas en medio NGM con césped de *E. coli* OP50 y como control de toxicidad, con césped de *P. aeruginosa* PAO. Se realizaron tres réplicas de cada placa y se incubaron a 24°C durante 8 días. Los nematodos fueron examinados cada 24 horas con lupa de 20X de aumento y se determinó el número de

individuos vivos y muertos, considerando muertos aquellos que no mostraban movimiento espontáneo.

3.19.3.3. Evaluación de la toxicidad en medio líquido

El método en medio líquido se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Williams y Dusenbery, 1990 recogida en los protocolos estandarizados de la Sociedad Americana para Pruebas y Materiales ASTM, 2014. Para ello, se transfirieron 100 µl del sedimento de *C. elegans* obtenido en el apartado 3.19.3.1 a pocillos de una placa de 48 pocillos que contenía previamente 500 µl de tampón M9. Las placas se incubaron a 20°C durante 24 horas. Se visualizaron los pocillos, seleccionando aquellos que contenían larvas en fase L1, a partir de los cuales se transfirieron 250 µl a placas de agar NGM, que contenían el césped de *E. coli* OP50. Se incubaron a 20°C durante 24 horas para obtener larvas limpias y sincronizadas entre fase L2 y L3. A continuación, con la ayuda de una jeringa de 0,5 ml, se colocaron 10 larvas por pocillo en placas que contenían 500 µl de medio K+ (apartado 3.4.14).

Se evaluaron los sobrenadantes de los cultivos de 24 horas de la cepa XT1 y *P. aeruginosa* PAO a las diluciones 1/2, 1/4, 1/8 y 1/50, en un volumen final de 1 ml. Como controles, se llevaron a cabo las evaluaciones de dos productos químicos comerciales utilizados a nivel foliar para el manejo de plagas, sulfato de cobre y abamectina al 0,2%, 0,1% y 0,05% p/v. A continuación, se agregaron 50 µl de un cultivo de 24 horas de *E. coli* OP50 concentrado a la mitad de su volumen a todos los pocillos evaluados como alimento para el nematodo. El volumen final por pocillo fue de 1 ml. Tanto las muestras como los controles se evaluaron por duplicado. Las placas se incubaron a 20°C durante 24 horas, tras lo cual se contaron los supervivientes por pocillo y se determinó la LC50 para cada sobrenadante o compuesto evaluado.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Cultivo por la técnica de dilución a extinción

A partir de los 4800 pocillos inoculados con las muestras de los seis puntos de muestreo solo 182 pocillos resultaron positivos (mostraron crecimiento) (Tabla 4.1). Los primeros pocillos positivos comenzaron a observarse a partir del día 15, siendo el tiempo máximo considerado para la toma de resultados, 60 días. Los pocillos positivos se sembraron en medio R2A suplementado con sales Subow y tras sucesivos pases se obtuvieron un total de 354 aislados. Los porcentajes de cultivo estuvieron comprendidos entre el 1,8 y el 6,1% con una mayor proporción de pocillos positivos en las muestras provenientes de Finca La Salina.

Tabla 4.1. Porcentaje de cepas cultivables para las 6 muestras de suelo

Muestras	bacterias/ g suelo	pocillos inoculados	pocillos positivos	% de cultivo ¹
S1	4,3 x 10 ⁸	1056	44	4,3
S2	3,8 x 10 ⁷	816	20	2,5
S3	4,1 x 10 ⁸	1008	18	1,8
FS1	1,6 x 10 ⁸	624	37	6,1
FS2	1,6 x 10 ⁹	672	40	6,1
FS3	1,8 x 10 ⁹	624	23	3,8

¹Determinado por la ecuación $V = -\ln(1-p)/X$, donde: V es el estimado de células cultivables, p es la proporción de pocillos positivos con crecimiento dividido por el número de pocillos inoculados totales y X es el inóculo inicial de células añadidas en cada pocillo (Button y col., 1993; Connon y Giovannoni, 2002). S1-3: Surgencia; FS1-3: Finca La Salina.

4.2. Caracterización fenotípica

La caracterización fenotípica de los 354 aislados se realizó de forma global con 13 pruebas fenotípicas cuyos resultados se relacionan detallados en el apéndice 1.

4.2.1. Caracterización morfológica y fisiológica

Los aislados obtenidos mediante el método de dilución a extinción se caracterizaron en primer lugar morfológicamente y por la estructura de la pared celular mediante la tinción de Gram. De los 354 aislados, el 84,2% fueron Gram negativos y el 15,8% Gram positivos. En

las muestras de Rambla Salada analizadas, se encontraron cocos y bacilos Gram positivos en muy poca proporción, 0,8% y 15%, respectivamente. En relación a la prueba de la oxidasa, catalasa y movilidad realizada a los aislados, el 87% fueron oxidasa positivos, el 78% catalasa positivos y el 55% mostraron movilidad.

En lo que respecta al crecimiento a distintas concentraciones de sales, la mayoría de los aislados fueron capaces de crecer en un rango amplio de salinidad mostrando un marcado carácter eurihalino, 31 crecieron entre 1-10%, 98 entre 1-15%, 128 entre 1-20% y 97 entre 1-25% p/v NaCl, de estos últimos, 9 no crecieron a concentraciones de sales inferiores a 3%.

4.2.2 Actividades enzimáticas

Del total de 354 aislados, 116 fueron capaces de hidrolizar la caseína, 141 el almidón, 39 hidrolizaron la gelatina, 159 produjeron lecitinasa, 28 hidrolizaron la quitina, 67 hidrolizaron el Tween 20, 84 hidrolizaron el Tween 80 y 152 produjeron DNAsa. En la Figura 4.1 se muestra el porcentaje de aislados con actividad hidrolítica para los sustratos evaluados, lo que pone de manifiesto su potencial biotecnológico.

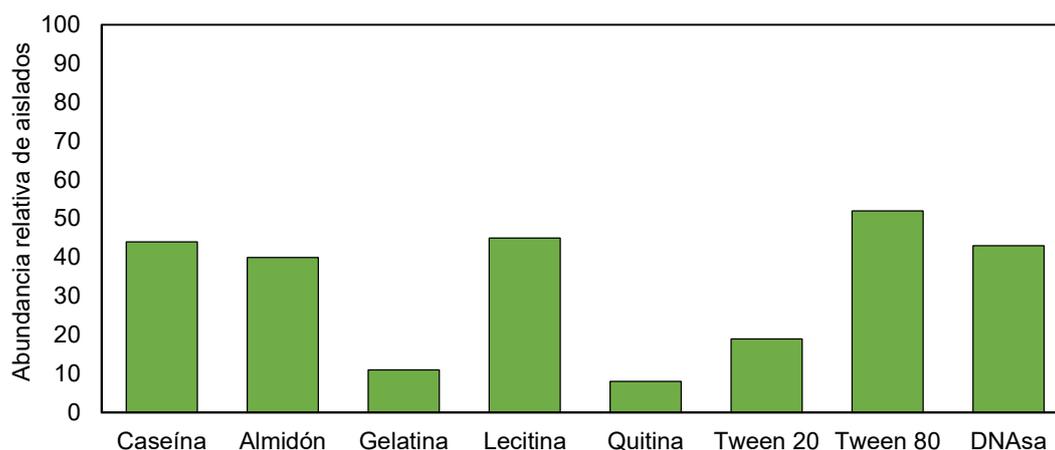


Figura 4.1. Actividades enzimáticas de las cepas. Los resultados representan la abundancia relativa de 354 aislados.

4.3. Estudio filogenético

Las secuencias del gen del ARNr 16S de los 354 aislados se compararon con las disponibles en las bases de datos GenBank y EzTaxon. El análisis reveló que las cepas pertenecían a los filos *Proteobacteria* (81,9%), *Firmicutes* (11,3%), *Actinobacteria* (4,5%) y *Bacteroidetes* (2,3%) siendo la clase *Gammaproteobacteria* la predominante (65,7%). Las secuencias compartían identidad entre 94% y 100% con secuencias de especies ya descritas, de las cuales, 25 mostraron identidad <98%. Este grupo de 25 aislados se

sometió a un estudio filogenético más profundo. Para ello, dicho gen se clonó en el plásmido pGEM-T y se introdujo mediante transformación en *E. coli* DH5 α . El plásmido con el inserto fue purificado y secuenciado empleando la pareja de primers SP6/T7. La identificación de las especies filogenéticamente más cercanas fue llevada a cabo inicialmente por BLAST frente a secuencias de cepas tipo válidamente descritas y representantes de filotipos no cultivados presentes en las bases de datos del GenBank/EMBL/DDBJ. También se realizó la identificación utilizando el servidor EzTaxon.

Tras el análisis de las 25 secuencias, 16 resultaron tener una identidad >98% con especies válidamente descritas, mientras que 9 secuencias continuaron mostrando identidad <98%. Estas últimas corresponden con los siguientes aislados: D14 (97% de identidad con *Lysobacter daejeonensis* GH1-9T), D22-912 (95,9% de identidad con *Blastomonas natatoria* DSM3183T), D6 (97,9% de identidad con *Marinobacterium nitratireducens* CN44), D7 (96% de identidad con *Marinobacterium lutimaris* AN9), D15 (97,4% de identidad con *Roseovarius tolerans* EL-172T), A21 (97,9% de identidad con *Roseovarius pacificus* 81-2), A19 (98,9% de identidad con *Roseovarius tolerans* EL172T), A46 (98% de identidad con *Pseudoruegeria aquimaris* SW-255T), D1 (97,9% de identidad con *Microbulbifer taiwanensis* CC-LN1-12T).

Tras el análisis global de los 354 aislados, se identificaron 60 especies distintas ya descritas. La Tabla 4.2 muestra estas cepas, las cuales presentan porcentajes de identidad $\geq 98\%$. Los taxones más abundantes fueron *Marinobacter* (38,9%), *Halomonas* (20,2%) y *Bacillus* (11,2%). Sus secuencias se depositaron en la base de datos GenBank y les fueron asignados los códigos de acceso del MH266125 al MH266185.

Tabla 4.2. Especies aisladas por dilución a extinción. Identificación por comparación de sus secuencias del gen ARNr 16S usando BLAST.

Aislado	Nº GenBank	% identidad	Especie más cercana (Nº GenBank)
PL20	MH266125	99	<i>Acinetobacter albensis</i> ANC 4874 (NR_145641)
25-D-8	MH266126	99	<i>Alcanivorax jadensis</i> T9 (NR_025271)
M35R	MH266127	100	<i>Alkalibacillus silvisoli</i> BM2 (NR_041482)
SR54	MH266128	99	<i>Bacillus enclensis</i> SGD-1123 (KF265350)
D16_1	MH266129	100	<i>Bacillus halotolerans</i> ATCC 25096 (LPVF01000003)
D28_1	MH266130	100	<i>Bacillus safensis</i> kv2 (MH200636)
16SRL	MH266131	100	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 (AJVF01000043)
R63L	MH266132	100	<i>Bacillus tequilensis</i> FJAT-40022 (MG905894)
SR43	MH266133	100	<i>Bacillus thioparans</i> KmS3200909 (MG011570)
M5-FL	MH266134	98	<i>Bacillus velezensis</i> CR-502 ^T (AY603658)
R25L	MH266136	99	<i>Citreimonas salinaria</i> CL-SP20 (NR_043303)
SR37F	MH266137	99	<i>Erythrobacter litoralis</i> HMF8222 (KY047411)
D11	MH266138	98	<i>Erythrobacter longus</i> DSM 6997 (NR_041889)
2-C-1	MH266139	99	<i>Erythrobacter marinus</i> HWDM-33 (NR_109054)
D40-857	MH266140	100	<i>Flavobacterium jumunjinense</i> HME7102 (NR_109367)
M35(1)RL	MH266141	100	<i>Halobacillus alkaliphilus</i> SP22 (KX885464)
ML35R	MH266142	100	<i>Halobacillus halophilus</i> 3 (NR_075035)
M45	MH266143	98	<i>Halomonas alimentaria</i> YKJ-16 (NR_025054)
F-5-2	MH266144	99	<i>Halomonas fontilapidosi</i> HMF4436 (KT984005)
SR33	MH266145	99	<i>Halomonas gomseomensis</i> M12 (AM229314)

SR1	MH266146	99	<i>Halomonas janggokensis</i> FMH54 (KX821765)
28-C-6	MH266147	99	<i>Halomonas stenophila</i> N8 (MG563245)
A-10-2	MH266148	98	<i>Halomonas ventosae</i> NRS2HaP1 (LT221212)
L30	MH266149	99	<i>Idiomarina abyssalis</i> MCCC:1A05090 (KM407705)
L30-F	MH266150	98	<i>Idiomarina homiensis</i> MCCC:1A05917 (KM407707.1)
26-F-6	MH266151	99	<i>Idiomarina loihiensis</i> GSL 199 (CP005964)
26f-6	MH266152	99	<i>Idiomarina ramblicola</i> R22 (NR_025806)
L30B	MH266153	99	<i>Idiomarina salinarum</i> MCCC:1A02680 (KM407738)
D14-37	MH266154	100	<i>Lysobacter concretionis</i> Ko07 (NR_041003)
G-6-2	MH266155	99	<i>Marinobacter adhaerens</i> NIOSSK56#15(KY604871)
38CL	MH266156	99	<i>Marinobacter algicola</i> VSW110 (KC534310)
14Df	MH266157	99	<i>Marinobacter aquaticus</i> M6-53 (LT714149)
D-4-4	MH266158	99	<i>Marinobacter flavimaris</i> D6028 (FJ161304)
17-F-15	MH266159	99	<i>Marinobacter guineae</i> M3B (AM503093)
24fL	MH266160	100	<i>Marinobacter nanhaiticus</i> EAR19 (KU320883)
28-C-8	MH266161	100	<i>Marinobacter pelagius</i> KJ-W13 (JQ799110)
27-E-1	MH266162	99	<i>Marinobacter persicus</i> M9B (NR_109110)
D17-1	MH266163	99	<i>Marinobacter salsuginis</i> 11WSA1 (LN794817)
F-7	MH266164	100	<i>Marinobacter sediminum</i> UDC408 (HM031994)
709	MH266165	100	<i>Marinobacterium lutimaris</i> AN9 (NR_116590)
16SF	MH266166	100	<i>Microbulbifer salpaludis</i> SM-1 (NR_025232)
1-5-E	MH266167	98	<i>Microbulbifer taiwanensis</i> CC-LN1-12 (NR_108519)
D26	MH266168	100	<i>Modestobacter marinus</i> AL27 (KU258224)
R14	MH266169	99	<i>Palleronia marisminoris</i> 221-F2 (KJ638254)
SR14FL	MH266170	99	<i>Pararhodobacter aggregans</i> D1-19 (NR_115018)
18RL	MH266171	99	<i>Planococcus maritimus</i> Y67 (KU601234)
M28-R	MH266172	100	<i>Planococcus rifiatoensis</i> M8 (CP013659)
L43-F	MH266173	98	<i>Pseudoalteromonas issachenkonii</i> KMM 3549 P011030
L11-R	MH266174	99	<i>Pseudomonas psychrotolerans</i> Pp1 (MH233970)
23-B-5	MH266175	98	<i>Pseudoruegeria aquimaris</i> SW-255 (NR_043932)
M6RL	MH266176	99	<i>Rheinheimera pacifica</i> NBRC 103167 (NR_114230)
6FL	MH266177	99	<i>Rheinheimera tangshanensis</i> RB-213 (JQ361154)
13-B-7	MH266178	99	<i>Roseovarius mucosus</i> DFL-24 (NR_042159)
D-6-6	MH266179	98	<i>Roseovarius nubinhibens</i> SM25 (LT600603)
12-D-7	MH266180	99	<i>Roseovarius pacificus</i> 81-2 (NR_043564)
6-F-3	MH266181	99	<i>Roseovarius tolerans</i> EL-164 (KP723471)
20-B-2	MH266182	99	<i>Sediminimonas qiaohouensis</i> YIM B025 (EU878004)
4-C-4	MH266183	100	<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211 (NR_042766)
6-D-7	MH266184	99	<i>Wenzhouxiangella marina</i> 4S-CH-S3-s2 (MG264256)
M34FL	MH266185	99	<i>Winogradskyella arenosi</i> R60 (NR_041689)

Del grupo de 9 secuencias con identidad <98%, se continuaron los análisis genéticos y quimiotaxonómicos con las cepas D22-912, D15 y A21 con la finalidad de caracterizarlas y describirlas como nuevos taxa.

4.4. Caracterización de nuevos taxa

Para la caracterización de los nuevos taxa se amplió el estudio fenotípico realizado inicialmente (apartados 4.2. y 4.3.). Se determinó el rango de crecimiento y el óptimo a distintos pH y temperaturas y en algunos casos la presencia de pigmentos fotosintéticos y

el crecimiento en anaerobiosis. Por otra parte y con la ayuda de sistemas miniaturizados se analizó la presencia de diversos enzimas, la asimilación de compuestos orgánicos y la producción de ácidos de los azúcares (API 20NE, API ZYM y API 50CH).

Para los ensayos genéticos se determinó el contenido Guanina + Citosina (G+C) a partir de la temperatura media de desnaturalización (T_m), y la hibridación ADN-ADN *in silico* a partir de las secuencias completas de los genomas. Los ensayos quimiotaxonómicos se llevaron a cabo mediante el análisis de los fosfolípidos de la membrana, la determinación de las quinonas, la composición de ácidos grasos y el tipo de pared celular. Finalmente el estudio morfológico se abordó mediante microscopía electrónica de transmisión. Hasta la fecha hemos descrito y publicado 2 especies nuevas (Castro y col., 2017; Castro y col., 2018) y se encuentra en revisión la publicación de una nueva especie más (Castro y col., 2019).

4.4.1. Descripción de la cepa D22-912

La cepa D22-912 es un bacilo corto gram negativo, aerobio estricto, móvil con un flagelo polar, con un tamaño de 0,6-0,7 x 1,5-2,3 μm (Figura 4.2), catalasa y oxidasa positivo y reproducción por división asimétrica. Crece en un rango de NaCl de 0 a 5% p/v y presenta un crecimiento óptimo al 3% p/v NaCl, a una temperatura entre 4 y 32°C, siendo 30°C su temperatura óptima y en un rango de pH entre 6 y 9, siendo el pH óptimo para el crecimiento 7.

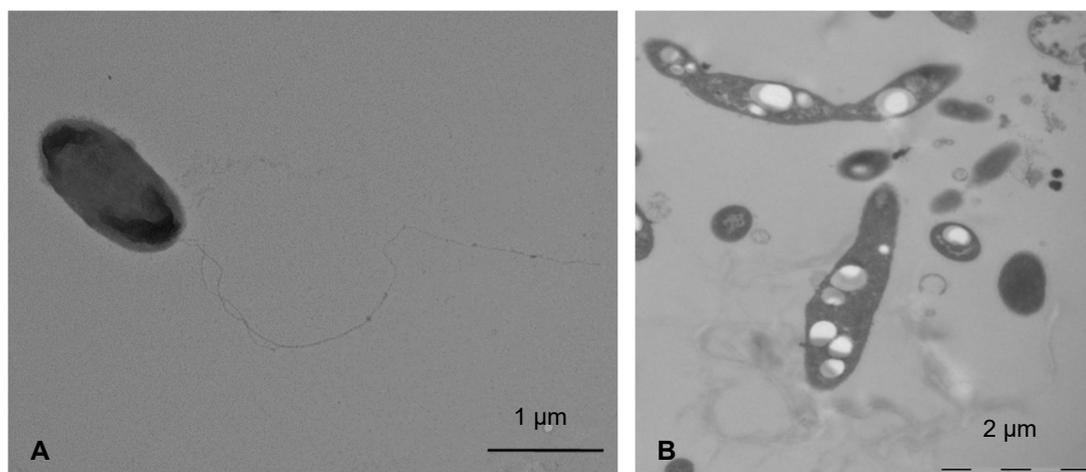


Figura 4.2. Micrografía electrónica a partir de una tinción negativa de las células de la cepa D22-912. A, célula que muestra un flagelo polar. B, corte fino de la cepa D22-912 que muestra división asimétrica y gránulos de poli- β -hidroxialcanoato (PHA). Las células se cultivaron en caldo marino a 30°C durante 24 horas con agitación a 150 rpm y se tiñeron con acetato de uranilo al 1% p/v.

Los estudios filogenéticos basados en la secuencia del gen del ARNr 16S (1440 pb) mostraron que las especies más relacionadas filogenéticamente eran *B. natatoria* EY 4220^T (95,9%) y *B. ursincola* KR-99^T (95,8%). Las pruebas bioquímicas, fermentación de azúcares y pruebas enzimáticas se compararon con las de las cepas *B. natatoria* CECT

4273^T y *B. ursincola* DSM 9006^T (Tabla 4.3) (Castro y col., 2017). El contenido de G+C fue 63 mol%. La cepa D22-912 comparte características con las cepas *B. natatoria* CECT 4273^T y *B. ursincola* DSM 9006^T. Las células de las tres cepas son bacilos gram negativos. Todas son positivas para la catalasa, oxidasa, fosfatasa alcalina, leucina arilamidasa, pigmentos carotenoides, bacterioclorofila α , naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, esterasa C4, esterasa lipasa C8. Todas las células son negativas para la producción de indol, reducción de nitrito, hidrólisis de gelatina, arginina dihidrolasa, ureasa, lipasa C14, α -quimotripsina, α -galactosidasa, β -galactosidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -manosidasa, α -fucosidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa. La producción de ácidos a partir de la D-glucosa, D-fructosa, D-manosa, L-sorbose, L-rhamnosa, L-arabinosa, glicerol, eritritol, arabinosa, D-ribose, L-xilosa, D-adonitol, dulcitol, inositol, D-manitol, D-sorbitol, adipato y trehalosa es negativa. La N-acetil- β -glucosamina, manosa, ácido málico, ácido fenilacético y ácido cáprico no pudieron utilizarse como única fuente de carbono para las tres cepas.

Tabla 4.3. Características que distinguen la cepa D22-912 de otras especies del género *Blastomonas*.

Características	1	2	3
Pigmentación de la colonia	amarilla	naranja	amarilla
Parámetros de crecimiento			
Rango de temperatura	28-32	30-35 ^a	25-30 ^b
pH óptimo	7,0	7,0-7,5 ^a	7,0-8 ^b
Rango de concentración de NaCl (%p/v)	0-5	0-3 ^a	0-3 ^b
Hidrólisis de la esculina	-	-	+
Asimilación (API 20NE)			
D-glucosa	+	-	+
Manitol	débil	-	-
Maltosa	+	+	+
Gluconato	-	-	+
Citrato trisódico	-	-	+
Actividad enzimática (API ZYM)			
Reducción de nitratos	+	-	-
Tripsina	-	+	+
Fosfatasa ácida	débil	+	+
β -glucuronidasa	-	+	-
Producción de ácidos (API 50CH)			
D-xilosa	-	+	-
Citrato férrico de esculina	-	-	-
Melezitosa	-	-	+
Glucógeno	-	+	-
5-ketogluconato potásico	-	-	+
Lípidos polares	DPG, PG, PE, PC, SGL, PL, PGL, L	DPG, PG, PE, PC, SGL, PL, PGL, L, GL	DPG, PG, PE, PC, SGL, PL, PDE, PME ^c
Contenido de G+C (mol%)	63	64,8 ^a	65,1 ^b

1, D22-912; 2, *B. natatoria* CECT 4273^T; 3, *B. ursincola* DSM 9006^T. DPG, difosfatidilglicerol; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; SGL, esfingoglicolípido; PGL, fosfoglicolípido; PL, fosfolípido desconocido; L, lípido polar desconocido; PDE, fosfatidildimetiletanolamida; PME, fosfatidilmonometiletanolamina. Datos de este estudio con excepción de: ^aHiraishi y col., 1985; ^bYurkov y col., 1997; ^cXiao y col., 2015.

Los análisis quimiotaconómicos se realizaron a partir de cultivos de la cepa incubada a 30°C durante 48 horas en medio agar marino (MA). El perfil lipídico polar de la cepa D22-912 está compuesto por difosfatidilglicerol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, esfingoglicolípido, fosfoglicolípido, un fosfolípido desconocido y dos lípidos polares desconocidos (Figura 4.3.). Este patrón presentó diferencias en comparación con las cepas de referencia. Así por ejemplo, la cepa D22-912 no contiene fosfatidildimetiletanolamina o fosfatidilmonometiletanolamina a diferencia de *B. ursincola* DSM 9006^T (Tabla 4.3), pero presenta fosfoglicolípido similares a *B. natatoria* CECT 4273^T aunque en diferente concentración. El patrón de poliaminas de la cepa D22-912 consistió en espermidina como la poliamina principal.

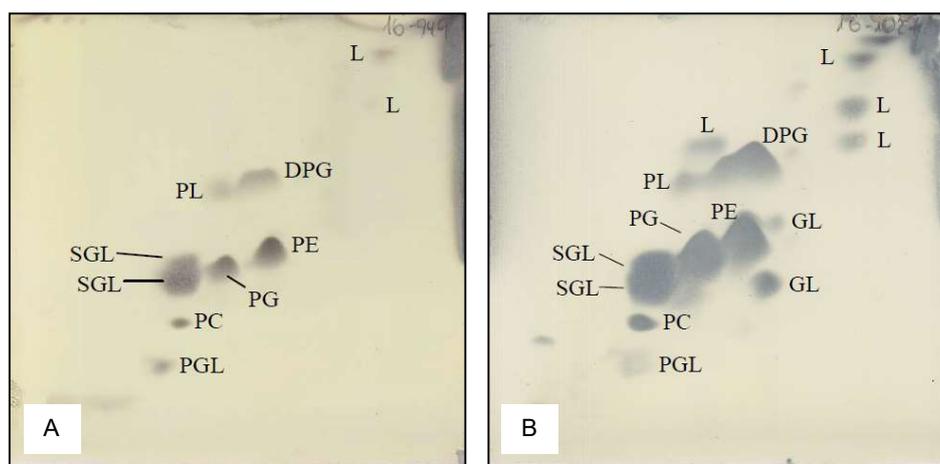


Figura 4.3. Perfil de lípidos polares de la cepa D22-912 (A) y *B. natatoria* CECT 4273^T (B). DPG, difosfatidilglicerol; GL, glicolípido desconocido; L, lípido polar desconocido; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; PGL, fosfoglicolípido; PL, fosfolípido desconocido; SGL, esfingoglicolípido.

Los principales ácidos grasos fueron $C_{18:1} \omega 7c / C_{18:1} \omega 6c$ (55,3%), $C_{16:1} \omega 7c / C_{16:1} \omega 6c$ (13,9%), $C_{16:0}$ (9,4%) y $C_{17:1} \omega 6c$ (6,8%) (Tabla 4.4). El perfil de ácidos grasos de la cepa D22-912 fue muy similar al perfil descrito para *B. ursincola* DSM 9006^T, mientras que mostró diferencias en comparación con *B. natatoria* CECT 4273^T como se muestra en la Tabla 4.5. La quinona isoprenoide predominante fue la ubiquinona Q-10.

Tabla 4.4. Perfil de ácidos grasos de la cepa D22-912 y las cepas tipo de especies del género *Blastomonas*.

Ácido graso	1	2	3
C _{12:0} 2-OH	–	–	–
C _{13:0} 2-OH	–	–	–
C _{16:0}	9.4	8.74	7.9
C _{17:0}	0.6	4.52	0.5
C _{18:0}	0.9	–	1.7
C _{14:0} 2-OH	1.5	2.43	1.6
C _{15:0} 2-OH	1.4	2.82	0.5
C _{16:0} 2-OH	3.7	–	0.6
C _{16:1} 2-OH	–	–	–
iso-C _{12:0} 3-OH	–	–	TR
iso-C _{16:0} 3-OH	–	–	1.2
C _{16:1} ω5c	1.1	–	1.5
C _{17:1} ω6c	6.8	35.64	9.6
C _{17:1} ω8c	1.4	4.46	1.3
C _{18:1} ω5c	1.1	0.86	1.9
C _{18:1} 2-OH	0.5	–	–
C _{18:1} ω7c 11-metil	2.4	–	–
C _{16:1} ω7c/ C _{16:1} ω6c	13.9	4.07	9.0
C _{18:1} ω7c/ C _{18:1} ω6c	55.3	36.46	60.0

1, D22-912; 2, *B. natatoria* CECT 4273^T; 3, *B. ursincola* DSM 9006^T (Xiao y col., 2015). –, No detectado; TR, traza (<0,5%). Los datos representan porcentajes de ácidos grasos totales.

Para el análisis filogenético de las secuencias se incluyeron 41 secuencias de cepas tipo de especies relacionadas. La estabilidad de los grupos se determinó realizando un análisis de remuestreo o *bootstrap* con 1000 repeticiones. Los análisis filogenéticos basados en los métodos *neighbor joining*, *maximum parsimony* y *maximum likelihood* incluyeron a la cepa D22-912 en el grupo que forma las especies del género *Blastomonas*, con topologías de árboles muy similares. La Figura 4.4 muestra el árbol que contiene los filogrupos en los que se incluye la cepa D22-912 de acuerdo con el algoritmo de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*).

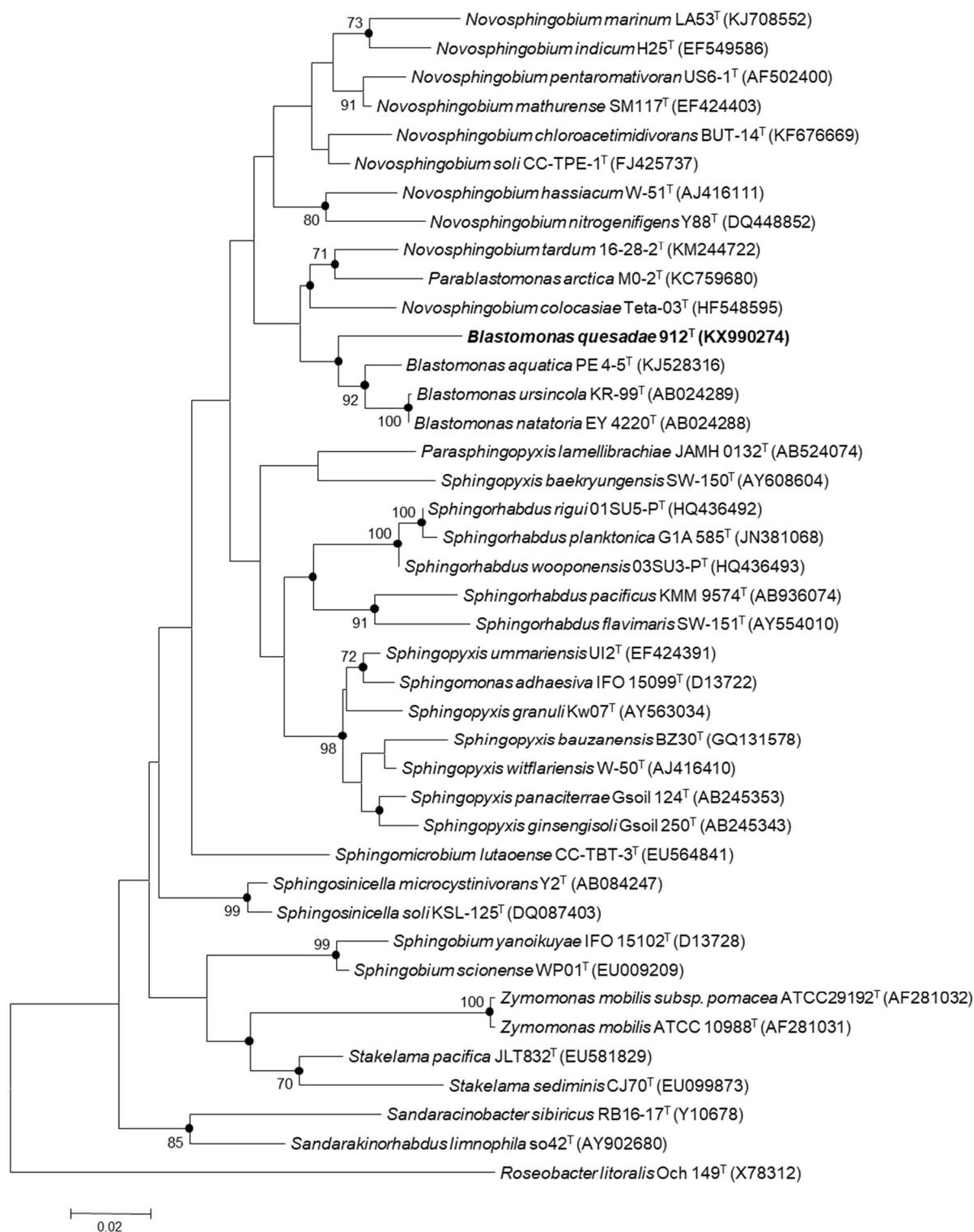


Figura 4.4. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen 16S rRNA para la cepa D22-912. Se muestran las relaciones entre la cepa D22-912, la especie tipo del género *Blastomonas* y las especies más estrechamente relacionadas de la familia *Sphingomonadaceae*. Los círculos rellenos indican nodos que también se encontraron en los árboles de *neighbor joining* y *maximum parsimony* en base a las mismas secuencias. Los números en los nodos son porcentajes de bootstrap basados en análisis de 1000 datos re-muestreados; solo se muestran valores superiores al 70%. La secuencia de *Roseobacter litoralis* Och 149^T (X78312) se usó como un grupo externo. La línea equivale a 0,02 cambios de nucleótidos por posición. El número de acceso GenBank/EMBL/DDBJ de cada secuencia se muestra entre paréntesis.

En relación a los pigmentos fotosintéticos, detectamos la presencia de bacterioclorofila α y pigmentos carotenoides por espectrofotometría a partir de un extracto celular con acetona/metanol. Además, se amplificaron por PCR los genes *puf* de bacterioclorofila α (genes del centro de reacción fotosintético *pufL* y *pufM*) obteniéndose un producto de PCR de aproximadamente 1,5 kb (Figura 4.5). Las secuencias de los genes *pufL* y *pufM* de la cepa 912^T (KY549924) mostraron 97 y 96% de similitud con las secuencias de genes *pufL* y *pufM* de *B. natatoria* EY 4220^T (AB012060) y *B. ursincola* KR-99T (AB031016), respectivamente.

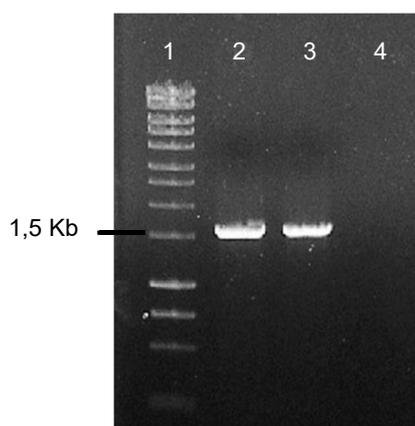


Figura 4.5. Productos de PCR de genes *pufLM* en la cepa D22-912. 1, Marcador de peso molecular HyperLadder™ 1kb, Bioline; 2, D22-912; 3, *Blastomonas natatoria* ECT 4273^T utilizada como control positivo; 4, *Roseovarius pacificus* LMG 4575^T como control negativo.

De acuerdo con las diferencias en las características fenotípicas y quimiotaxonómicas y filogenéticas, la cepa D22-912 ha sido reconocida como una nueva especie del género *Blastomonas*, con el nombre de *Blastomonas quesadae* 912^T. *Blastomonas quesadae* (que.sa´dae. N.L. fem. gen. n. quesadae de Quesada, nombrado en honor a la profesora Emilia Quesada, como un homenaje a sus contribuciones en el estudio de bacterias halófilas) (Castro y col. 2018). Su secuencia del gen del ARNr 16S fue depositada en la base de datos GenBank con el número KX990274.

4.4.2. Descripción de la cepa D15

La cepa D15 es un bacilo gram negativo de 0,7-1,2 x 2,1-3,2 μm de tamaño que se reproduce por división asimétrica (Figura 4.6). Las colonias que origina son blancas, circulares, convexas y opacas cuando se cultivan en medios MA y R2A. Es capaz de crecer en concentraciones de NaCl de 0,5 a 10% (p/v), con un crecimiento óptimo al 3%. Crece dentro de un rango de temperatura de 5 a 30°C a valores de pH entre 6 y 9, siendo 28°C y pH 7 los valores óptimos. Produce catalasa y oxidasa.

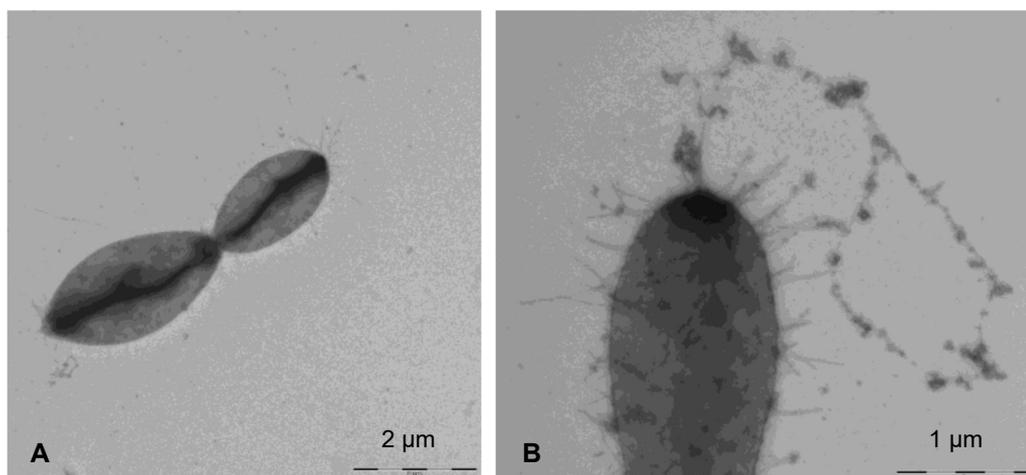


Figura 4.6. Micrografías electrónicas a partir de una tinción negativa de las células de la cepa D15. A, división asimétrica; B, flagelos peritricos. Las células se cultivaron en caldo marino a 30°C durante 24 horas con agitación a 150 rpm y se tiñeron con acetato de uranilo al 1% p/v.

Los estudios filogenéticos basados en la secuencia del gen del ARNr 16S mostraron que las especies más relacionadas y con mayor porcentaje de identidad fueron *Roseovarius tolerans* EL-172^T (96,1%) y *Roseovarius azorensis* SSW084^T (95,3%). El contenido de G+C fue 63 mol% un valor similar al de los miembros del género *Roseovarius*. Las pruebas bioquímicas, fermentación de azúcares y pruebas enzimáticas se compararon con las de las cepas *R. azorensis* DSM 100674^T y *R. tolerans* EL-172^T (Tabla 4.5).

La cepa D15 comparte características con las cepas *R. azorensis* DSM 100674^T y con *R. tolerans* EL-172^T. Las tres cepas son bacilos gram negativos. Todas son positivas para la catalasa, oxidasa y leucina arilamidasa. Todas son negativas para la producción de indol, hidrólisis de gelatina, α -quimotripsina, α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucuronidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -manosidasa, α -fucosidasa, valina arilamidasa, cistina arilamidasa, tripsina y fosfatasa alcalina. La producción de ácidos a partir de D-glucosa, D-arabinosa, D-manitol, D-galactosa, D-fructosa y D-sorbitol es negativa. La D-glucosa, maltosa, L-arabinosa y mannososa, N-acetil- β -glucosamina y gluconato, ácido adípico, ácido málico, ácido fenilacético y ácido cáprico, citrato trisódico no pudieron utilizarse como única fuente de carbono para las tres cepas.

Tabla 4.5. Características que distinguen la cepa D15 de otras cepas del género *Roseovarius*.

Características	1	2	3 ^a
Pigmentación de la colonia	blanca	no pigmentada	roja
Rangos de crecimiento			
Temperatura	5-30	15-40	8,5-33,5
pH	6,0-9,0	7,0-9,0	6,2-9,0
NaCl (%p/v)	0,5-10	0,5-7,0	1,0-8
Bacterioclorofila <i>a</i>	+	-	+
Actividad enzimática API ZYM			
Nitrato reductasa	-	+	-
Fosfatasa ácida	-	-	+
Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	-	+	-
Esterasa C4	-	+	-
Esterasa lipasa C8	-	+	-
Producción de ácidos API 50CH			
5-ketogluconato potásico	-	+	-
Lípidos polares	PC, PE, PG, AL, L	PC, PE, PG, DPG, L, AL	PC, PE, DPG, PL
Contenido de G+C (mol%)	63	61,9	62,2-63,8

1, D15; 2, *R. azorensis* DSM 100674^T; 3, *R. tolerans* EL-172^T. DPG, difosfatidil glicerol; PC, fosfatidil colina; PE, fosfatidil etanolamina; PG, fosfatidil glicerol; SGL, esfingoglicolípido; PGL, fosfoglicolípido; PL, fosfolípido desconocido; L, lípido polar desconocido; PDE, fosfatidil dimetil etanolamida; PME, fosfatidil monometil etanolamina. Datos de este estudio con excepción de: ^aLabrenz y col., 1999.

Los análisis filogenéticos basados en los métodos *neighbor joining*, *maximum parsimony* y *maximum likelihood* incluyeron a la cepa D15 en el grupo de las especies del género *Roseovarius* y mostraron topologías muy similares. La Figura 4.7 muestra el árbol que contiene los filogrupos en el que se incluye la cepa D15 de acuerdo con el algoritmo de máxima verosimilitud. Para estos análisis se incluyeron 29 secuencias de nucleótidos de especies relacionadas y la estabilidad de los grupos se determinó mediante un análisis de remuestreo con 1000 repeticiones.

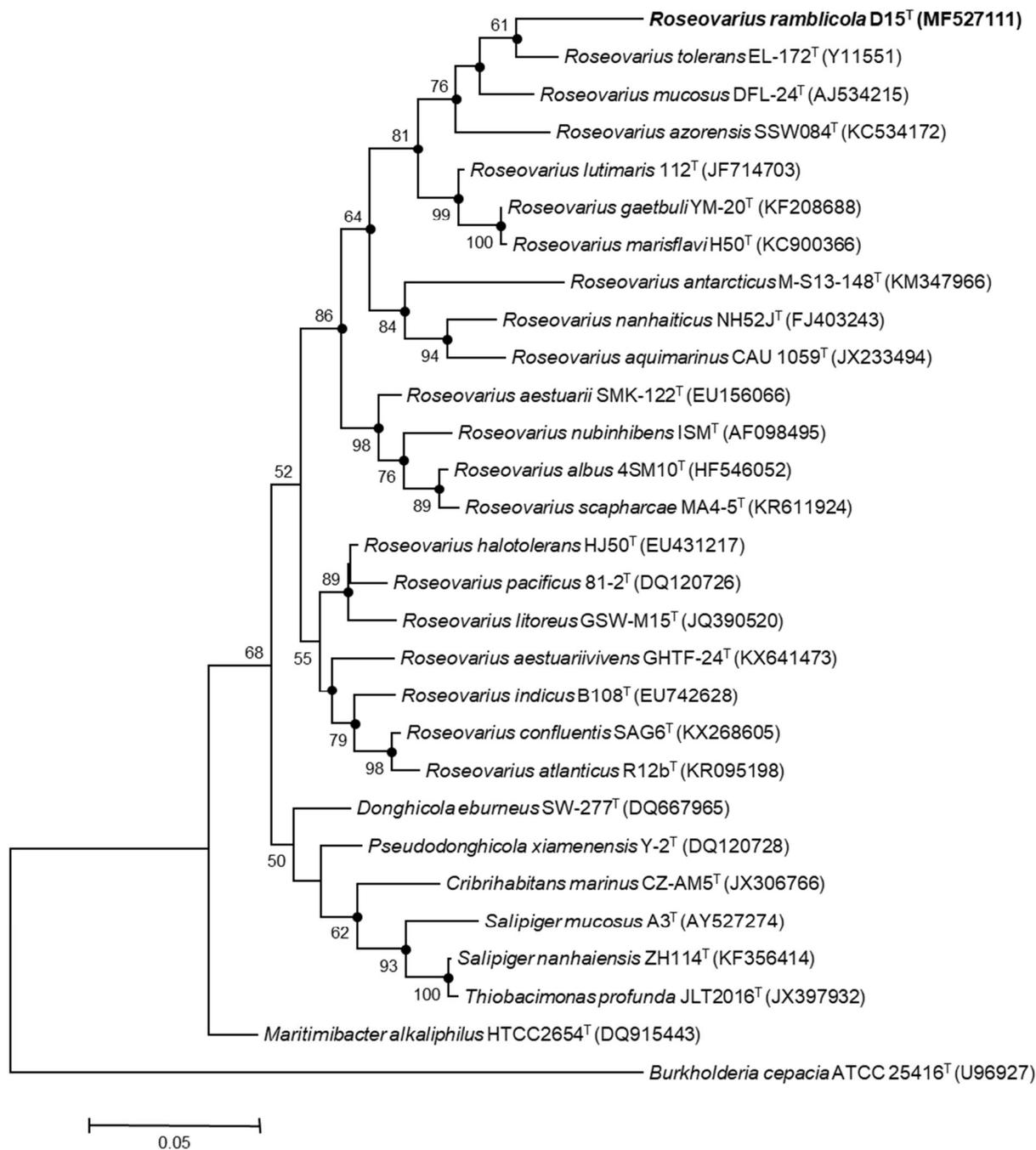


Figura 4.7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen del ARNr 16S para la cepa D15. Se muestran las relaciones entre la cepa D15, la especie tipo del género *Roseovarius* y las especies más estrechamente relacionadas de la familia *Rhodobacteraceae*. Los círculos rellenos indican nodos que también se encontraron en los árboles de *neighbor joining* y *maximum parsimony* en base a las mismas secuencias. Los números en los nodos son porcentajes de bootstrap basados en análisis de 1000 datos re-muestreados; solo se muestran valores superiores al 50%. La secuencia de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416^T (U96927) se usó como un grupo externo. La línea equivale a 0,05 cambios de nucleótidos por posición. El número de acceso GenBank/EMBL/DDBJ de cada secuencia se muestra entre paréntesis.

El perfil lipídico polar de la cepa D15 (Figura 4.8) está compuesto por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, aminolípido y tres lípidos polares no identificados.

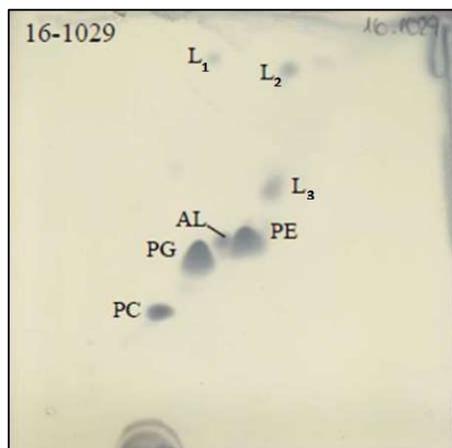


Figura 4.8. Perfil lipídico polar de la cepa D15. L, lípidos polares no identificados; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol; AL, aminolípido.

Los principales ácidos grasos (>5% del total de ácidos grasos) de la cepa D15 fueron C_{18:1} ω7c (61,5%), C_{16:0} (11,9%) y C_{12:0} (7,1%) (Tabla 4.6).

Tabla 4.6. Perfil de ácidos grasos de la cepa D15 y las cepas tipo del genero *Roseovarius*.

Ácido graso	1	2	3
C _{12:0} 2-OH	0,9	0,3	2,4
C _{12:0} 3-OH	-	6,0	-
C _{12:1} 3-OH	3,6	0,2	3,6
C _{12:0}	7,1	2,9	-
C _{16:0}	11,9	13,4	6,2
C _{18:0}	1,8	0,8	0,8
C _{16:1}	-	-	0,8
C _{18:2}	-	-	S
C _{16:0} 2-OH	2,5	2,3	-
C _{18:1} ω9c	0,7	2,4	-
C _{18:1} ω7c 11-metil	2,3	5,9	-
Ciclo-C _{19:0} ω8c	0,9	4,0	-
C _{16:1} ω7c/ C _{16:1} ω6c	0,8	0,8	-
C _{18:1} ω7c	61,5	56,9	70,2

1, D15; 2, *R. azorensis* DSM 100674^T; 3, *R. tolerans* EL-172^T. Todos los datos son de este estudio, excepto el de la cepa 3, que se tomó de Labrenz y col., 1999. Las células se cultivaron en MA a 30°C durante 48 horas. Los principales ácidos grasos (> 5% del total de ácidos grasos) están resaltados en negra. -, No detectado. Los datos representan porcentajes de ácidos grasos totales.

Para analizar la presencia de bacterioclorofila α se amplificaron por PCR los genes *puf*. El producto de PCR de aproximadamente 1,5 kb se muestra en la Figura 4.9. Las secuencias de los genes *pufL* y *pufM* de la cepa D15 (MF527111) mostraron 89 y 87% de identidad con las secuencias de genes *pufL* y *pufM* de *R. tolerans* EL-172^T (DQ9155720) y *R. mucosus* DFL-24^T (CP020474) respectivamente, y un 81% de identidad con las secuencias de genes *pufL* y *pufM* de *R. denitrificans* Och 114^T (DQ915721) y *R. halotolerans* Och 210^T (D915719).

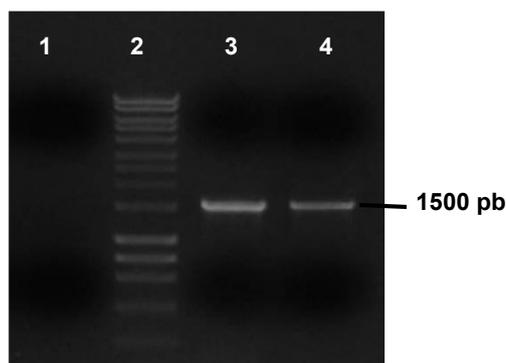


Figura 4.9. Productos de PCR de genes *pufLM* en la cepa D15. 1, *R. pacificus* LMG 24575^T; 2, marcador de peso molecular HyperLadder™ 1kb, Bioline; 3, Cepa D15^T; 4, *R. tolerans* EL-172^T.

De acuerdo con las diferencias en las características fenotípicas y quimiotaxonómicas y filogenéticas, la cepa D15 ha sido reconocida como una nueva especie del género *Roseovarius*, con el nombre de *Roseovarius ramblicola* D15^T. *Roseovarius ramblicola* (ram.bli'co.la. Español fem. n. rambla de suelo arenoso; L. suff. -cola (de L. masc. or fem. n. incola) habitante; N.L. n. ramblicola habitante de una rambla). Su secuencia del gen del ARNr 16S fue depositada en la base de datos GenBank con el número MF527111 (Castro y col., 2018).

4.4.3. Descripción de la cepa A21

La cepa A21 es un bacilo gram negativo con forma ovoide, de 0,7–1,6 μm de tamaño, que no posee flagelos (Figura 4.10). Las colonias que origina cuando se cultivan en agar marino o R2A, son de color rosa, circulares, convexas y opacas. Es capaz de crecer en concentraciones de NaCl desde el 0,5 al 15% (p/v), mostrando un crecimiento óptimo al 5%. Crece dentro de un rango de temperatura de 5 a 35°C a valores de pH entre 6 y 8, siendo 28°C y pH 7 los valores óptimos. Produce catalasa y oxidasa.

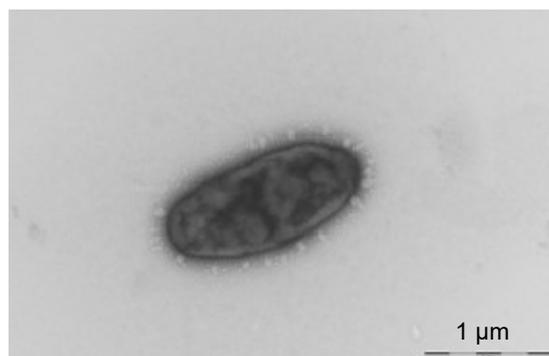


Figura 4.10. Micrografía electrónica a partir de una tinción negativa de las células de la cepa A21.

Los estudios filogenéticos basados en la secuencia del gen ARNr 16S (1472 pb) indicaron que la cepa A21 pertenece al género *Roseovarius*, siendo *R. pacificus* la especie más relacionada filogenéticamente con un 98,6% de identidad. El contenido de G+C fue de 61,3 mol% que es un valor similar al de los miembros del género *Roseovarius*. Las pruebas bioquímicas y fisiológicas de esta cepa se compararon con las de las cepas *R. pacificus* LMG 24575^T (Wang y col., 2009) y *R. tolerans* EL-172^T (Sait y col., 2006) (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Características distintivas de la cepa A21 frente a especies tipo del género *Roseovarius*. 1, cepa A21; 2, *R. pacificus* LMG 24575^T (datos de este estudio) y 3, *R. tolerans* EL-172^T.

Características	1	2	3^a
Pigmentación de la colonia	rosa	rosa	roja
Rangos de crecimiento			
Temperatura	5-35	25	8,5-33,5
pH	6,0-8,0	6,2-8,5	6,2-9,0
NaCl (%p/v)	0,5-15	2,0-12,0	1,0-8
Bacterioclorofila <i>a</i>	-	-	+
Actividad enzimática (API ZYM)			
Nitrato reductasa	+	-	-
Valina arilamidasa	+	-	-
Leucina arilamidasa	-	+	+
Fosfatasa ácida	-	-	+
Fosfatasa alcalina	-	+	-
Esterasa lipasa C8	-	+	-
Producción de ácidos (API 50CH)			
D-glucosa	+	-	-
5-ketogluconato potásico	d	d	-
Contenido de G+C (mol%)	61,3	62,3	62,2-63,8

Datos de este estudio con excepción de: ^aLabrenz y col., 1999. d, débil.

La cepa A21 comparte características con las cepas *R. pacificus* LMG 24575^T y *R. tolerans* EL-172^T. Las tres cepas son bacilos gram negativos, catalasa y oxidasa positivas. Todas son negativas para la producción de indol, hidrólisis de gelatina, esterasa, tripsina, α -quimotripsina, cistina arilamidasa, naftol-AS-BI-fosfohidrolasa, α -galactosidasa, β -galactosidasa, β -glucoronidasa, α -glucosidasa, β -glucosidasa, N-acetil- β -glucosaminidasa, α -manosidasa, α -fucosidasa. La producción de ácidos a partir de D-arabinosa, D-manitol y D-sorbitol es negativa. La maltosa, L-arabinosa y manosa, N-acetil- β -glucosamina y gluconato, ácido adípico, ácido málico, ácido fenilacético y ácido cáprico, citrato trisódico no pudieron utilizarse como única fuente de carbono por las tres cepas.

El genoma de la cepa A21 presentó un tamaño total de 3.498.676 bases ensamblados en 3 *contigs* con una cobertura de 350X. El promedio de identidad nucleotídica en el blast (ANIb) y en la hibridación *in silico* ADN-ADN entre las cepas A21 y *R. pacificus* LMG 24575^T fue de 76,8% y de 21% respectivamente. La Figura 4.11 muestra una comparación gráfica del cromosoma de la cepa A21 con los de las cepas *R. tolerans* EL-172^T, *R. pacificus* LMG 24575^T usando el programa BRIG.

El análisis filogenético se llevó a cabo usando los algoritmos *neighbour-joining*, *maximum-parsimony* y *maximum-likelihood* y las distancias evolutivas se calcularon empleando el método de Jukes-Cantor. El análisis se realizó con 36 secuencias nucleotídicas y la estabilidad de los agrupamientos fue comprobada con análisis de remuestreo (1000 repeticiones). La Figura 4.12 muestra el árbol que contiene los filogrupos en el que se incluye la cepa A21 de acuerdo con el algoritmo de máxima verosimilitud (*maximum-likelihood*).

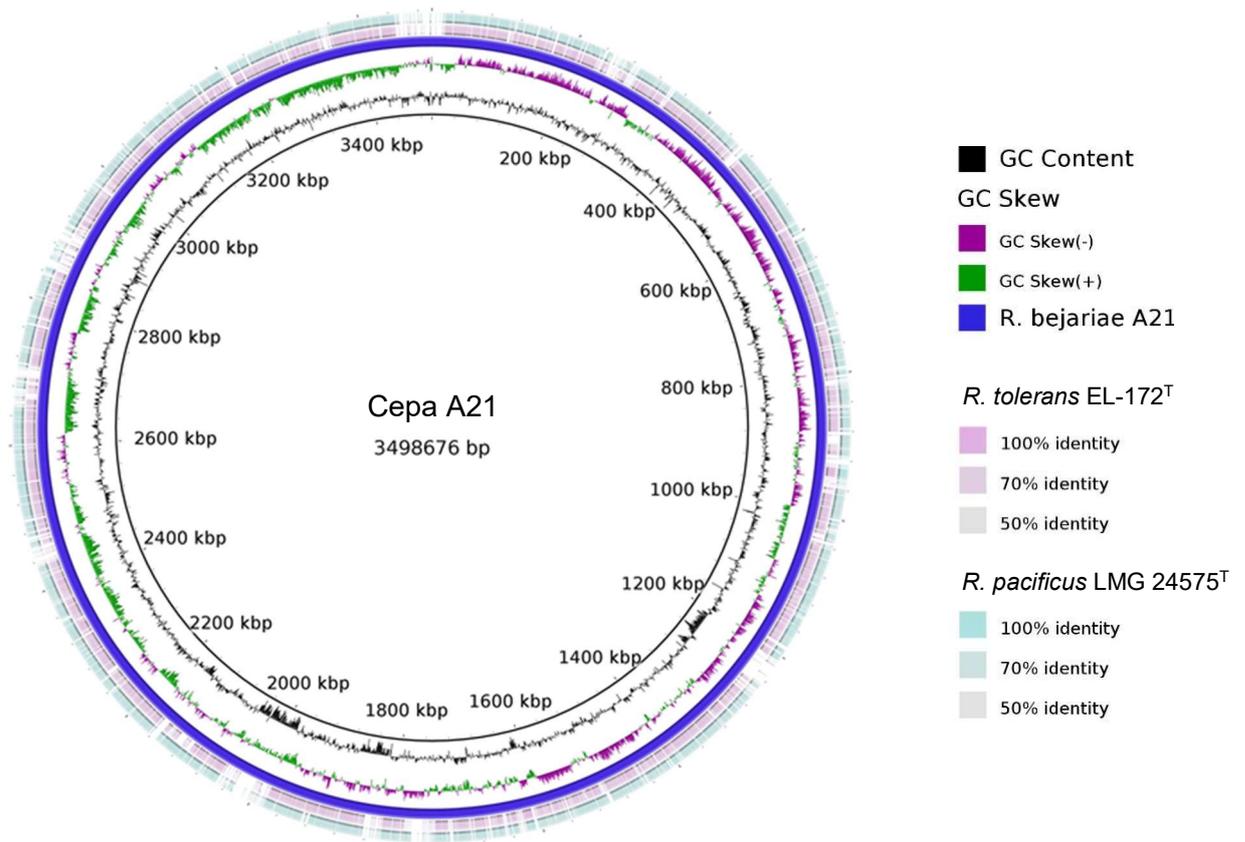


Figura 4.11. Visualización de BLAST Ring Image Generator (BRIG) de secuencias cromosómicas de las cepas A21, *R. tolerans* EL-172^T, *R. pacificus* LMG 24575^T. El anillo interno de color azul corresponde al cromosoma de la cepa A21, el anillo intermedio a EL-172^T y el anillo externo de color azul claro a LMG 24575^T. Los gradientes de color del anillo corresponden a diversos grados de identidad BLAST. También se incluye información sobre sesgo de G + C y el contenido de G + C.

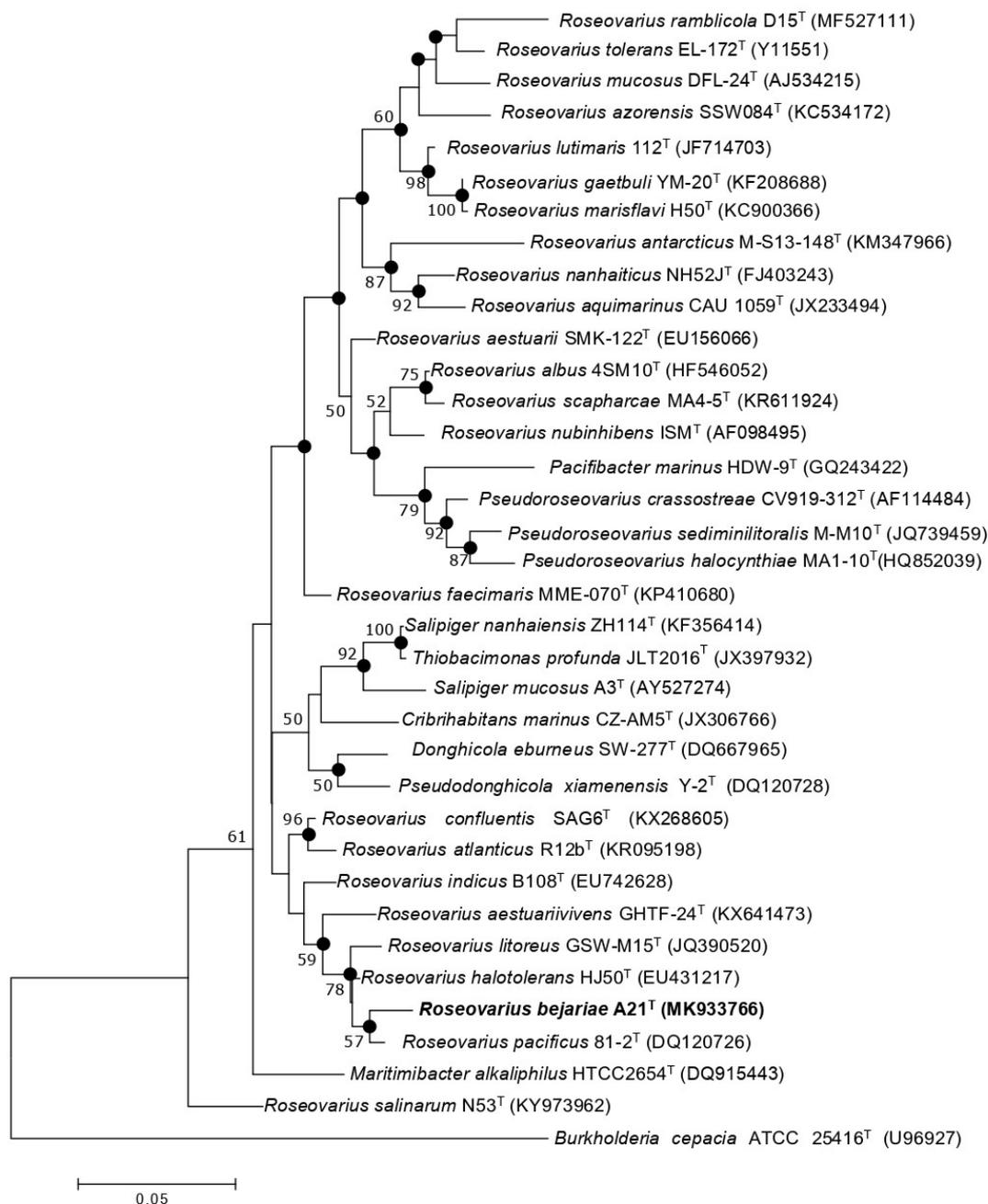


Figura 4.12. Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del gen del ARNr 16S para la cepa A21. Se muestran las relaciones entre la cepa A21, las especies tipo del género *Roseovarius* y especies estrechamente relacionadas de la familia *Rhodobacteraceae*. Los círculos rellenos indican que también se encontraron en los árboles de *neighbor joining* y *maximum parsimony* en base a las mismas secuencias. Los números en los nodos son porcentajes de bootstrap basados en análisis de 1000 datos remuestreados; solo se muestran valores iguales o superiores al 70%. La secuencia de *Burkholderia cepacia* ATCC 25416^T (U96927) se usó como grupo externo. La línea equivale a 0,05 cambios de nucleótidos por posición. El número de acceso GenBank/EMBL/DDBJ de cada secuencia se muestra entre paréntesis.

El perfil lipídico polar de la cepa A21 está compuesto por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilglicerol (Figura 4.13), similar al de la cepa *R. tolerans* EL-172^T.

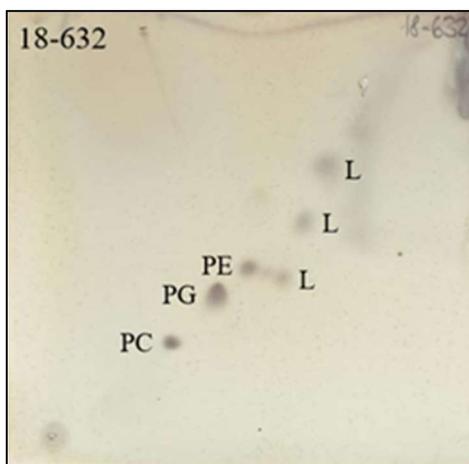


Figura 4.13. Perfil lipídico polar de la cepa A21. L, lípidos polares no identificados; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PG, fosfatidilglicerol.

Los principales ácidos grasos (>5% del total de ácidos grasos) de la cepa A21 fueron C18:1 ω 7c/18:1 ω 6c (77,5%) y C16:0 (11,9%). Como se muestra en la Tabla 4.8 el perfil de ácidos grasos de la cepa A21 fue similar al de las otras especies de *Roseovarius*.

Tabla 4.8. Perfil de ácidos grasos de la cepa A21 y las especies relacionadas del genero *Roseovarius*. 1, A21; 2, *R. azorensis* DSM 100674^T; 3, *R. tolerans* EL-172^T.

Ácido graso	1	2	3
C _{10:0}	1,1	-	-
C _{12:0}	1,6	4,2	-
C _{14:0}	0,7	-	-
C _{16:0}	11,9	6,2	6,2
C _{17:0}	0,6	-	-
C _{18:0}	1,3	3,8	0,8
C _{18:1} ω 7c/ 11-metil	3,8	-	-
C _{16:1} ω 7c/ C _{16:1} ω 6c	1,0	-	0,8
C _{18:1} ω 7c/ C _{18:1} ω 6c	77,5	73,9	70,2

Los principales ácidos grasos (> 5% del total de ácidos grasos) están resaltados en negrita.

La presencia de bacterioclorofila α se llevó a cabo mediante la amplificación por PCR de los genes *puf*. No se detectó la presencia de los genes *pufLM* en la cepa A21 al igual que ocurre con *Roseovarius pacificus* LMG 24575^T.

De acuerdo con las diferencias en las características fenotípicas, quimiotaxonómicas y filogenéticas, se propone a la cepa A21 como una nueva especie del género *Roseovarius*, con el nombre de *Roseovarius bejariae* A21. *Roseovarius bejariae* (be.ja'ri.ae N.L. fem. gen. n. bejariae de Béjar, nombrado en honor a la profesora Victoria Béjar, como homenaje a sus contribuciones en el estudio de bacterias halófilas). La secuencia nucleotídica del gen ARNr 16S y el genoma de la cepa A21 se depositaron en la base de datos del GenBank y en la base de datos de genoma del NCBI respectivamente, con los números de acceso MK933766 y SZWE00000000.

La Tabla 4.9 muestra un resumen de las nuevas descripciones aisladas de suelos de Rambla Salada mediante la técnica de dilución a extinción. Se indican los números de acceso a las bases de datos y los depósitos en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) y la Colección de Cultivos Bacterianos de Bélgica (BCCM/LMG).

Tabla 4.9. Nuevos taxa descritos, obtenidos por dilución a extinción a partir de suelo de Rambla Salada.

Aislado	Especie	Colecciones	GenBank	Publicación
D22-912	<i>Blastomonas quesadae</i> 912 ^T	CECT 9186 ^T LMG 29921 ^T	KX990274	Castro y col., 2017
D15	<i>Roseovarius ramblicola</i> D15 ^T	CECT 9424 ^T LMG 30322 ^T	MF527111	Castro y col., 2018
A21	<i>Roseovarius bejariae</i> A21 ^T	CECT 9817 ^T LMG 31311 ^T	MK933766	Castro y col., 2019

4.5. Actividad antifúngica *in vitro*

Se evaluó la actividad antifúngica de los 354 aislados de Rambla Salada así como de un grupo de 72 cepas pertenecientes a la colección de microorganismos de la empresa Xtrem Biotech S.L. provenientes de otros ambientes hipersalinos. La determinación de la actividad antifúngica se llevó a cabo en medio sólido y en medio líquido enfrentándolas a 9 agentes fitopatógenos.

Utilizando el método en medio sólido se realizó una primera selección o cribado de cepas con actividad antifúngica. Para ello, en cada placa sembrada con el hongo y con la cepa a evaluar, se midió el radio máximo y el radio mínimo del micelio y se calculó el porcentaje de reducción del micelio comparando con las placas control (Figura 4.14). El crecimiento de todos los hongos fitopatógenos evaluados se redujo en presencia de al menos un aislado bacteriano. Los porcentajes de reducción del crecimiento oscilaron desde el 15% hasta el 83%. La Tabla 4.10 muestra el número de cepas con actividad antifúngica sobre los distintos hongos (método en medio sólido) y el rango de los porcentajes de inhibición del micelio.

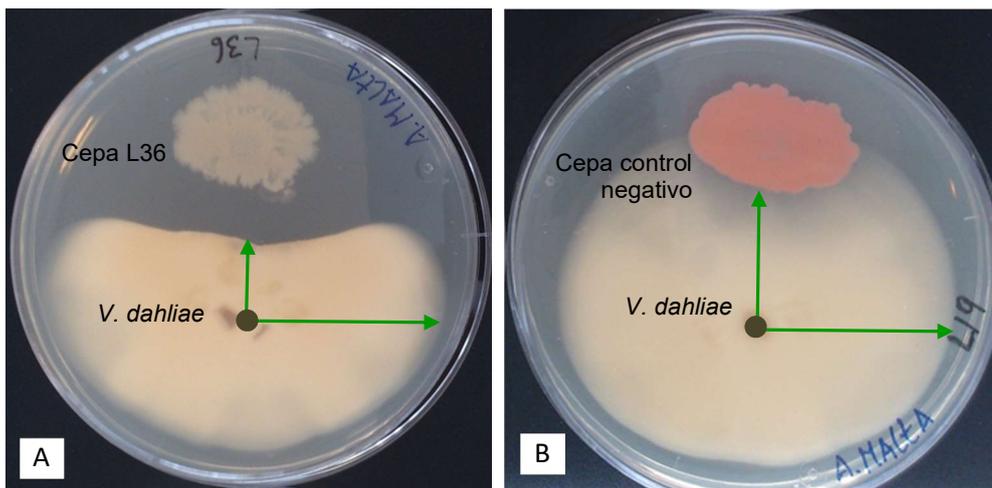


Figura 4.14. Actividad antifúngica en medio sólido frente a *V. dahliae*. A, cepa con actividad; B, cepa sin actividad.

Tabla 4.10. Número de cepas con actividad antifúngica en medio sólido y líquido y porcentaje de reducción del crecimiento del micelio en medio sólido

	Medio sólido		Medio líquido
	Total cepas con actividad	% reducción micelio	Total cepas con actividad
<i>Magnaporthe oryzae</i>	18	22 - 82	18
<i>Fusarium oxysporum</i>	16	17 - 77	4
<i>Pythium ultimum</i>	23	16 - 35	23
<i>Alternaria alternata</i>	20	15 - 71	12
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	17	17 - 50	17
<i>Verticillium dahliae</i>	29	23 - 83	19
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	16	70 - 80	16
<i>Botrytis cinerea</i>	30	17 - 82	18
<i>Phytophthora cinnamomi</i>	14	15 - 30	14

A continuación, se evaluó la actividad antifúngica de los sobrenadantes de las cepas bacterianas. El tiempo de incubación varió dependiendo del crecimiento del hongo, desde 7 días para *P. ultimum* hasta 30 días para *V. dahliae*. Tras la incubación, la turbidez del medio fue el criterio utilizado para evaluar la inhibición de los fitopatógenos (Figura 4.15).

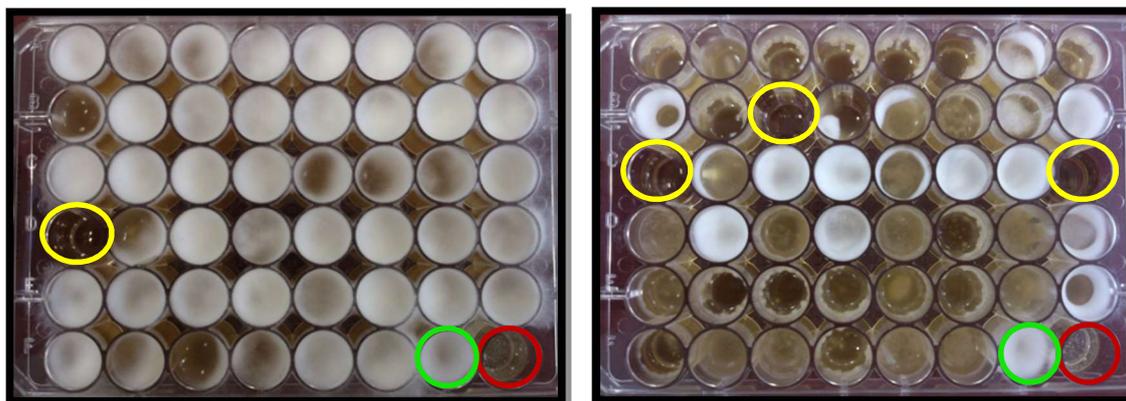


Figura 4.15. Actividad de los sobrenadantes bacterianos frente a *V. dahliae* patotipo D. Círculos amarillos: cepa con actividad antifúngica; círculos verdes: cepa sin actividad antifúngica y control negativo; círculo rojo: cicloheximida (control positivo).

El crecimiento de los fitopatógenos fue inhibido por al menos 4 sobrenadantes bacterianos en el caso de *F. oxysporum*. El hongo más susceptible a los sobrenadantes evaluados fue *P. ultimum* con 23 sobrenadantes activos. Del total de 426 sobrenadantes evaluados, 64 mostraron actividad frente al menos un fitopatógeno. Sin embargo, el número de aislados con actividad antifúngica fue mayor en el grupo de cepas de la colección de Xtrem Biotech, el 47,2% mostró actividad antifúngica frente al menos un fitopatógeno, de los cuales, el 76% (26 aislados) inhibió a más de 2 fitopatógenos. En relación a los aislados de Rambla Salada, sólo el 8,5% (30 cepas) mostró actividad frente al menos un hongo fitopatógeno, de los cuales el 60% pertenecen al filo *Firmicutes*.

Tras el análisis de los resultados, se seleccionaron 6 cepas: XT1, XT5, XT6, XT7, XT8 y XT212 (Tabla 4.11), cinco procedentes de la colección de Xtrem Biotech S.L. y una procedente de Rambla Salada, que mostraron buena actividad antifúngica frente a los hongos seleccionados y especialmente frente a *V. dahliae* (Tabla 4.12) tanto en los ensayos en medio sólido como en medio líquido.

Tabla 4.11. Cepas seleccionadas por su actividad antifúngica

Cepas	Identificación ARNr 16S	% identidad	Procedencia
XT1	<i>Bacillus velezensis</i>	100	Colección de Xtrem Biotech S.L
XT5	<i>Bacillus subtilis subsp. inaquosorum</i>	99	
XT6	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	100	
XT7	<i>Bacillus mojavensis</i>	100	
XT8	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	100	
XT212	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	Rambla Salada

Tabla 4.12. Porcentajes de inhibición de fitopatógenos de las cepas seleccionadas

	% inhibición					
	<i>V. dahliae</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>A. alternata</i>	<i>P. cinnamomi</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. ultimum</i>
XT1	49	30	30	50	42	28
XT5	47	30	30	25	28	32
XT6	35	25	20	20	0	0
XT7	46	15	30	50	10	15
XT8	46	17	30	40	0	0
XT212	44	25	0	0	0	15

Para este grupo de 6 cepas se determinó la actividad antifúngica en medio sólido y se calculó el porcentaje de inhibición del fitopatógeno *V. dahliae* utilizando para ello el programa de procesamiento de imagen digital ImageJ 1.52a mediante la lectura de las áreas de crecimiento (Figura 4.16). Los porcentajes de inhibición de *V. dahliae* fueron 45,7%, 42,4%, 31,3%, 43,4%, 45,1% y 43,2% para las cepas XT1, XT5, XT6, XT7, XT8 y XT212, respectivamente.

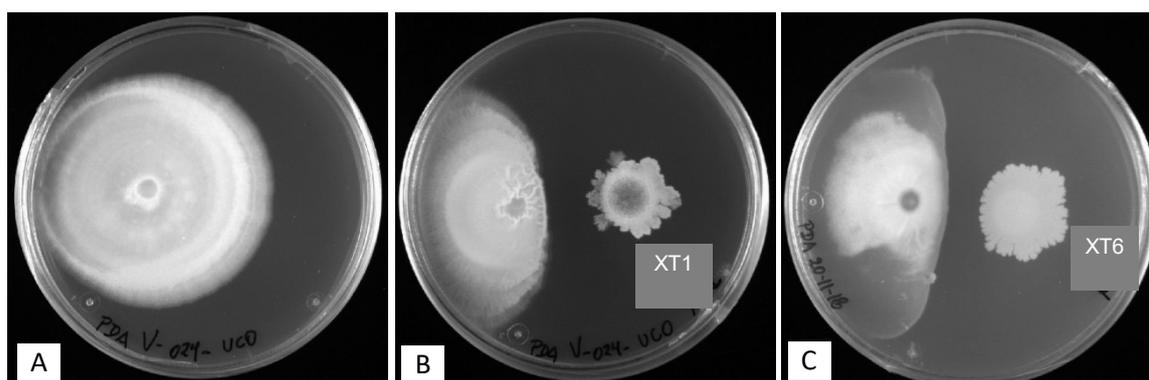


Figura 4.16. Inhibición del crecimiento de *V. dahliae* en PDA. A, *V. dahliae*; B, *V. dahliae* (lado izquierdo) y cepa XT1 (lado derecho); C, *V. dahliae* (lado izquierdo) y cepa XT6 (lado derecho).

4.6. Actividad antifúngica de los compuestos volátiles

La inhibición del hongo por compuestos volátiles se evaluó sobre las cepas XT1, XT6 y XT212. Los porcentajes de inhibición fueron 31,5%, 37,8% y 42,5%, respectivamente (Figura 4.17).

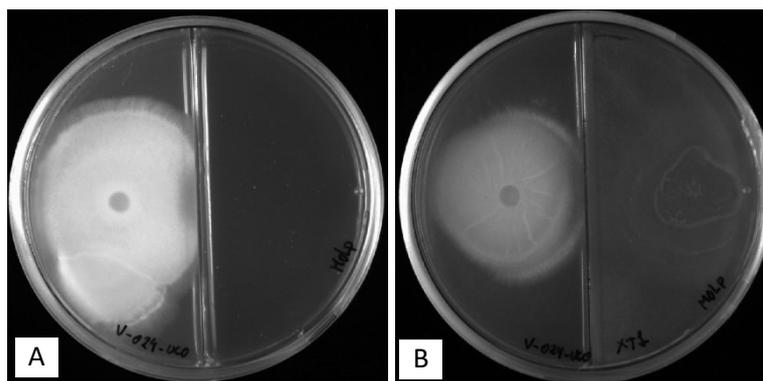


Figura 4.17. Inhibición del crecimiento de *V. dahliae* por compuestos volátiles de la cepa XT1. A, *V. dahliae* (izquierda); B, *V. dahliae* (izquierda) y cepa XT1 (derecha).

4.7. Actividad promotora del crecimiento de plantas

A continuación se investigó la producción de enzimas y metabolitos relacionados con la actividad promotora del crecimiento de plantas de las 6 cepas mediante 5 pruebas, la producción de ACC desaminasa, la fijación de nitrógeno atmosférico a través del crecimiento en medio Burk, la producción de fosfatasa ácida y alcalina y la producción de sideróforos (Tabla 4.13).

Tabla 4.13. Resultado de las pruebas para determinar la capacidad de las cepas seleccionadas para promover el crecimiento vegetal

Cepas	ACC desaminasa	Crecimiento en Burk	Fosfatasa ácida	Fosfatasa alcalina	Producción sideróforos
XT1	+	+	+	-	+
XT5	+	+	+	-	+
XT6	+	+	+	-	+
XT7	+	+	+	+	+
XT8	+	+	+	+	+
XT212	+	+	+	+	+

4.8. Crecimiento de las cepas bacterianas seleccionadas en distintos medios de cultivo

El crecimiento de las cepas XT1, XT5, XT6, XT7, XT8 y XT212 se evaluó en medio SG, Molp y M2. Como se observa en la Tabla 4.14, el crecimiento de las 6 cepas bacterianas en los tres medios evaluados alcanzó valores comprendidos entre $9,8 \times 10^7$ y $7,8 \times 10^8$ UFC/mL tras 24 horas de incubación.

Tabla 4.14. Crecimiento de las cepas seleccionadas en medio SG, Molp y M2

Cepas	UFC/ml		
	SG	Molp	M2
XT1	$3,3 \times 10^8$	$7,8 \times 10^8$	$5,5 \times 10^8$
XT5	$2,7 \times 10^8$	$3,0 \times 10^8$	$1,7 \times 10^8$
XT6	$3,5 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	$1,5 \times 10^8$
XT7	$1,2 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
XT8	$9,8 \times 10^7$	$1,3 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$
XT212	$3,8 \times 10^8$	$4,3 \times 10^8$	$3,5 \times 10^8$

Los resultados representan el promedio de tres recuentos a las 24 horas de incubación. El recuento inicial de las cepas bacterianas fue $4,7 \times 10^4$ UFC/ml.

4.9. Estudios de compatibilidad entre las cepas

Para conocer la compatibilidad entre las cepas se emplearon dos métodos. En el primero se colocaron los cultivos de las cepas en pocillos realizados en placas de agar nutritivo sembradas previamente con una de las cepas. Tras la incubación, la inhibición del crecimiento alrededor de los pocillos (halo) fue utilizada como indicador de antibiosis e incompatibilidad entre las cepas. Con esta metodología, se encontró que las cepas XT6 y XT7 inhibieron a XT1 (Figura 4.18A) y las cepas XT1 y XT6 inhibieron a XT5 (Figura 4.18B). El resto de las cepas no mostraron efecto antagónico entre ellas.

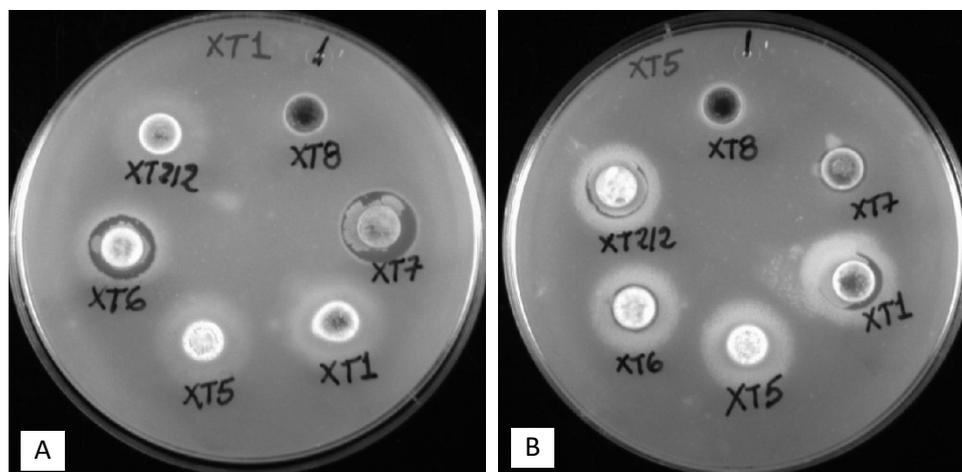


Figura 4.18. Halos de inhibición alrededor de los cultivos de las cepas.

En el segundo método, se utilizaron los sobrenadantes de las cepas para sustituir el agua de preparación de placas de agar nutritivo. Una vez solidificadas las placas, se sembraron suspensiones estandarizadas de las cepas y se realizaron recuentos. Como control, se sembraron las suspensiones en placas de agar nutritivo sin modificar. Cuando se evaluaron los sobrenadantes a la mitad de su concentración no se encontraron efectos antagónicos entre las cepas, sin embargo, con los sobrenadantes sin diluir, el crecimiento de algunas cepas estuvo afectado por los sobrenadantes de otras. La Tabla 4.15 muestra los recuentos de las cepas obtenidos tras 48 horas de incubación. El sobrenadante de la cepa

XT5 inhibió significativamente el crecimiento de la cepa XT6, el sobrenadante de la cepa XT7 a las cepas XT1 y XT8 y el sobrenadante de XT8 a la cepa XT1.

Tabla 4.15. Crecimiento de las cepas en presencia de sobrenadantes

	UFC/ml						
	Control	Sobrenadantes					
	XT1	XT5	XT6	XT7	XT8	XT212	
XT1	3,54 x 10 ⁸	3,16 x 10 ⁸	3,60 x 10 ⁸	3,50 x 10 ⁸	1,41 x 10 ⁸ ^a	2,39 x 10 ⁸ ^b	3,50 x 10 ⁸
XT5	3,60 x 10 ⁸	3,61 x 10 ⁸	3,50 x 10 ⁸	3,48 x 10 ⁸	3,55 x 10 ⁸	3,60 x 10 ⁸	3,58 x 10 ⁸
XT6	3,98 x 10 ⁸	3,78 x 10 ⁸	2,57 x 10 ⁸ ^c	3,80 x 10 ⁸	3,80 x 10 ⁸	3,75 x 10 ⁸	3,95 x 10 ⁸
XT7	1,90 x 10 ⁸	1,90 x 10 ⁸	1,85 x 10 ⁸	1,95 x 10 ⁸	1,95 x 10 ⁸	2,00 x 10 ⁸	2,00 x 10 ⁸
XT8	3,55 x 10 ⁸	3,30 x 10 ⁸	3,60 x 10 ⁸	3,10 x 10 ⁸	2,23 x 10 ⁸ ^d	3,40 x 10 ⁸	3,40 x 10 ⁸
XT212	2,30 x 10 ⁸	2,20 x 10 ⁸	2,40 x 10 ⁸	2,30 x 10 ⁸	2,25 x 10 ⁸	2,40 x 10 ⁸	2,20 x 10 ⁸

Los resultados representan el promedio de tres recuentos a las 24 horas de incubación. Diferencias significativas de los recuentos en presencia de los sobrenadantes al compararlos con el control; a, P < 0,01; b, P = 0,05; c, P < 0,04; d, P < 0,04 (Prueba *t* student).

4.10. Actividad antifúngica de las cepas en plantas de olivos infectadas con *V. dahliae*

4.10.1. Actividad preventiva en invernadero, Granada

Se evaluó el efecto de las cepas XT1, XT5, XT6, XT7, XT8 y XT212 diluidas al 2% en agua en 70 plántones de olivo de 6 meses de edad que fueron posteriormente infectados con *V. dahliae*. El ensayo se mantuvo 90 días bajo condiciones controladas de temperatura y humedad en un invernadero. Para ello, se dispusieron 7 grupos con 10 plántones en cada uno, 6 grupos para los tratamientos bacterianos y un grupo control, cuyos olivos se infectaron con el patógeno pero no recibieron tratamiento. La Tabla 4.16 muestra la dilución bacteriana (% v/v) y la dosis de las cepas (UFC/g sustrato). La dosis de las cepas aplicada en cada tratamiento estuvo comprendida entre 10⁴ y 10⁶ UFC/g de suelo.

Tabla 4.16. Dosis UFC/ sustrato en cada tratamiento en invernadero Granada

Tratamientos	Dilución en agua % v/v	UFC/g sustrato
1 XT1	2	1,4x10 ⁶
2 XT5	2	6,0x10 ⁴
3 XT6	2	1,6x10 ⁶
4 XT7	2	4,0x10 ⁵
5 XT8	2	7,0x10 ⁵
6 XT212	2	1,1x10 ⁶
7 Control +	-	-

A los 30 días de la inoculación se procedió a realizar el primer muestreo para comprobar el progreso de la enfermedad y la respuesta temprana de los distintos tratamientos. En este momento del ensayo, no se observaron daños de infección en los árboles, pero pudimos evaluar la respuesta de la planta mediante la determinación del contenido en malondialdehído (MDA), compuestos fenólicos totales y la actividad polifenol oxidasa (PPO) en las hojas.

La Figura 4.19 muestra el contenido de malondialdehído de las hojas de plantas infectadas con *V. dahliae* tras el tratamiento con las cepas. El grupo de plantas tratadas con la cepa XT1, mostró la mayor concentración de MDA, con valores superiores a los del grupo control. Los grupos tratados con las cepas XT5, XT6, XT7 y XT212 mostraron concentraciones significativamente menores a las encontradas en el grupo control.

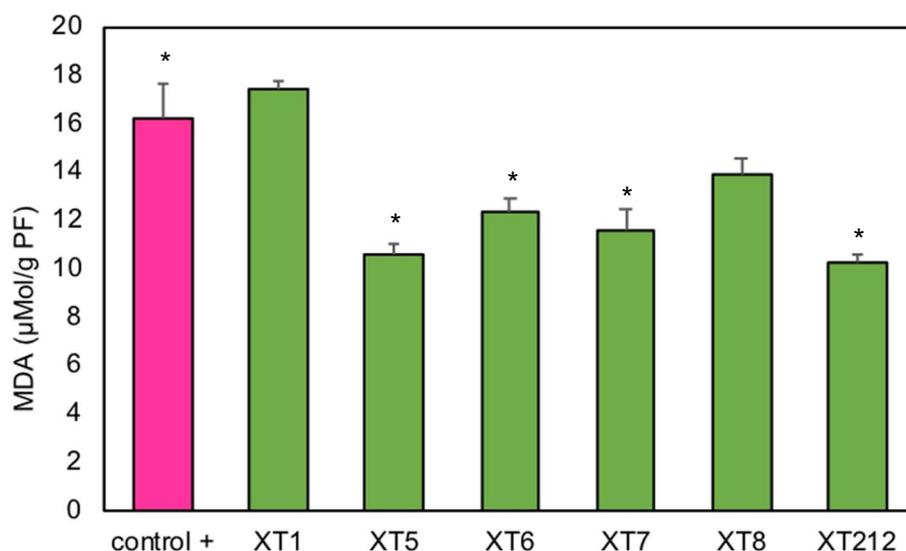


Figura 4.19. Contenido de MDA en las plantas de olivo a los 30 días. Control +, plantas infectadas con *V. dahliae*, sin tratamiento. Los resultados representan el promedio y la desviación estándar; *, diferencias significativas entre los porcentajes de severidad de los tratamientos comparados con el control ($P < 0,05$).

En lo que respecta a los compuestos fenólicos totales, la Figura 4.20 muestra el contenido en las hojas. El grupo control y el grupo tratado con la cepa XT1 mostraron las más altas concentraciones, mientras que, el resto de cepas mostraron niveles fenólicos significativamente más bajos que el control.

Por otra parte, la actividad polifenol oxidasa PPO (Figura 4.21) se incrementó significativamente en todas las plantas infectadas con el hongo y tratadas con las cepas bacterianas en comparación con el control que también estaba infectado con el hongo pero que no recibió tratamiento. La mayor actividad se encontró en el grupo de plantas tratadas con la cepa XT1.

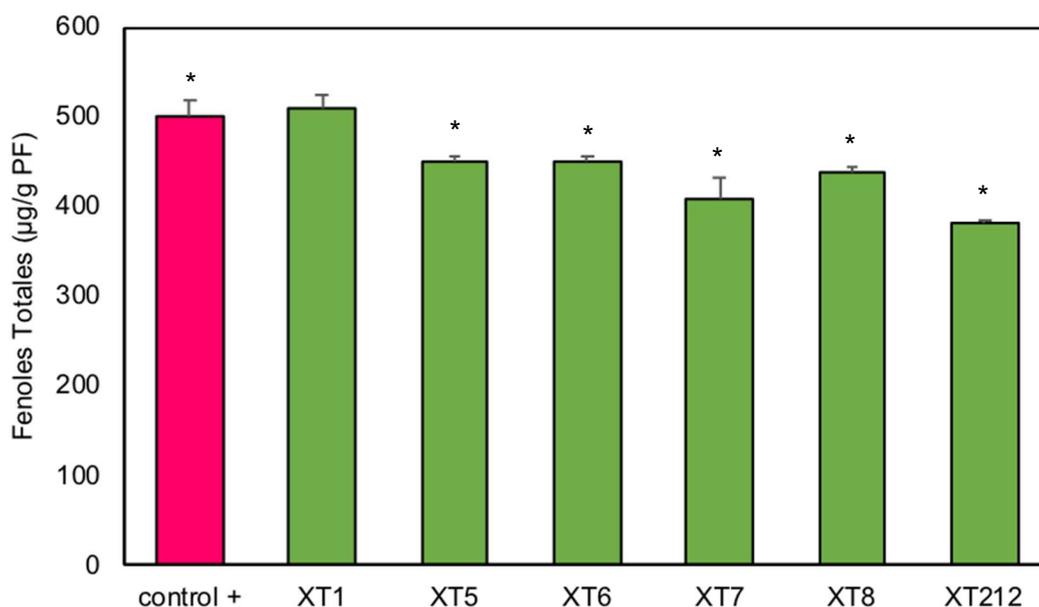


Figura 4.20. Contenido de fenoles totales en las plantas de olivo a los 30 días. Control +, plantas infectadas con *V. dahliae*, sin tratamiento. Los resultados representan el promedio y la desviación estándar. *, diferencias significativas entre los porcentajes de severidad de los tratamientos comparados con el control ($P < 0,05$).

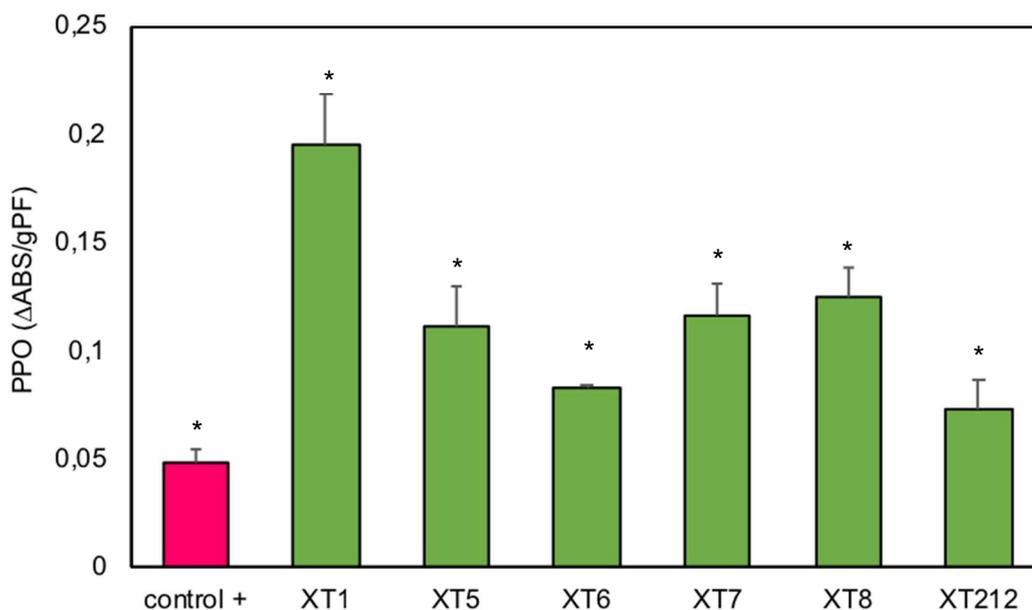


Figura 4.21. Actividad polifenol oxidasa (PPO) en las hojas de las plantas de olivo a los 30 días. Control +, plantas infectadas con *V. dahliae*, sin tratamiento. Los resultados representan el promedio y la desviación estándar. *, diferencias significativas entre los porcentajes de severidad de los tratamientos comparados con el control ($P < 0,05$).

La detección de *V. dahliae* mediante PCR en las hojas fue realizada a los 30 y 90 días tras la infección (Figura 4.22). A los 30 días se detectó la presencia del hongo solo en las hojas de las plantas de olivo que habían sido tratadas con la cepa XT7. A los 90 días, se detectó la presencia del hongo en todas las plantas de olivo tratadas.

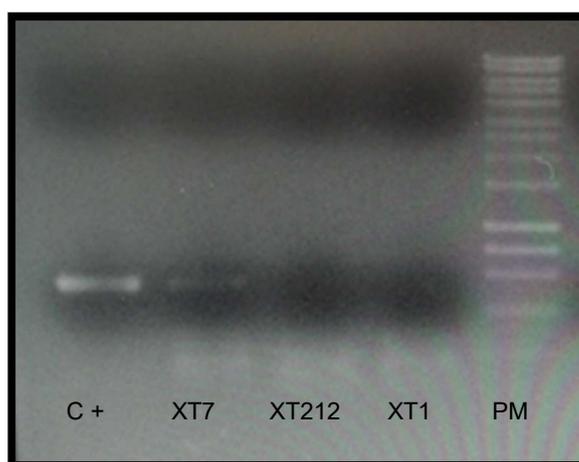


Figura 4.22. Identificación de *V. dahliae* en las hojas de olivos a los 30 días.

Al finalizar la experiencia a los 90 días, se determinó el porcentaje de incidencia, la severidad y el índice de daño (Tabla 4.17). La incidencia se determinó calculando el porcentaje de plantas que mostraron síntomas de infección por *V. dahliae*: clorosis,

marchitez, necrosis y defoliación en cada grupo. El 100% de las plantas del control positivo y las tratadas con XT7 presentaron síntomas de infección. El menor porcentaje de incidencia se encontró en el grupo tratado con la cepa XT1 (40%). La determinación de la severidad se calculó según la escala del 0 al 4 de López Escudero y col., 2004. El tratamiento con la cepa XT7 mostró la severidad más alta, y el tratamiento con XT1 la severidad más baja, con diferencias significativas al compararlo con el grupo control ($P < 0,05$). De igual forma, los resultados encontrados en el índice de daño muestran una reducción significativa ($P < 0,05$) en todos los grupos tratados al compararlos con el grupo control. La cepa XT1 mostró el índice de daño más bajo y el grupo tratado con la cepa XT7 el índice de daño más alto.

Tabla 4.17. Incidencia, severidad e índice de daño a los 90 días de la infección con *V. dahliae*.

Tratamientos	% incidencia	Severidad	% índice de daño
1 XT1	40	0,8 ± 0,02 e	21,5 ± 0,98 e
2 XT5	80	3,0 ± 0,09 c	65,9 ± 4,58 c
3 XT6	80	2,2 ± 0,17 d	52,0 ± 1,26 d
4 XT7	100	3,5 ± 0,10 b	79,2 ± 5,78 b
5 XT8	70	2,0 ± 0,08 d	55,1 ± 1,08 d
6 XT212	70	2,1 ± 0,09 d	54,9 ± 1,50 d
7 Control +	100	3,9 ± 0,12 a	89,9 ± 2,36 a
LSD		0,21**	8,02*

La diferencia mínima significativa irrestricta (LSD) indica que las diferencias superiores a ese valor son estadísticamente significativas respecto al control ($P = 0,05$, Duncan's New MRT). *, $P \leq 0,05$, **, $P \leq 0,01$. Las medidas con la misma letra no presentan diferencias significativas para cada variable

Por otra parte, se determinó el número de esporas de *V. dahliae* por gramo de suelo mediante recuentos en agar semi-selectivo Sorensen's (Tabla 4.18) en los grupos tratados con las cepas y calculamos el porcentaje de reducción frente al control. Los grupos tratados con las cepas XT5, XT6, XT212 y XT1 redujeron en 35,5%, 28,5%, 21,3% y 20,2% las esporas en el suelo, respectivamente con diferencias significativas para los grupos tratados con las cepas XT5 y XT6 ($P \leq 0,01$) y los tratados con las cepas XT212 y XT1 ($P = 0,05$).

Tabla 4.18. Número de esporas de *V. dahliae* en los sustratos de las plantas tratadas con las cepas

Tratamientos	esporas/g suelo
Control infección	47,2 ± 0,6
XT1	36,4 ± 1,7
XT5	29,4 ± 1,9*
XT6	32,6 ± 5,9*
XT7	45,8 ± 0,3
XT8	54,4 ± 1,7
XT212	37,2 ± 1,2

Los resultados representan el promedio ± desviación estándar de tres recuentos, *, $P \leq 0,01$ Método de Tukey's.

4.10.2. Actividad preventiva en invernadero, Córdoba

Evaluamos el efecto de las cepas XT1, XT5, XT6, XT7 y XT8 sobre olivos de un año del cultivar Picual infectados posteriormente con *V. dahliae*. La duración del ensayo fue de 14 semanas. La dosis aplicada (UFC/g sustrato) y la concentración se muestran en la Tabla 4.19. Además de los controles con plantones infectados sin tratar y no infectados sin tratar, se evaluó un fungicida biológico comercial denominado Bioten® que contiene *Trichoderma asperellum* ICC012 y *Trichoderma gamsii* ICC080 a la dosis de 0,25 kg/m³ (recomendada por el fabricante) para permitir comparaciones.

Tabla 4.19. Dosis UFC/ sustrato por tratamiento en invernadero Córdoba

Tratamientos	Dilución en agua	UFC/g sustrato
XT1	5% v/v	1,6 x10 ⁶
XT5	5% v/v	4 x10 ⁵
XT6	5% v/v	5 x10 ⁵
XT7	5% v/v	2 x10 ⁵
XT8	5% v/v	4,5 x10 ⁵
Bioten®	0,25% p/v	5 x10 ⁷
Control+	-	-

Los primeros síntomas de la verticilosis comenzaron a aparecer en el grupo control durante la semana 6 tras la infección. Se determinaron los porcentajes de incidencia y de severidad durante las semanas 8 y 11 (Tabla 4.20). La incidencia se determinó calculando el porcentaje de plantas que mostraron síntomas de infección por *V. dahliae*: clorosis, marchitez, necrosis y defoliación en cada grupo, y la severidad, según la escala del 0 al 4 de López Escudero y col., 2004. En la evaluación de la semana 8 todos los plantones tratados y el control mostraron signos de la infección por *V. dahliae* a excepción del grupo tratado con XT1. La incidencia del resto de plantones estuvo comprendida entre 40 y 55%, mientras que, la severidad osciló dependiendo del tratamiento, entre 11 y 25%. En la semana 11, se observaron síntomas de verticilosis en todos los tratamientos. Los valores

de incidencia (42,9%) y severidad (9,7%) en el grupo tratado con XT1, fueron significativamente más bajos que los del control y del resto de tratamientos ($P < 0,05$). Los porcentajes de severidad más altos se encontraron en los grupos tratados con XT8 y Bioten® con valores de 50,7 y 51,1%, respectivamente.

El análisis conjunto de los valores de severidad de la enfermedad tras siete evaluaciones semanales, comenzando en la semana 8 tras la infección (2 semanas después de la aparición de los síntomas) (Figura 4.23), confirmó la tendencia observada en las primeras evaluaciones. Al final del ensayo, el grupo control sin tratamiento mostró 73,8% de severidad mientras que, el grupo tratado con XT1 mostró un 25% (Figura 4.24). El resto de tratamientos se ubicó entre el 77,5 y 93,8%. El grupo tratado con el producto biológico Bioten® no mostró diferencias con respecto al control ni con el resto de tratamientos (Figura 4.25). Finalmente *V. dahliae* fue recuperado en medio PDA a partir de los tallos de las plantas infectadas sin tratamiento (control positivo).

Tabla 4.20. Efecto de los tratamientos sobre la incidencia y severidad de la verticilosis en plántones de olivo en invernadero de Córdoba.

Semana	Productos	% incidencia (1)	% severidad (2)
8	XT1	0,0 b	0,0 b
	XT5	50,0 a	13,8 a
	XT6	44,4 a	15,3 a
	XT7	40,0 a	25,0 a
	XT8	55,5 a	11,1 a
	Bioten®	40,0 a	16,3 a
	Control+	40,0 a	15,0 a
11	XT1	42,9 c	9,7 b
	XT5	100,0 a	44,8 a
	XT6	100,0 a	46,8 a
	XT7	88,9 b	48,2 a
	XT8	100,0 a	50,7 a
	Bioten®	100,0 a	51,1 a
	Control+	90,0 a	47,6 a

(1) Porcentaje de plántones de olivo afectados por verticilosis. Valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente ($P = 0,05$ test de comparación múltiple de proporciones de Zar).

(2) Área bajo la curva del progreso de la enfermedad porcentual de las evaluaciones de síntomas realizadas a intervalos de 7 días desde el inicio de los síntomas. Valores seguidos de la misma letra no difieren significativamente según el test LSD protegido de Fisher ($P = 0,05$).

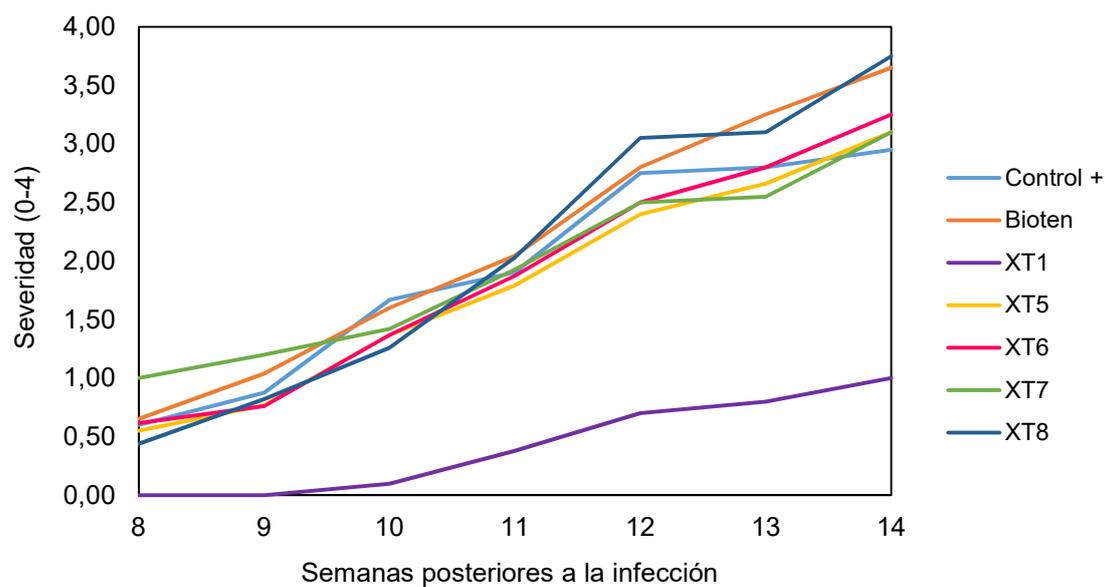


Figura 4.23. Progreso en la severidad de los síntomas por *V. dahliae*. A partir de la semana 8 hasta el final del ensayo de acuerdo a la escala de calificación de López-Escudero, 2004.



Figura 4.24. Efecto de la cepa XT1 sobre la severidad de la verticilosis. A, tratamiento con XT1; B, control sin tratar.

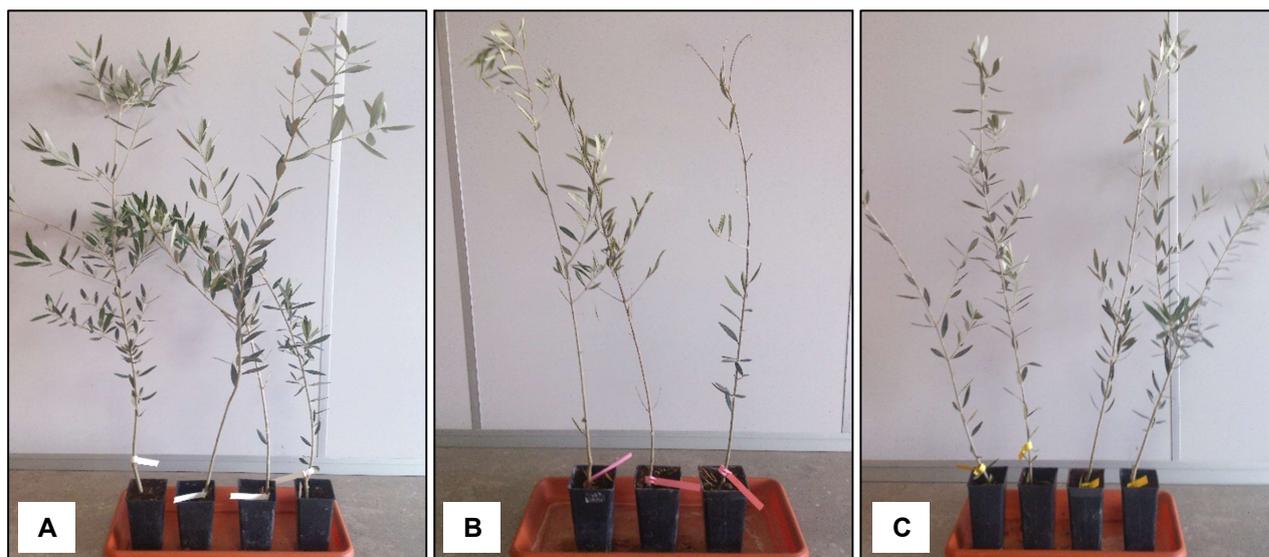


Figura 4.25. Plantones de olivo al final del ensayo. A, sin infectar con *V. dahliae*; B infectados y tratados con el producto comercial Bioten®; C, infectados y tratados con XT1.

4.10.3. Actividad preventiva en condiciones de semi-campo, Granada

Se evaluó el efecto de 4 cepas, XT1, XT5, XT6 y XT8 crecidas en dos medios de cultivos, medio SG y medio M1, sobre olivos de 1 año de edad en condiciones de semi-campo. Se incluyeron 9 tratamientos con las cepas bacterianas, los cuales fueron aplicados antes y después de la infección con *V. dahliae* patotipo D. Esta infección fue realizada mediante inmersión del sistema radicular en una suspensión de 1×10^7 conidios/ml. Como control negativo se incluyeron plantas que no fueron infectadas con el patógeno, mientras que, para el control positivo utilizamos plantas que inoculamos con el patógeno a la misma concentración y dosis de los grupos de tratamiento. La Tabla 4.21 describe las UFC/g de sustrato aplicadas en cada dosis y el número de plantas de olivo sometidas al estudio en cada tratamiento. La concentración de los inóculos estuvo entre 10^4 y 10^5 UFC/g de sustrato en la maceta, las cuales fueron aplicadas 15 y 2 días antes de la inoculación con el patógeno y, 4 y 7 días después de ésta.

Tabla 4.21. Dosis UFC/ sustrato en cada tratamiento

Tratamientos	Dilución en agua	UFC/g sustrato	Nº plantas
T1 XT1 ^a	2%	4,2x10 ⁵	5
T2 XT1 ^a	1%	2,1x10 ⁵	5
T3 XT1 ^b	2%	6,8x10 ⁴	5
T4 XT1 ^b	1%	3,4x10 ⁴	5
T5 XT1 ^a + XT5 ^a	1% c/u	4,2x10 ⁵ + 4,1x10 ⁴	5
T6 XT5 ^a	2%	8,2x10 ⁴	5
T7 XT1 ^a + XT6 ^a	1% c/u	2,1x10 ⁵ + 1,2x10 ⁵	5
T8 XT8 ^a	2%	5x10 ⁵	3
T9 XT6 ^a	2%	2,4x10 ⁵	3
C- Control sin infección	agua	NA	5
C+ Control infección	agua	NA	5

^a, medio SG; ^b, medio M1; NA, No Aplica.

La Figura 4.26 muestra los porcentajes de severidad de los síntomas presentados por las plantas de olivo en cada tratamiento después de 5 meses del inicio del ensayo. Los síntomas considerados para calcular este porcentaje fueron: clorosis, defoliación y marchitez de las hojas. Para ello, se contaron la totalidad de las hojas de cada planta (sanas, cloróticas, marchitas, caídas) y se calculó el porcentaje de hojas afectadas respecto al total para cada planta y se determinó el promedio para cada tratamiento. Los controles fueron procesados de igual forma y con ellos, se estableció un rango cuyo límite inferior (línea verde) se correspondía con el control negativo o control sin infección y, el límite superior (línea roja) con el control positivo, cuyos olivos fueron infectados con el patógeno pero no recibieron tratamiento alguno. El porcentaje de severidad de la enfermedad de este último grupo fue 19,6% ± 4,8 mientras que, el del control sin infección fue de 1,7% ± 0,5 (P <0,005). Como se observa, la severidad de los síntomas para los grupos de plantas con tratamientos se distribuyó entre ambos límites con mayor tendencia hacia el límite inferior. Todos los tratamientos bacterianos aplicados redujeron significativamente la severidad de los síntomas por verticilosis a los 5 meses, aunque ninguno de ellos fue capaz de eliminar los síntomas en su totalidad, siendo el tratamiento T8 con la cepa XT8 el que redujo en mayor grado el porcentaje de severidad. A los 10 meses del comienzo del ensayo (Figura 4.27), una de las plantas del control infectado con *V. dahliae* culminó en la defoliación y seca completa de la planta.

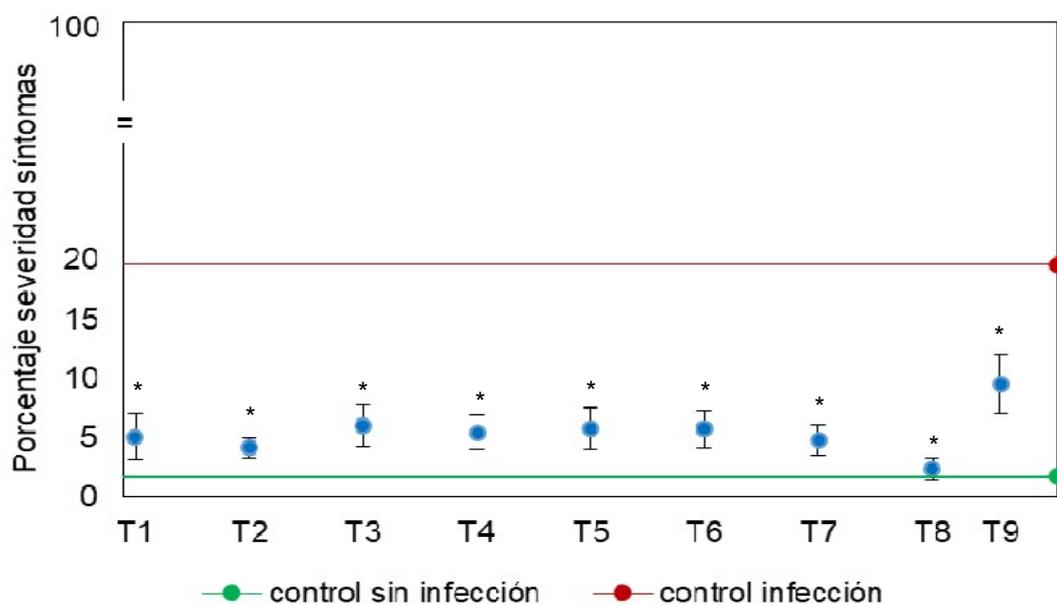


Figura 4.26. Severidad de los síntomas de la infección por *V. dahliae* patotipo D en plantas de olivo. T1, XT1 al 2% en medio SG; T2, XT1 en medio SG 1% ($P < 0,007$); T3, XT1 en medio M1 al 2%; T4, XT1 en medio M1 1%; T5, XT1+XT5 en medio SG al 1%; T6, XT5 en medio SG 2% ; T7, XT1+XT6 en medio SG al 1%; T8, XT8 en medio SG al 2%; T9, XT6 en medio SG al 2%; C-, Plantas sin infección y sin tratamiento (línea verde) y C+, plantas infectadas con *V. dahliae*, sin tratamiento (línea roja). *, diferencias significativas de los tratamientos comparados con el C+ ($P < 0,05$ Prueba *t* de student). Duración del ensayo: 5 meses

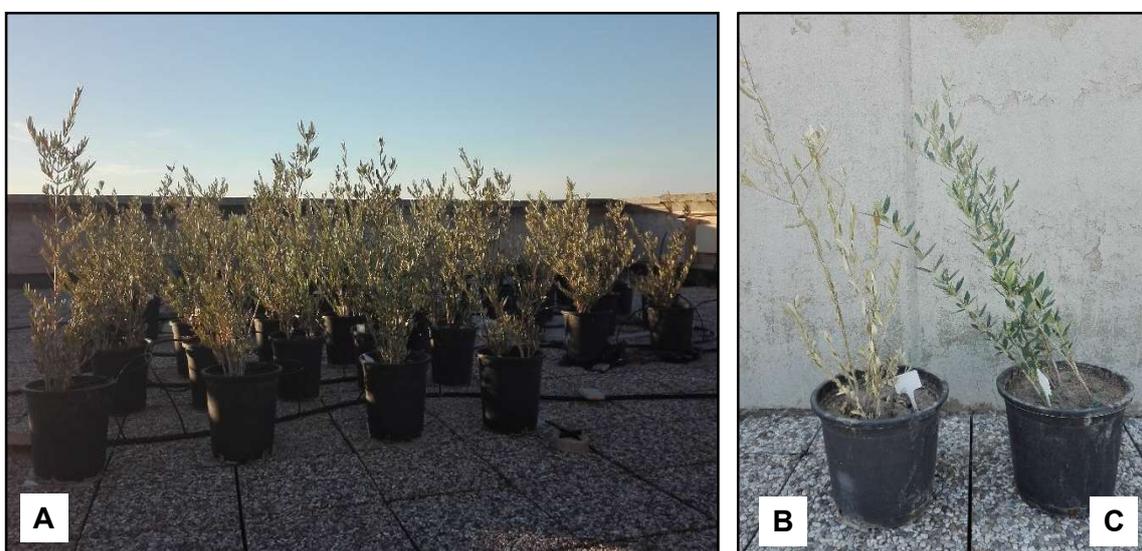


Figura 4.27. Ensayo en plantas de olivo en condiciones de semicampo. A, plantas tratadas con las cepas bacterianas e infectadas con *V. dahliae*, B, planta de olivo infectada con *V. dahliae*, sin tratamiento y C, control: planta no infectada, sin tratamiento. Duración del ensayo: 10 meses.

Por otra parte, registramos la altura de cada una de las plantas a los 5 meses y a los 19 meses, y con estos datos calculamos la altura promedio para cada tratamiento y los comparamos con los controles del ensayo (Figura 4.28). No encontramos diferencias significativas entre el control infectado y el control sin infección, señalando que la infección no tuvo repercusión sobre el crecimiento de las plantas. Sin embargo, al comparar los grupos tratados con las cepas bacterianas frente al control no infectado con *V. dahliae*, encontramos diferencias significativas para T1 ($P < 0,009$), T3 ($P < 0,0001$), T4 ($P < 0,05$), T6 ($P < 0,05$) y T7 ($P < 0,02$) lo que demuestra la capacidad estimulante del crecimiento en olivos de las cepas XT1, XT5 y la mezcla XT1+XT6 a escala de semi-campo.

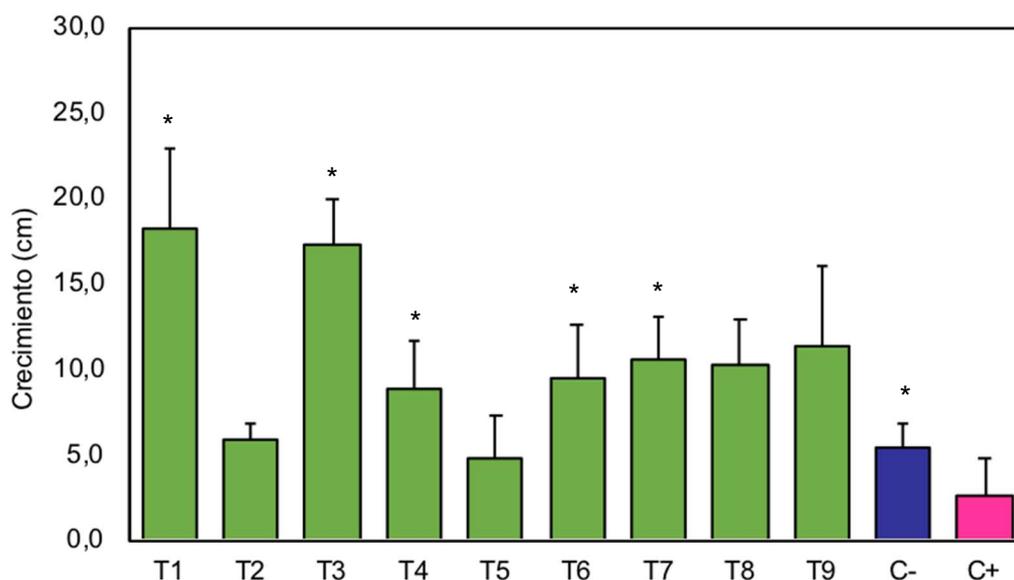


Figura 4.28. Crecimiento (altura) de las plantas de olivo. T1, Tratamiento con la cepa XT1 en medio SG 2%; T2, XT1 en medio SG 1%; T3, XT1 en medio M1 2%; T4, XT1 en medio M1 1%; T5, XT1+XT5 en medio SG 1% c/u; T6, XT5 en medio SG 2%; T7, XT1+XT6 en medio SG 1% c/u; T8, XT8 en medio SG 2%; T9, XT6 en medio SG 2%; C-, Control de plantas sin infección, sin tratamiento y C+, plantas infectadas con *V. dahliae*, sin tratamiento. *, diferencias significativas del crecimiento en comparación con el C- ($P < 0,05$ Prueba *t* de student).

Respecto a la cepa XT1, se observó que la concentración del inóculo influyó en el crecimiento de las plantas (altura). Así se encontraron diferencias significativas entre grupos de tratamientos con el mismo medio de cultivo pero a distintas concentraciones de la cepa. El crecimiento promedio en medio SG fue de $18,3 \pm 4,7$ y $5,8 \pm 1,0$ para 2% y 1%, respectivamente ($P < 0,01$) y de igual forma, en el medio M1 fue de $17,2 \pm 2,7$ y $8,8 \pm 2,8$ para 2% y 1%, respectivamente ($P < 0,001$).

4.10.4. Actividad post infección en condiciones de semi-campo, Murcia

Se evaluó el efecto de la cepa XT1 cultivada en medio Molp en plántones de olivos de la variedad Picual de 4 meses de edad, infectados con *V. dahliae* patotipo D, en condiciones

de semi-campo. Además, se evaluaron dos productos de uso agrícola utilizados para el manejo de infecciones fúngicas, Tellus® una formulación biológica a base de *T. gamsii* y *T. asperellum*, y Cercobin® un producto químico a base de metil-tiofanato. Como controles se utilizaron plantas regadas con agua y plantas regadas con medio de cultivo, infectadas con *V. dahliae* y sin infectar. Todos los tratamientos se aplicaron tres veces a intervalos de 14 días (Tabla 4.22) y se realizaron dos evaluaciones, la primera, con dos plantones de cada grupo, a los 68 días de la última aplicación de los tratamientos y, la segunda, con 3 plantones, a los 166 días (Tabla 4.23).

El tamaño de las plantas, el peso fresco de las raíces y el peso fresco de las plantas a los 68 días no fueron significativamente diferentes en comparación con los controles. Sin embargo, a los 166 días se encontraron diferencias significativas entre los grupos de plantas tratadas con XT1 y los controles sin tratamiento. Entre los distintos tratamientos con XT1 no se observaron diferencias significativas, salvo la diferencia en altura entre el tratamiento con un 1% y un 4% de inóculo.

Tabla 4.22. Dosis UFC/ sustrato en cada tratamiento.

Tratamientos	Dilución en agua	UFC/g sustrato	Infección en suelo
T1 medio de cultivo	4% v/v	-	<i>V. dahliae</i>
T2 medio de cultivo	4% v/v	-	sin <i>V. dahliae</i>
T3 XT1	1% v/v	3,1 x 10 ⁵	<i>V. dahliae</i>
T4 XT1	2% v/v	6,2 x 10 ⁵	<i>V. dahliae</i>
T5 XT1	4% v/v	1,2 x 10 ⁶	<i>V. dahliae</i>
T6 Tellus® WP	95 g/l	ND	<i>V. dahliae</i>
T7 Cercobin® 70WG	7 g/l	-	<i>V. dahliae</i>
T8 Control con agua	-	-	<i>V. dahliae</i>

Tabla 4.23. Altura (cm), peso fresco de la raíz (g) y peso fresco de la planta (g) a los 166 días de la aplicación de los tratamientos.

Tratamientos	Altura (cm)	Peso fresco raíz (g)	Peso fresco planta (g)
T1 Control +	21,0 d	7,9 b	5,8 d
T2 Control -	52,0 a	14,6 a	29,7 a
T3 XT1 1%	35,6 bc	13,7 a	17,2 c
T4 XT1 2%	45,3 ab	11,7 ab	18,1 bc
T5 XT1 4%	51,3 a	13,2 a	19,8 bc
T6 Tellus® WP	45,7 ab	13,0 ab	19,5 bc
T7 Cercobin® 70WG	48,7 a	12,2 ab	23,5 b
T8 Control con agua	31,7 cd	10,8 ab	10,5 d
LSD P= 0,05	11,9	4,7	5,5

Las medidas con la misma letra no difieren significativamente (P= 0,05, Duncan's New MRT). La diferencia mínima significativa irrestricta (LSD) indica que solo las diferencias superiores a ese valor entre los tratamientos son estadísticamente significativas (P < 0,05).

4.10.5. Actividad curativa en campo, Granada

La actividad antifúngica curativa de la cepa XT1 (Heroprotec Micro®) se evaluó sobre 20 olivos que manifestaban síntomas de verticilosis en una finca de secano. Antes del tratamiento, se determinó la presencia de *V. dahliae* en las hojas mediante siembra en agar PDA con antibiótico, encontrándose un promedio de 300 esporas de *V. dahliae* por gramo de suelo. La severidad de la enfermedad antes y después del tratamiento fue calculada para cada árbol en una escala del 1 al 4 tomando en cuenta el número de ramas secas y el estado general de los olivos (López-Escudero, 2004). Como se aprecia en la Tabla 4.24 la severidad promedio al inicio del ensayo de los dos grupos, tratados y sin tratar, mostró valores similares. Mientras la severidad de los síntomas aumentó en el grupo sin tratar durante el ensayo, el grupo tratado con Heroprotec Micro® disminuyó la severidad de los síntomas tanto a los 7 como a los 14 meses al compararla con el estadio inicial antes del tratamiento. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo no tratado a los 14 meses, y entre los 7 meses y el inicio del ensayo en el grupo tratado.

Tabla 4.24. Severidad promedio de los síntomas de verticilosis en los olivos tratados y sin tratar

Olivos	Severidad de los síntomas		
	Antes del tratamiento	7 meses	14 meses
Tratamiento con Heroprotec Micro®	1,6 ± 0,6 a	0,8 ± 0,6 b	1,0 ± 0,9 b
Sin tratamiento	1,6 ± 0,8 ab	1,7 ± 0,9 ab	2,7 ± 1,2 ac

Las medidas con la misma letra no difieren significativamente (Prueba de comparaciones múltiples Tukey).

La Figura 4.29 muestra el efecto del tratamiento con Heroprotec Micro® sobre la severidad de los síntomas de verticilosis a los 7 y a los 14 meses. Como se aprecia en la Figura, antes del tratamiento, el 70% de los olivos mostraron valores de severidad comprendidos entre 1 y 2. Tras 7 meses del tratamiento, la severidad de los síntomas del 65% de los olivos estuvo comprendida entre 0 y 1, mientras que a los 14 meses, se observó que la severidad aumentó tanto en el grupo de olivos con severidad comprendida entre 1 y 2 y en el grupo de olivos con severidad entre 3 y 4. La Figura 4.30 muestra el estado inicial de un olivo antes del tratamiento (A) y la disminución de la severidad de los síntomas a los 7 meses (B).

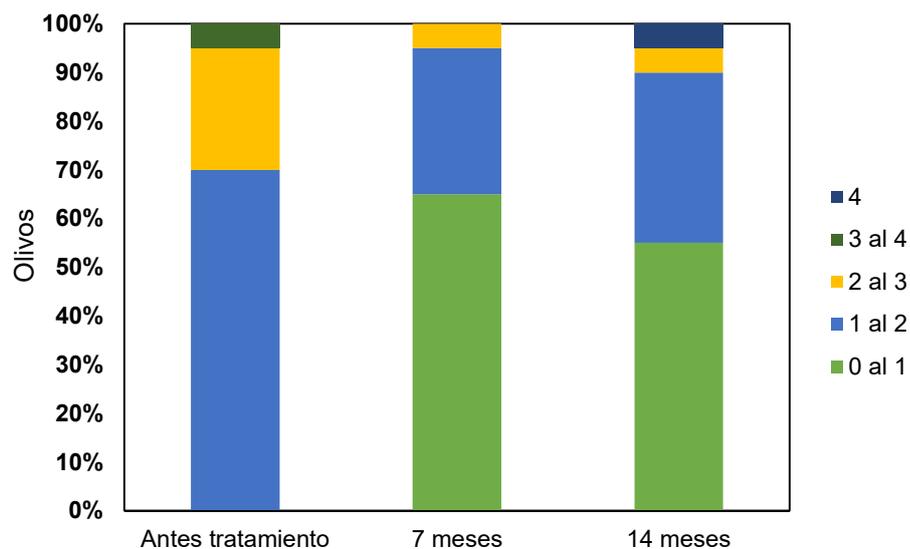


Figura 4.29. Porcentaje de la severidad de la verticilosis en olivos tratados con Heroprotec Micro® en campo.

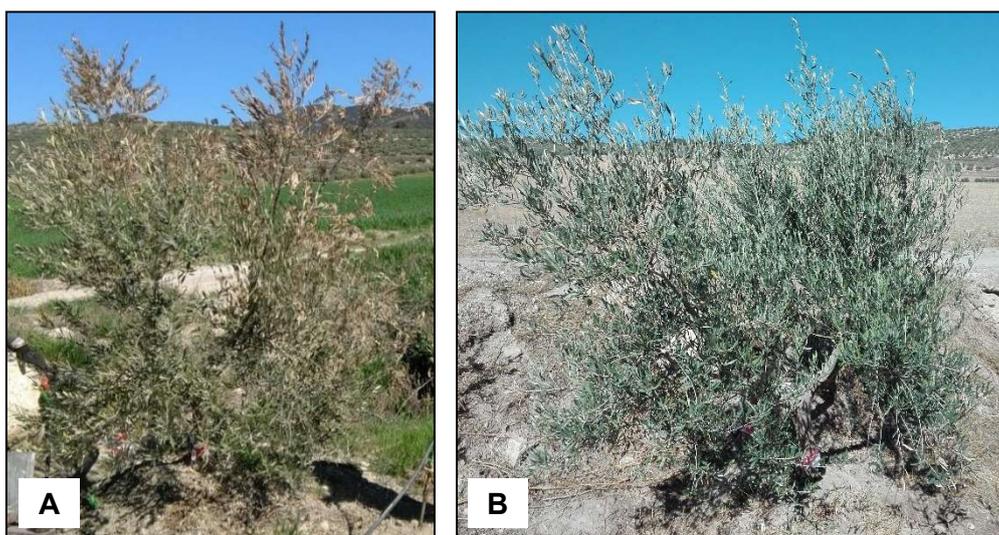


Figura 4.30. Disminución de la severidad de los síntomas de la verticilosis en un árbol de olivo. A, antes del tratamiento; B, a los 7 meses del tratamiento con Heroprotec Micro®

4.11. Presencia y permanencia de las cepas bacterianas seleccionadas en olivos

Se evaluó la permanencia de las cepas XT1 y XT212 en el sustrato de plántulas de olivo durante 120 días. Para ello, y para facilitar su recuento e identificación se obtuvieron cepas mutantes a la rifampicina que se aplicaron por riego a una concentración equivalente a 10^6 UFC/g de sustrato, repitiéndose la aplicación a los 15 días. Como control negativo se incluyó un grupo de olivos que no se les aplicó ninguna de las cepas. Se realizaron recuentos a partir de los sustratos a los 30, 60, 90 y 120 días en placas de agar nutritivo

con y sin antibiótico, y se incubaron a 28°C durante 48 horas. La Tabla 4.25 muestra las UFC/g de bacterias resistentes a rifampicina en los sustratos de las plantas tratadas con XT1 y XT212, y el control sin tratar. Los recuentos se mantuvieron en el orden de 10^5 UFC/g a las 24 horas y descendieron gradualmente hasta 10^4 y 10^3 UFC/g a los 120 días para la cepa XT1 y XT212, respectivamente. Los recuentos del grupo control se realizaron en agar nutritivo con y sin antibiótico. Como se muestra en la Figura 4.31 no se observó crecimiento de microorganismos en las placas con rifampicina.

Tabla 4.25. Recuentos de XT1 rif+ y XT212 rif+ en placas de agar nutritivo con rifampicina a partir de sustrato de olivos.

	UFC/g sustrato		
	Control*	XT1	XT212
1 día	<10 ²	6,2 x 10 ⁵	6,2 x 10 ⁵
30 días	<10 ²	1,2 x 10 ⁵	9,0 x 10 ⁵
60 días	<10 ²	8,3 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁵
90 días	<10 ²	1,2 x 10 ⁴	8,0 x 10 ⁴
120 días	<10 ²	1,4 x 10 ⁴	8,0 x 10 ³

*, Recuentos por debajo del límite de detección, en las tres réplicas.



Figura 4.31. Recuentos de sustratos de olivos sin tratar, en placas de agar nutritivo. A, sin antibiótico; B, con rifampicina.

El carácter endófito de las cepas XT1 y XT212 se evaluó en las raíces lavadas y desinfectadas con hipoclorito (Figura 4.32A) de los olivos a los 30 días del tratamiento mediante siembra en agar PDA con rifampicina. Se encontraron $3,2 \times 10^4$ UFC/g de raíz en el grupo tratado con la cepa XT1 (Figura 4.32B) y $3,4 \times 10^3$ UFC/g de raíz en el grupo tratado con la cepa XT212.



Figura 4.32. Recuentos de microorganismos resistentes a rifampicina a partir de raíces de plantones tratados con XT1. A, Raíces al final del proceso de desinfección; B, Recuento de bacterias rif+.

4.12. Análisis de metabolitos implicados en la actividad antifúngica

Se evaluó la actividad antifúngica frente a *V. dahliae* de sobrenadantes autoclavados y sobrenadantes filtrados (sin autoclavar) de las cepas crecidas en medio Molp, y de la fracción lipopeptídica de las cepas crecidas en medio Molp y medio M2 tanto en medio sólido como en medio líquido.

Se prepararon placas con agar PDA hidratadas completamente con sobrenadantes de las cepas, y con sobrenadantes diluidos a la mitad. Sobre las placas se sembró un botón fúngico y se incubaron a 22°C durante 10 días. Los porcentajes de inhibición estuvieron comprendidos entre 58,2 y 63,2 % en las placas preparadas con sobrenadantes diluidos a la mitad, y entre 67,3 y 73,68% en las placas preparadas con los sobrenadantes sin diluir (Tabla 4.26). Las cepas XT1 (Figura 4.33) y XT5 redujeron en mayor porcentaje el crecimiento del hongo.

Tabla 4.26. Inhibición del crecimiento de *V. dahliae* de sobrenadantes en medio sólido.

	% de inhibición de <i>V. dahliae</i>	
	sobrenadantes	½ sobrenadantes
XT1	73,7	63,2
XT5	71,5	61,4
XT6	69,9	60,3
XT7	67,3	58,2
XT8	68,3	59,2
XT212	72,3	60,5

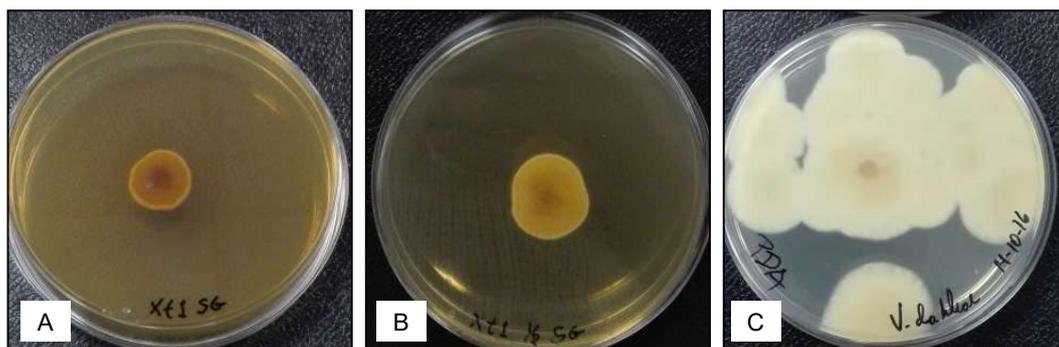


Figura 4.33. Inhibición del crecimiento de *V. dahliae* en medio PDA hidratado con sobrenadantes de cultivos de la cepa XT1. A, medio hidratado con sobrenadante sin diluir; B, con sobrenadante diluido a la mitad; C, *V. dahliae* en PDA sin sobrenadante.

En medio líquido se evaluó la actividad antifúngica de los sobrenadantes de las cepas XT1, XT5, XT6, XT7 y XT8 crecidas en medio Molp en una proporción 1:3 (sobrenadante:suspensión del hongo). La suspensión inicial del hongo fue de $9,5 \times 10^5$ esporas/ml. En el caso de sobrenadantes filtrados, se observó una reducción del crecimiento del hongo para todas las cepas, al comparar con el control de crecimiento. De igual manera, los sobrenadantes autoclavados inhibieron el crecimiento de *V. dahliae* aunque con menor grado, con excepción del sobrenadante de la cepa XT8 que inhibió completamente al hongo tanto filtrado como autoclavado.

En relación a la actividad antifúngica de la fracción lipopeptídica, se evaluó inicialmente la cepa XT1 en medio sólido. Como se observa en la Figura 4.34, el lipopéptido inhibió el crecimiento del hongo en un 45% a 10 mg/ml y en un 55% a 20 mg/ml.

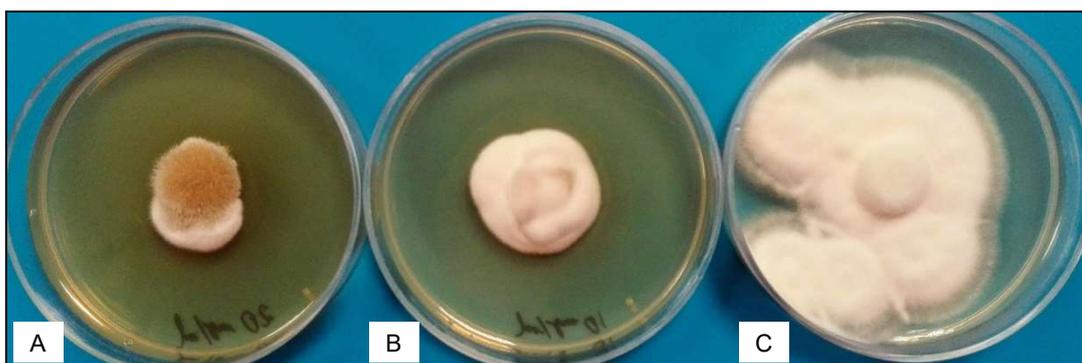


Figura 4.34. Inhibición del crecimiento de *V. dahliae* en medio PDA hidratado con lipopéptido de la cepa XT1 en caldo Molp. A, Lipopéptido 20 mg/ml; B, 10 mg/ml; C, *V. dahliae* en PDA sin lipopéptido.

A continuación se evaluó la actividad antifúngica de la fracción lipopeptídica de las cepas XT1 y XT212 en medio líquido a distintas concentraciones: 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 20 mg/ml frente a un inóculo de $9,1 \times 10^7$ esporas de *V. dahliae*/pocillo. El porcentaje de germinación fue del 90%. Tras 10 días de incubación, se observó una reducción del crecimiento del

hongo a partir de 6 mg/ml y 10 mg/ml para la cepa XT1 crecida en medio Molp y M2, respectivamente. La CMI fue de 20 mg/ml para la cepa XT1 en medio Molp, mientras que, para la cepa crecida en medio M2 fue mayor de 20 mg/ml (Figura 4.35). En el caso de la cepa XT212, la reducción del crecimiento del hongo fue observada a partir de 6 mg/ml y 4 mg/ml para lipopéptidos obtenidos de la cepa crecida en medio Molp y medio M2, respectivamente. La CMI fue mayor de 20 mg/ml para ambos medios.



Figura 4.35. Inhibición del crecimiento de *V. dahliae* en presencia de lipopéptido de la cepa XT1. Fila 1, de izquierda a derecha: lipopéptido: 20, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0,5 mg/ml; Fila 2, pocillo 1: control con cicloheximida, pocillo 8: control de crecimiento del hongo.

4.13. Ensayos de bioseguridad

4.13.1. Ensayo de sensibilidad con *E. coli* MC4100

Los ensayos de sensibilidad con *E. coli* MC4100 se realizaron utilizando sobrenadantes de cultivos esterilizados por filtración en fase estacionaria de la cepa XT1, *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174. Esos sobrenadantes se mezclaron en la misma proporción con la suspensión de *E. coli* MC4100 en un tampón estéril M9 equivalente a 10^8 - 10^9 células/ml. Tras la siembra en medio TSA se realizaron los recuentos (Figura 4.36) y se compararon con el control en M9. La cepa XT1 disminuyó significativamente la población de *E. coli* MC4100 respecto al control pero la disminución fue inferior a la que produjeron *B. cepacia* y *P. putida*. El sulfato de cobre a la concentración empleada en campo provocó la práctica desaparición de *E. coli* MC4100.

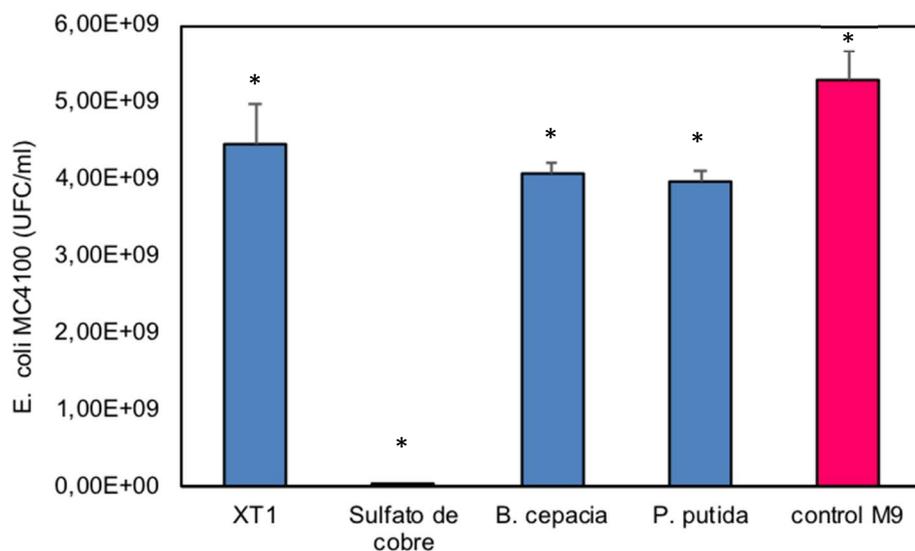


Figura 4.36. Recuento de supervivientes de *E. coli* MC4100. *, diferencias significativas en comparación con el control en M9 ($P < 0,05$ Prueba *t* de student).

4.13.2. Ensayo de interferencia metabólica con *Vibrio fischeri*

Se realizó la prueba Microtox con la bacteria marina *V. fischeri* ATCC 49387 para evaluar el efecto sobre el metabolismo microbiano de esta bacteria (bioluminiscencia) de los sobrenadantes de la cepa XT1 a partir de un cultivo en fase estacionaria en medio Cooper. No se observó reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina en presencia del control (medio de cultivo) ni a 5 ni a los 15 minutos de exposición. Por otro lado, el sobrenadante concentrado de XT1 no mostró toxicidad a los 5 minutos. Después de 15 minutos de exposición, los sobrenadantes de los cultivos XT1 a una concentración del 89,9% (v/v) redujeron la luminiscencia de *V. fischeri* en un 50%.

4.13.3. Ensayo de toxicidad con el nematodo *Caenorhabditis elegans*

Se evaluó la toxicidad de la cepa XT1 con el nematodo *C. elegans* N2 usando como controles las cepas *P. aeruginosa* PAO y *E. coli* OP50. El ensayo en medio sólido se llevó a cabo haciendo crecer el nematodo sobre placas de medio NGM que contenían las bacterias. Se realizaron recuentos del número de nematodos cada 24 horas durante 8 días (Figura 4.37).

Se encontraron diferencias significativas entre el crecimiento del nematodo en presencia de *P. aeruginosa* PAO, y los otros dos tratamientos. Por otra parte, el crecimiento del nematodo en presencia de la cepa XT1 no mostró diferencias significativas en comparación con el tratamiento con *E. coli* OP50.

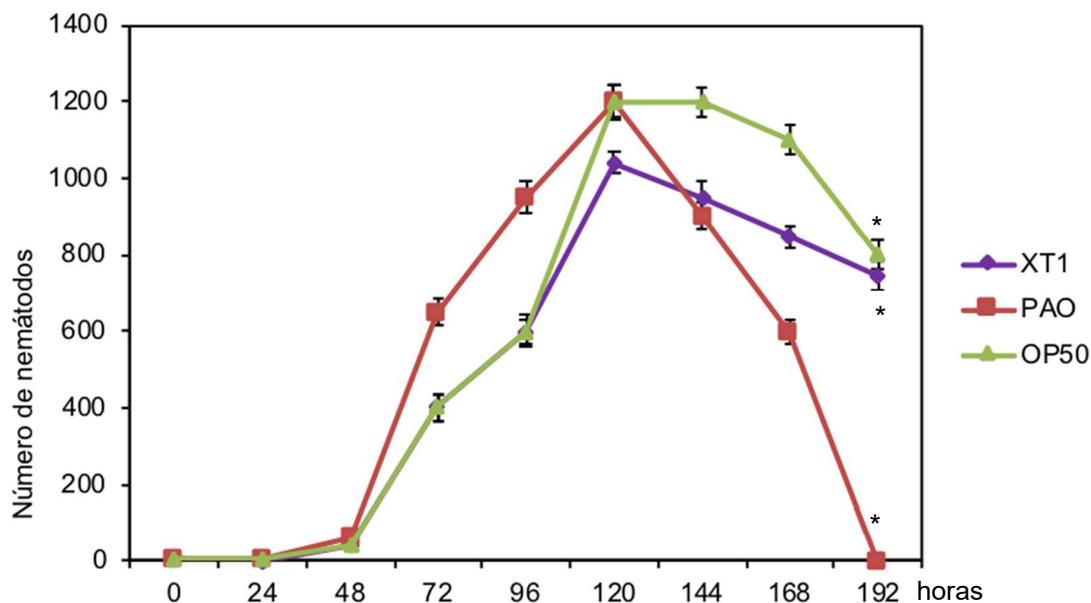


Figura 4.37. Cinética de crecimiento diferencial de la cepa N2 de *C. elegans*. Crecimiento con la cepa XT1 (morado), con *P. aeruginosa* PAO (rojo) y con *E. coli* OP50 (verde). *, diferencias significativas $P < 0,05$ Prueba *t* de student.

A continuación se determinó la concentración letal que causa la muerte del 50% de los nematodos (CL50) en medio líquido. En las placas de microtitulación de 48 pocillos, la cepa N2 de *C. elegans* se mezcló con sobrenadantes bacterianos de cepas PAO y XT1 a distintas proporciones. Para comparar los resultados, se evaluó la toxicidad de dos productos comerciales utilizados a nivel foliar en el manejo de plagas (abamectina y sulfato de cobre). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.27.

Tabla 4.27. Concentración letal 50 (CL50) para *C. elegans* de sobrenadantes de la cepa XT1 y compuestos químicos

Sobrenadante/ compuesto químico	Concentración de uso en cultivos	Concentraciones evaluadas	CL50
XT1	2 % v/v	50 / 25 / 12,5/ 2 % v/v	18,75 v/v
<i>P. aeruginosa</i> PAO	---	---	15 v/v
Sulfato de cobre	0,2 % p/p	0,2 / 0,1/ 0,05 / 0,02 % p/p	0,03 p/p
Abamectina	0,45 % p/p	0,2 / 0,1/ 0,05 % p/p	0,075 p/p

La Figura 4.38 compara la concentración necesaria para alcanzar la CL50 de la cepa XT1 y la de los productos agroquímicos evaluados. Como se observa, la concentración de uso en campo de XT1 es 9 veces menor a la concentración necesaria para alcanzar la CL50, a diferencia de la concentración de uso de los otros dos productos evaluados, donde la concentración de uso es mayor a su CL50.

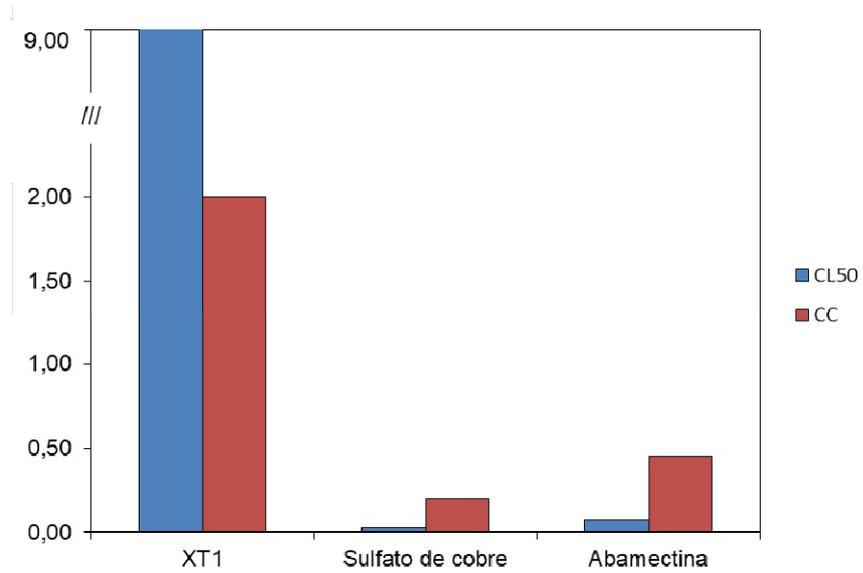


Figura 4.38. Proporciones entre las concentraciones de uso en campo (CC) y la concentración necesaria para alcanzar la CL50.

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Los microorganismos procariotas constituyen el principal componente de la diversidad de cualquier ecosistema y son los seres vivos más abundantes en nuestro planeta (Ferrer, 2004; Pedrós-Alió, 2006), aun siendo tan importantes y abundantes, hasta la fecha solo se ha podido cultivar un pequeño porcentaje (Ward y col., 1990; Stewart, 2012; Nguyen y col., 2018). El desarrollo de técnicas de secuenciación masiva junto con herramientas metagenómicas ha permitido el análisis de las comunidades microbianas, sin embargo, su cultivo es útil y necesario para entender el metabolismo de estos organismos y comprender su rol en los ecosistemas (Van y Jaisoo, 2012). En un intento por cultivar bacterias aún no cultivadas, se han desarrollado distintos métodos que involucran el crecimiento en medios y condiciones artificiales que asemejen el entorno natural mediante la modificación de los componentes del medio, las condiciones de crecimiento, pH, diluciones, cocultivos, entre otros (Nguyen y col., 2018).

Rambla Salada es un hábitat cuya diversidad ha venido siendo ampliamente estudiada por nuestro grupo de investigación desde el 2005, tanto por técnicas clásicas de cultivo (Luque y col., 2014) como por técnicas moleculares (Oueriaghli y col., 2018). Los resultados mostraron que la diversidad de especies procariotas encontrada por técnicas moleculares es mucho mayor que la hallada utilizando técnicas clásicas de cultivo. Con esta premisa, hemos utilizado la técnica de dilución a extinción descrita por Button y col., (1993) con el objetivo de mejorar la eficiencia en el cultivo y aislamiento de los microorganismos de Rambla Salada. Nuestros resultados mostraron un incremento en los porcentajes de biodiversidad cultivable con la técnica de dilución a extinción en comparación con los porcentajes obtenidos por las técnicas clásicas.

El **porcentaje de células cultivables** definido como la fracción de todas las células capaces de crecer en medios de laboratorio artificiales (Bruns y col., 2003) estuvo comprendido entre el 1,8 y el 6,1% con una mayor proporción de pocillos positivos en las muestras provenientes de Finca La Salina en comparación con las muestras de suelo de la surgencia. Connon y Giovannoni, (2002) obtuvieron porcentajes de cultivo comparables a nuestros resultados, entre 0,4 y 14,3% empleando una técnica similar basada en el cultivo por extinción a partir de muestras de agua de mar. De igual forma, Bruns y col., (2003) obtuvieron porcentajes de cultivo entre 0,3 y 10,4% a partir de muestras lacustres. La mayoría de las técnicas basadas en el cultivo por extinción se han empleado para mejorar la tasa de recuperación de microorganismos no cultivables por técnicas clásicas (Connon y Giovannoni, 2002; Rappe y col., 2002; Stingl y col., 2007).

Mediante la técnica de dilución a extinción, se obtuvieron aislados pertenecientes a los filos *Proteobacteria* (81,9%), *Firmicutes* (11,3%), *Actinobacteria* (4,5%) y *Bacteroidetes* (2,2%), mientras que por técnicas clásicas, Luque y col. (2014) encontraron los mismos filos aunque con distintos porcentajes (72,5, 25,8, 1,4 y 0,3%, respectivamente). Utilizando la técnica de dilución a extinción, se aislaron más bacterias pertenecientes a los filos *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* que las obtenidas por los medios de cultivo clásicos. Sin embargo, con ambas técnicas los principales géneros aislados fueron los

mismos, *Halomonas* y *Marinobacter*. Estos resultados concuerdan igualmente con los obtenidos por técnicas moleculares por Oueriaghli y col., (2013) que demostraron mediante DGGE la abundancia de *Halomonas* en este hábitat. Algunos de los filos cultivados en nuestro estudio se han descrito por técnicas moleculares en otros ambientes salinos. Vera y col., 2019 en suelos salinos de Huelva, España, encontraron taxones halófilos y halotolerantes de los filos *Euryarchaeota*, *Proteobacteria*, *Balneolaeota*, *Bacteroidetes* y *Rhodothermaeota*. Mediante el uso bases de datos de metagenomas (Lloyd y col., 2018) se ha conseguido elucidar que los ambientes hipersalinos fueron los ambientes con más especies cultivadas después del cuerpo humano con casi la mitad de los géneros de arqueas y bacterias cultivados y muy pocos filos no cultivados.

El predominio de las bacterias Gram negativas en ambientes salinos es muy común, siendo los microorganismos halófilos más frecuentemente descritos (Ventosa y col., 1982; Arahal y col., 2002). También se han aislado Gram positivos formadores de esporas del género *Bacillus*, y cocos Gram positivos del género *Micrococcus* y *Marinococcus*, microorganismos que también suelen estar presentes en medios salinos (Quesada y col., 1982; del Moral y col., 1987; Prado y col., 1991). En las muestras de Rambla Salada analizadas, se han encontrado cocos y bacilos Gram positivos en muy poca proporción, 0,84% y 14,96%, respectivamente. En relación a la prueba de la oxidasa, catalasa y movilidad realizada a los aislados, el 87% son oxidasa positivos, el 78% catalasa positivos y el 55% mostró movilidad.

La **microbiota de los suelos hipersalinos** es compleja y capaz de crecer en un rango de salinidad amplio (Quesada y col., 1982; Vera y col., 2019). Los aislados de Rambla salada se sembraron a distintas concentraciones de sales para determinar el rango en el cual eran capaces de crecer y la concentración óptima para su crecimiento. La mayoría de los aislados fueron capaces de crecer en un rango amplio de salinidad mostrando un marcado carácter eurihalino. Se piensa que este fenómeno ocurre por la heterogeneidad de los suelos salinos en donde ocurren muchos cambios ambientales en cortos periodos de tiempo, por lo que los microorganismos están adaptados a dichos cambios (Ventosa y Arahal, 2002). A pesar de que Rambla Salada es un ambiente seco y llueve poco, en invierno las lluvias producen una disminución de la concentración de sales (Velasco y col., 2006). Como consecuencia, los organismos especializados o estrictos son eliminados periódicamente, favoreciendo a los eurihalinos (Ventosa y col., 2008), hecho que se evidencia en nuestros resultados.

De acuerdo con la clasificación de Kushner, (1985) que define diversas categorías de microorganismos en relación a la **concentración de sales óptima para el crecimiento**, encontramos que el 19,1% de los aislados son halófilos débiles mientras que el 80,9% son halófilos moderados, es decir que el crecimiento óptimo estuvo entre 1-3% y 3-15% p/v NaCl, respectivamente. Estos resultados concuerdan con lo descrito por otros investigadores respecto a la abundancia de microorganismos halófilos moderados en ambientes hipersalinos (Ventosa y col., 1998; Benlloch y col., 2002; Ventosa y col., 2006; Oren, 2011) y en particular en Rambla Salada (Luque y col., 2014). En consonancia con estudios realizados previamente en Rambla Salada por nuestro grupo de investigación (Luque y col., 2014), no se ha encontrado ningún microorganismo halófilo extremo cuyo crecimiento óptimo estuviera por encima del 20% p/v. Esto puede

deberse a que estos microorganismos son generalmente arqueas y bacterias que predominan en ambientes con concentraciones de sales superiores al 20% p/v (Benlloch y col., 2002; Ventosa y col., 2006) y Rambla Salada tiene una concentración de sales que oscila entre el 3% y el 16% (Luque y col., 2014).

En los ambientes hipersalinos no solo la elevada concentración salina selecciona los tipos de seres vivos que los habitan, sino también, factores como la temperatura, el pH, el oxígeno disuelto y la radiación solar ejercen presión selectiva y limitan su microbiota. Como consecuencia de esto, los microorganismos que los habitan poseen capacidades genéticas y fisiológicas extraordinarias que les permiten sobrevivir y crecer bajo condiciones extremas. Un ejemplo de estas capacidades son las características de las exoenzimas de los microorganismos halófilos: el incremento de la tolerancia a la sal y al calor (Kamekura, 1986; Oren, 2002a) y la funcionalidad en soluciones con baja actividad de agua incluyendo mezclas de disolventes orgánicos/agua; todo lo anterior ocurre como consecuencia de poseer proporciones altas de aminoácidos ácidos y carga superficial negativa, siendo por ello fuertes candidatos para biocatálisis industrial (Ma y col., 2010).

La evaluación de las **actividades enzimáticas** de los microorganismos aislados resulta interesante para determinar posibles y futuras aplicaciones industriales y biotecnológicas así como para su caracterización taxonómica. Un grupo de enzimas que ha atraído mucho interés comercial son las **amilasas**. Estas enzimas se emplean en la industria para distintos propósitos, las α -amilasas productoras de glucosa y maltosa, se utilizan en la fermentación de alcohol y en la formulación del jarabe de azúcar, y las α -amilasas formadoras de malto-oligosacáridos, en el procesamiento de alimentos. Las amilasas también juegan un papel importante en las industrias de almidón, detergentes, bebidas y textiles, y su producción comercial a partir de microorganismos representa del 25 al 33% del mercado mundial de enzimas (Rajagopalan y Krishnan, 2008). El 40% de los aislados de Rambla Salada fueron capaces de hidrolizar el almidón, lo que pone de manifiesto su potencial biotecnológico.

Las **proteasas** representan aproximadamente el 65% del mercado total de enzimas industriales (Kalwasińska y col., 2018). En particular, las proteasas purificadas de microorganismos halotolerantes muestran una actividad y estabilidad excepcional en pH altos por lo que son utilizadas en la formulación de detergentes (Abdelnasser y col., 2015). Además, tienen otras aplicaciones industriales, como ablandamiento de carne, depilación y curtido de cuero, desgomado de seda, síntesis orgánica, diagnósticos médicos y recuperación de plata de películas de rayos X (Kalwasińska y col., 2018). En nuestro caso la actividad proteasa (determinada a través de la hidrólisis de la gelatina y de la caseína) fue del 43,8%

El Tween 80 y el Tween 20 (ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno) han sido los sustratos más utilizados para la detección de microorganismos lipolíticos en placas con agar (Plou y col., 1998). El Tween 80 es usado para la detección de **lipasas**, ya que contiene ésteres de ácido oleico, mientras que el Tween 20 se usa para la detección de **esterasas**, ya que contiene ésteres de ácidos grasos de cadena inferior (Ramnath y col., 2017). Las lipasas son una excelente alternativa a las técnicas orgánicas clásicas, en la transformación selectiva de moléculas complejas, útiles en la

fabricación de productos farmacéuticos, pesticidas, cosméticos, biosensores y detergentes. Poseen muchas características que favorecen su uso como un excelente biocatalizador, imparten especificidad a reacciones en las que el proceso químico es típicamente más inespecífico (Pandey y col., 1999). Para la microbiota del suelo, los productos hidrolizados por lipasas pueden actuar como fuente de energía (Sakai y col., 2002). Tras la siembra de nuestros aislados en estos medios, el 19% hidrolizó el Tween 20, mientras que el 52% hidrolizó el Tween 80.

La **actividad quitinolítica** es de gran interés biotecnológico pues puede determinar actividad antifúngica por parte de la bacteria productora (Liu y col., 2019). En nuestro caso hemos encontrado pocas bacterias productoras de quitinasa y en esos casos no había relación con la actividad antifúngica

Una gran proporción de los microorganismos evaluados tienen actividad hidrolítica frente a la mayoría de los sustratos evaluados. Estos resultados avalan el interés de avanzar en el futuro en el estudio de las características y ventajas frente a otras enzimas ya comercializadas, y en la purificación y producción a gran escala.

Tras el análisis de las secuencias del gen del ARNr 16S de los aislados de Rambla Salada, 9 secuencias resultaron tener una identidad <98% con especies válidamente descritas. De este último grupo, hemos descrito y publicado 2 especies nuevas: *Blastomonas quesadae* 912^T (Castro y col., 2017), *Roseovarius ramblicola* D15^T (Castro y col., 2018), y se encuentra en revisión una publicación de una nueva especie, *Roseovarius bejariae* A21^T (Castro y col., 2019). Las otras 6 cepas serán estudiadas más profundamente para describirlas como nuevos taxa.

Blastomonas quesadae es un bacilo gran negativo, móvil que presenta una división asimétrica. Está relacionado filogenéticamente *B. natatoria* EY 4220^T (95,9%) y *B. ursincola* KR-99^T (95,8%). Tiene un contenido de G+C de 63 mol%, un valor similar al de los miembros del género *Blastomonas* y en el rango de géneros relacionados incluidos en la familia *Sphingomonadaceae* (58,2 - 66% en moles) (Kosako y col., 2000), con la excepción de *Parablastomonas arctica* NRRL B- 59110^T que presenta 47,5 mol%, un contenido de G+C menor que el rango mencionado anteriormente (Ren y col., 2015). Contiene espermidina como poliamina principal, como se ha descrito para las cepas tipo de especies del género *Blastomonas* (Xiao y col., 2015; Yabuuchi y col., 2002) y ubiquinona Q-10 y bacterioclorofila a al igual que otras especies del género.

Roseovarius ramblicola es un bacilo gran negativo con división asimétrica y móvil por flagelos peritricos. Está relacionado filogenéticamente con *Roseovarius tolerans* EL-172^T (96,1%) y *Roseovarius azorensis* SSW084^T (95,3%) con estas especies comparte un perfil de ácidos grasos similar (Labrenz y col., 1999), así como el tipo de quinona, la ubiquinona Q10 y otras características fenotípicas y quimiotaxonómicas.

Roseovarius bejariae es un bacilo gran negativo, inmóvil. Tiene un contenido de G+C de 61,3 mol% y un perfil de ácidos grasos similar al de los miembros del género *Roseovarius* (Wang y col., 2009) (Sait y col., 2006) (Labrenz y col., 1999). La especie más relacionada filogenéticamente es *R. pacificus* con un 98,6% de identidad. Aunque este valor es superior al estimado para la delimitación de una especie procariota (Fan y col., 2017). La secuenciación de su genoma mostró que tiene un promedio de identidad

nucleotídica en el blast (ANiB) y en la hibridación *in silico* ADN-ADN con *R. pacificus* de 76,8% y de 21% respectivamente. Ambos valores inferiores a los *cut-off* propuestos para la delimitación de especies, los cuales son de 95-96% para el ANiB y de 70% para la hibridación (Fan y col., 2017) lo que indicó que se trata de un nuevo taxon.

Como parte de la caracterización de las 354 cepas y con vistas a una potencial aplicación biotecnológica evaluamos su **actividad antifúngica** *in vitro* en medio sólido y en medio líquido frente a 9 fitopatógenos: *Verticillium dahliae* V024 patotipo D, *Phytophthora cinnamomi*, *Sclerotinia sclerotiorum* CECT2769, *Magnaporthe oryzae* CECT20276, *Thanatephorus cucumeris* CECT2813, *Phytium ultimum* CEC2364, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. En este punto del trabajo incluimos un grupo de 72 cepas de la Colección de Xtrem Biotech S.L. que en estudios anteriores ya habían demostrado actividad antimicrobiana frente a distintos fitopatógenos. La finalidad de esta incorporación de cepas fue realizar un análisis comparativo de dicha actividad con vistas a seleccionar un grupo de cepas para ser aplicadas en agricultura.

Con la técnica en medio sólido, el crecimiento de todos los hongos fitopatógenos evaluados se redujo en presencia de al menos un aislado bacteriano y los porcentajes de reducción del crecimiento oscilaron desde el 15% hasta el 83%. En medio líquido, del total de 426 cepas evaluadas, 64 mostraron actividad frente al menos un fitopatógeno, de las cuales, 35 tuvieron actividad frente a dos fitopatógenos. El número de cepas de la colección de Xtrem Biotech S.L. con actividad antifúngica fue mayor que el grupo de cepas aisladas de Rambla Salada. Dentro de este último grupo, el 60% de las cepas con actividad antifúngica pertenecieron al filo *Firmicutes* dentro del orden *Bacillales*. Muchas especies del genero *Bacillus* han demostrado ser efectivas frente a una amplia gama de patógenos de plantas. Khan y col., 2018, encontraron que tres cepas de la especie *Bacillus simplex* y una de *B. subtilis* aisladas de suelo y raíces, redujeron el crecimiento de *Fusarium* spp. entre el 60 y 70%. En nuestro trabajo, encontramos que el hongo más difícil de controlar es *F. oxysporum*, así del total de cepas estudiadas, 16 de ellas redujeron el crecimiento de *F. oxysporum* entre el 17 y el 77%, de las cuales, los sobrenadantes de 4 cepas inhibieron este hongo en ensayos *in vitro* en medio líquido.

Gómez-Lama y col., 2018 encontraron que las cepas *Paenibacillus polymyxa* PIC73, *Paenibacillus terrae* PIC167 y *Bacillus* sp. PIC28 aisladas de raíces de olivos, mostraron inhibición del crecimiento *in vitro* de distintos patógenos de olivos, entre ellos *V. dahliae* y *P. cinnamomi*. En nuestro caso encontramos que 29 y 14 cepas inhibieron respectivamente estos hongos en medio sólido aunque los sobrenadantes fueron menos eficaces inhibiendo respectivamente a dichos hongos, 19 y 14 cepas

Tras el cribado inicial de la actividad antifúngica frente a 9 hongos fitopatógenos, se seleccionaron entre las 426 cepas, seis que presentaron elevada actividad antifúngica frente a los nueve hongos y especialmente frente a *V. dahliae*: XT1, XT5, XT6, XT7, XT8 y XT212. De estas cepas, 5 pertenecen a la colección de microorganismos de Xtrem Biotech S.L y una cepa fue aislada del suelo de Rambla Salada. Los análisis del gen del ARN 16S mostraron que 4 pertenecen al género *Bacillus* y 2 al género *Brevibacterium*.

Muchas especies del genero *Bacillus* han demostrado ser efectivas frente a una amplia gama de patógenos de plantas. Su uso como agente de biocontrol se está incrementando rápidamente debido a su capacidad para replicarse rápidamente, su resistencia a condiciones ambientales adversas así como también a su actividad frente a un amplio espectro de fitopatógenos (Adeniji y col., 2019; Shafi y col., 2017).

A continuación evaluamos la inhibición del crecimiento de *V. dahliae* de las 6 cepas mediante **compuestos volátiles**. Los compuestos volátiles de origen microbiano se caracterizan por su bajo peso molecular (<300 g/mol) y una presión de vapor suficientemente alta en condiciones normales, que son producidos a través de vías catabólicas, incluidas la glucólisis, la proteólisis y la lipólisis. Se han reconocido más de 200 variedades de compuestos volátiles microbianos producidos por diversas bacterias que incluyen ácidos grasos, compuestos aromáticos, compuestos que contienen nitrógeno, compuestos de azufre, terpenoides y compuestos que contienen halógenos, selenio, telurio u otro metal (Schulz y Dickschat, 2007). Estos compuestos volátiles producidos por agentes de biocontrol han mostrado actividad antimicrobiana y nematicida, capacidad para promover el crecimiento de plantas e inducir resistencia sistémica a infecciones en cultivos (Raza y col., 2013; Audrain y col., 2015; Shafi y col., 2017). La inhibición de *V. dahliae* observada en los ensayos realizados en placas con compartimentos indica la producción de este tipo de biomoléculas en las cepas XT1, XT6 y XT212 capaces de inhibir el crecimiento del fitopatógeno, las tres cepas restantes no produjeron compuestos volátiles con actividad antifúngica. Los compuestos volátiles producidos por *B. subtilis* y *B. amyloquefaciens* también juegan un papel importante en la promoción del crecimiento de las plantas y la activación del mecanismo de defensa de las plantas al desencadenar la resistencia sistémica inducida (ISR) (Compant y col., 2005).

La capacidad de las cepas para promover el crecimiento de plantas fue evaluada *in vitro* mediante la producción de ACC desaminasa, la fijación de nitrógeno atmosférico a través del crecimiento en medio Burk, la producción de fosfatasa ácida y alcalina y la producción de sideróforos. Con excepción de la fosfatasa ácida, las pruebas fueron positivas para las seis cepas seleccionadas lo que indica que potencialmente estas cepas tienen capacidad para promover el crecimiento de plantas.

La enzima **ACC desaminasa**, es una enzima que promueve el crecimiento vegetal mediante la disminución de los niveles de etileno en plantas. Esto lo consigue desaminando el precursor inmediato del etileno, el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) en α -cetobutirato (α -CB) y amonio (Bleecker y Kende, 2000). Este último metabolito es utilizado por plantas y bacterias rizosféricas como una alternativa más de fuente de nitrógeno. En respuesta a factores adversos bióticos y abióticos, las plantas incrementan su biosíntesis de etileno. La actividad enzimática de la ACC desaminasa es inducida por niveles bajos (alrededor de 100 nM) del sustrato ACC, aunque no presenta una afinidad alta por el mismo. La enzima ACC oxidasa (la cual cataliza la formación de etileno a partir del ACC) tiene mayor afinidad por el ACC que la enzima ACC desaminasa. Una forma para que ésta pueda competir efectivamente con la ACC oxidasa por el ACC, es mediante un aumento en la cantidad de ACC desaminasa disponible (Esquivel-Cote y col., 2013). Por tanto, la inoculación en suelos de bacterias que sintetizan la enzima ACC desaminasa puede mejorar la nutrición vegetal y la

resistencia a factores de estrés al disminuir la concentración de etileno en la planta. Otros microorganismos halotolerantes se han estudiado por su actividad ACC desaminasa, tal es el caso de *Arthrobacter nicotianae* (RSA68), *Bacillus stratosphericus* (RS233), *Corynebacterium variabile* (RS665), *Exiguobacterium acetylicum* (RS343), *Halomonas neptunia* (ES11E), *Oceanimonas smirnovii* (RS231), *Planococcus rifietensis* (RS224) y *Zhihengliuella alba* (RS111) que fueron capaces de incrementar el crecimiento y la resistencia a la salinidad de plantas de pimienta (Siddiquee y col., 2010).

De igual forma, todas las cepas seleccionadas fueron capaces de crecer en medio Burk, un medio libre de nitrógeno y con sacarosa en alta concentración como fuente de carbono, que permite el crecimiento selectivo de bacterias fijadoras de nitrógeno. El nitrógeno es el nutriente más importante y limitante para el crecimiento de las plantas. La **fijación biológica de nitrógeno** se limita a los microorganismos que posean un complejo enzimático (nitrogenasa) que convierte el nitrógeno de la atmósfera en amoníaco haciéndolo accesible para las plantas (Hoffman y col., 2014). Las bacterias fijadoras de nitrógeno se han clasificado en dos categorías, las asociadas a raíces de leguminosas como es el caso de *Rhizobium*, y las de vida libre que viven cerca de las raíces de manera tal que las plantas pueden absorber fácilmente el nitrógeno fijado por estas bacterias. Como ejemplo de bacterias de vida libre se han descrito especies pertenecientes a los géneros *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Burkholderia*, *Bacillus* y *Paenibacillus* (Tabassum y col., 2017). El proceso de fijación de nitrógeno por microorganismos tiene un gran impacto agronómico, económico y ecológico debido al hecho de que la disponibilidad de nitrógeno fijo representa el factor que limita con mayor frecuencia la producción agrícola en todo el mundo (Hoffman y col., 2014). Similar al nitrógeno, las formas de **fósforo** disponibles en suelo no son las apropiadas para la absorción en las plantas, es más, las plantas solo pueden absorber la forma soluble del fósforo que incluyen fosfato monobásico y dibásico. Las bacterias estimulantes del crecimiento de plantas utilizan diferentes mecanismos para solubilizar fosfato orgánico, el más común y prevalente es a través de la producción de ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido málico, ácido láctico, ácido succínico, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido 2-cetoglucónico y ácido cítrico, los cuales son secretados como producto final del metabolismo de los azúcares. Estos ácidos reducen el pH del suelo y desencadenan la quelación de Ca^{+2} para liberar la forma soluble de fosfato a partir de compuestos insolubles. Muchas especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* se consideran cepas importantes en la solubilización de fosfatos (Tabassum y col., 2017). Las 6 cepas evaluadas en este trabajo mostraron capacidad de solubilizar fosfato tricálcico y dicálcico en medio sólido, además, fueron capaces de reducir el pH desde 7,5 hasta 4,6 ($\pm 0,3$) en cultivos líquidos suplementados con fosfato tricálcico después de 7 días de incubación.

La producción de **sideróforos** es también un importante mecanismo que promueve el crecimiento de las plantas. Estas moléculas de bajo peso molecular de 0,5 a 1,0 kDa pueden ser sintetizadas por bacterias, principalmente Gram negativas, hongos, levaduras y algunas plantas (fitosideróforos), particularmente gramíneas, y actúan como agentes quelantes específicos de Fe^{3+} . La síntesis de sideróforos microbianos se incrementa en suelos con baja disponibilidad de hierro. Los complejos que forman los sideróforos con el hierro en el suelo son asimilados eficientemente por el microorganismo que los producen, por otros microorganismos en la rizosfera y beneficia

la nutrición de las plantas (Aguado-Santacruz y col., 2012). Al mismo tiempo, al secuestrar el hierro disponible en el medio, limitan el crecimiento de patógenos y la colonización de la raíz al bloquear procesos clave como la síntesis de ácidos nucleicos y la esporulación (Sayyed y col., 2009). Este mecanismo depende de la planta, del fitopatógeno a controlar, de la composición del suelo, de la bacteria productora de sideróforo y de la afinidad del sideróforo por el hierro (Aguado-Santacruz y col., 2012). La capacidad de los sideróforos para actuar como supresores de patógenos también puede ser llevada a cabo mediante la activación de los sistemas de resistencia sistémica inducida en las plantas (Meziane y col., 2005; Bakker y col., 2007). La producción de sideróforos es muy común en especies del género *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Las especies de *Pseudomonas* fluorescentes se caracterizan por la producción de pigmentos amarillo-verdosos, denominados pioverdinas que fluorescen bajo la luz UV y funcionan como sideróforos (Sharma y col., 2015). En *Oryza sativa*, las bacterias productoras de sideróforos pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Kochuria* y *Pseudomonas*, mostraron actividad antifúngica frente a fitopatógenos como *F. oxysporum*, *Pyricularia oryzae* y *Sclerotium sp.* (Chaiharn y col., 2009). La prueba con cromo azurol nos permitió determinar que las 6 cepas estudiadas eran capaces de producir sideróforos.

La aplicación de bacterias con capacidad para promover el crecimiento de plantas a través de estos mecanismos, pueden ser utilizadas como biofertilizantes y agentes de biocontrol para mejorar la agricultura, reducir el uso de fertilizantes químicos y apoyar la producción de cultivos ecológicos. Una de las características deseadas para la producción de estos agentes a mediana y gran escala es la capacidad para crecer y producir los metabolitos activos en **medios de cultivo de bajo costo**. Con esta premisa, evaluamos el crecimiento de las 6 cepas en tres medios: SG, Molp y M2, como medios útiles para ser empleados en la producción de un agente de biocontrol para la verticilosis a escala semi-industrial, y como medios alternativos para el crecimiento y producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica. Los medios SG y Molp son medios conocidos y de uso en investigación y desarrollo, y el medio M2 es un medio desarrollado por la empresa Xtrem Biotech S.L. bajo secreto industrial a partir de materias primas de origen vegetal. Las 6 cepas bacterianas fueron capaces de crecer y alcanzar concentraciones similares en los tres medios de cultivo. Esta característica supone una ventaja en los procesos de escalado y a la producción a nivel industrial.

Con miras a la formulación con varios agentes de biocontrol, evaluamos la **compatibilidad entre las 6 cepas** mediante dos técnicas en medio sólido que nos permitieron conocer el antagonismo entre ellas. En la primera técnica evaluamos las cepas por difusión de suspensiones bacterianas y sus metabolitos desde pocillos en placas con agar, y en la segunda, por dilución en placa de los sobrenadantes de las cepas. Todas las cepas inhibieron el crecimiento de al menos una de las otras del grupo seleccionado. Los resultados de antibiosis en medio líquido y medio sólido no coinciden pues la cantidad de metabolitos es diferente en ambos casos, así como la concentración bacteriana. En cualquier caso y para la aplicación conjunta de cepas, XT1 sería compatible con XT212; XT5 con XT7 y XT8; XT6 con XT7, XT8 y XT212; XT7 con XT5, XT6 y XT212; XT8 con XT5 y XT6, finalmente XT12 sería compatible con XT1 y XT7.

Una vez caracterizado el potencial de las cepas como agentes de biocontrol frente a distintos hongos fitopatógenos *in vitro*, evaluamos la **actividad preventiva y curativa en plantas de olivos frente a la infección por *V. dahliae* patotipo D**, una cepa defoliante. Para ello, evaluamos la actividad preventiva en invernadero en dos localidades (Granada y Córdoba), la actividad preventiva en condiciones de semi-campo (Granada), la actividad post-infección en condiciones de semi-campo (Murcia) y la actividad curativa en condiciones de campo (Granada). Todas las evaluaciones se realizaron sobre olivos de la variedad Picual, una de las variedades altamente susceptible a la infección por verticilosis (Leyva-Pérez y col., 2018; Martos-Moreno y col., 2006).

En el **invernadero en Granada** medimos la respuesta preventiva a la infección mediante determinaciones de parámetros fisiológicos en las hojas a los 30 días, y la evaluación de la incidencia y severidad de la infección a los 90 días.

El **malondialdehído (MDA)** es un producto de descomposición de los hidroperóxidos de ácidos grasos poliinsaturados en plantas. Se ha utilizado con frecuencia como un biomarcador para detectar la peroxidación lipídica, que es un efecto del daño oxidativo. Las especies reactivas de oxígeno afectan directamente a la membrana lipídica de las células, causando una degradación oxidativa que puede provocar lisis de la célula y daños a nivel fisiológico en la planta (Sofo y col., 2004). A mayor concentración, mayor daño oxidativo y mayor degradación de membranas lipídicas. Los datos obtenidos nos muestran una disminución en el contenido de MDA en hojas en todos los tratamientos aplicados, excepto en el grupo tratado con la cepa XT1. En este grupo, aunque se observó un ligero aumento con respecto al control infectado con *V. dahliae*, no fue significativo, lo que nos indica que el tratamiento con esta cepa no modificó la respuesta oxidativa en la planta. Destacamos las disminuciones estadísticamente significativas en la concentración de MDA determinadas en las hojas de olivos tratados con las cepas XT5, XT6, XT7 y XT212.

Los **compuestos fenólicos** son metabolitos secundarios de las plantas que pueden actuar como mecanismo de defensa en respuesta a microorganismos, como compuestos de señalización y para proteger a la planta de la radiación ultravioleta y de oxidantes. Los compuestos fenólicos de las plantas se pueden dividir en dos clases: (i) compuestos fenólicos preformados que se sintetizan durante el desarrollo normal de los tejidos de las plantas y (ii) compuestos fenólicos inducidos que las plantas sintetizan en respuesta a una lesión física, infección o situaciones de estrés como altas concentraciones de metales pesados, radiación UV, temperatura, etc. Los compuestos fenólicos inducidos también pueden sintetizarse constitutivamente, pero, adicionalmente, su síntesis a menudo se incrementa bajo estrés biótico o abiótico. Los compuestos fenólicos preformados, son ubicuos en las plantas y juegan un papel importante en la resistencia frente a los hongos filamentosos. Algunos de los compuestos fenólicos preformados se almacenan en las células vegetales como formas inactivas, y pueden ser convertidos fácilmente en antibióticos biológicamente activos mediante glucosidasas en respuesta al ataque de patógenos (Lattanzio y col., 2006). En nuestros resultados, los tratamientos aplicados en los olivos infectados con *V. dahliae* disminuyeron significativamente la concentración de compuestos fenólicos totales en las hojas comparados con el grupo control (infectado con el hongo sin tratamiento), a

excepción del grupo tratado con la cepa XT1, que no modificó la respuesta frente a la infección mostrando concentraciones de compuestos fenólicos equivalentes a la del grupo control.

Si los compuestos fenólicos antimicóticos preformados no son suficientes para detener el desarrollo de un proceso infeccioso, las células vegetales generalmente responden aumentando el nivel de fenoles antifúngicos en el sitio de la infección. El aumento del nivel de compuestos fenólicos proporciona el sustrato para las reacciones oxidativas catalizadas por la enzima **polifenol oxidasa** (PPO) (Lattanzio y col., 2006). La importancia de la actividad de la polifenol oxidasa en la resistencia a las enfermedades probablemente se deba a su propiedad de oxidar compuestos fenólicos a quinonas, que a menudo son más tóxicas para los microorganismos que los fenoles originales. Es razonable suponer que una mayor actividad de las polifenol oxidasas dará como resultado concentraciones más altas de productos tóxicos de oxidación y, por lo tanto, mayores grados de resistencia a la infección (Agris, 2005). Nuestros resultados mostraron que las plantas infectadas con el hongo y tratadas con las cepas bacterianas incrementaron significativamente la actividad PPO en las hojas, en comparación con el control, comprobando que el incremento de la actividad PPO está directamente relacionado con la aplicación de los tratamientos. Destacamos el incremento mostrado por el tratamiento con XT1 con una concentración aproximadamente 4 veces superior a la del control y casi dos veces la concentración del resto de los tratamientos. Se ha comprobado que la actividad de la enzima polifenol oxidasa es generalmente mayor en plantas resistentes infectadas que en aquellas susceptibles infectadas o en plantas sanas no infectadas (Agris, 2005). En acuerdo con esto, el aumento de la actividad de la enzima polifenol oxidasa tras la aplicación de los tratamientos en plantas infectadas, estaría relacionado con un estado de resistencia inducida frente a la infección.

En relación a la **detección de *V. dahliae* en las hojas de olivos**, encontramos presencia del hongo en el grupo control y en el tratado con XT7 a los 30 y 90 días, mientras que, en el resto de los tratamientos el hongo fue detectado a los 90 días tras la infección, lo que supone un retraso de la infección de *V. dahliae* en las hojas. A los 90 días, el menor porcentaje de incidencia se encontró en el grupo tratado con la cepa XT1.

Con respecto a la **severidad**, el tratamiento con la cepa XT7 mostró la severidad más alta, y el tratamiento con XT1 la severidad más baja. De igual forma, todos los tratamientos redujeron significativamente el **índice de daño**. La cepa XT1 mostró el índice de daño más bajo y el grupo tratado con la cepa XT7 el índice de daño más alto. Estos resultados vistos en conjunto con la detección de *V. dahliae* en hojas nos indican que, a diferencia del tratamiento con la cepa XT7, el resto de los tratamientos retrasaron el curso de la infección de *V. dahliae*.

La **determinación del número de esporas en los sustratos** mostró una reducción entre el 20 y el 36% en los grupos tratados con XT1, XT5, XT6 y XT212. Otros investigadores han conseguido reducciones mayores. En este sentido, Varo y col., 2016 consiguieron reducir la viabilidad de las esporas entre el 40 y el 70% tras la aplicación de tratamientos con cepas de *B. subtilis* en olivos de la variedad Picual. Al igual que

nuestros resultados, no se observó una relación de la reducción de viabilidad de las esporas con la disminución de la severidad de los síntomas.

En la evaluación de la **actividad preventiva antifúngica en el invernadero en Córdoba**, la menor protección se encontró en los grupos tratados con XT8 y Bioten® mientras que XT1 tuvo el mejor efecto protector, con la menor incidencia y retrasando la aparición de los síntomas. Estos resultados son coherentes con los resultados obtenidos en la experiencia anterior en el invernadero de Granada, donde también se observó un retraso en la aparición de los síntomas y una disminución de la incidencia en los olivos tratados con la cepa XT1.

El análisis conjunto de los valores de **severidad** de la enfermedad tras siete evaluaciones semanales, confirmó la tendencia observada en las primeras evaluaciones. XT1 mostró la menor severidad, y el resto de tratamientos y controles mostraron valores de severidad similares entre ellos, pero tres veces más altos que los conseguidos en el tratamiento con XT1.

Nuestros resultados mostraron valores de incidencia y severidad del producto comercial Bioten® similares a los encontrados por Varo y col., 2016. Al compararlo con XT1 observamos que, XT1 tuvo mejor efecto protector que el producto biológico comercial. Respecto a la **inhibición de esporas** en suelo, mientras que Bioten® inhibió completamente las esporas de *V. dahliae* (Varo y col., 2016), XT1 las inhibió en un 20%. Con estas observaciones podemos inferir que, la efectividad de XT1 en olivos sobre los síntomas de la verticilosis se debió en mayor medida a una interacción de la bacteria con la planta y en menor medida a su actividad antifúngica en el suelo.

Otros microorganismos han sido estudiados y utilizados como agentes de biocontrol frente a *V. dahliae*. Entre ellos, cepas de *Pseudomonas spp.* (Gómez-Lama Cabanás y col., 2018; Varo y col., 2016; Prieto y col., 2009; Mercado-Blanco y col., 2004), *Paenibacillus spp.* (Markakis y col., 2016) y *Bacillus spp.* Este último género ha venido ganando interés como agente de biocontrol frente a *V. dahliae*. Tal es el caso de la cepa de *B. amyloquefaciens* 5-127 que redujo el porcentaje de severidad de la verticilosis en berenjenas en condiciones de invernadero y el índice de daño en patatas en condiciones de campo (Tjamos y col., 2004). Otras especies de *Bacillus* han mostrado efectividad frente a la verticilosis en colza (Danielsson y col., 2007), algodón (Yang y col., 2014) y fresa (Zhang y col., 2012), y en plantas leñosas donde distintas cepas de *B. subtilis* aisladas de arces sanos, redujeron la severidad de los síntomas de la verticilosis en arces inoculados con el fitopatógeno en condiciones de invernadero (Hall y col., 1986).

Por otra parte, en **condiciones de semicampo en Granada**, evaluamos la severidad de la infección y el efecto estimulante del crecimiento de los tratamientos preventivos. Durante la experiencia, la infección en el control positivo no mostró un progreso similar al encontrado en los ensayos en invernadero y apenas alcanzó el 20% de severidad. Esto podría ser consecuencia del sustrato no estéril que utilizamos para simular las condiciones del campo, siendo posible que la microbiota presente interfiriera en el curso de la infección. Respecto a la efectividad de los tratamientos, todos redujeron la **severidad** siendo XT8 el tratamiento que la redujo en mayor grado. No se habían conseguido buenos resultados con esta cepa en experiencias anteriores por lo que pensamos, que es posible, que la microbiota o las características edafológicas del suelo

le favorecieron en la disminución de la severidad. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora no son suficientes y se hace necesario profundizar con otras herramientas como un análisis metagenómico de las poblaciones. No se encontró una relación entre el medio utilizado para el cultivo de los microorganismos y la concentración del inóculo con la severidad encontrada. Respecto al **efecto estimulante del crecimiento**, si encontramos una relación entre el medio de cultivo y la concentración de XT1. A mayor concentración del inóculo, mayor crecimiento independiente del medio. Además, la cepa XT1 en el medio M1 estimuló el crecimiento de los olivos significativamente tanto al 1% como al 2%.

Las tendencias recientes en el biocontrol de las enfermedades de las plantas se han centrado en el desarrollo y uso de **consorcios** de microorganismos beneficiosos (Gómez-Lama y col., 2018; Varo y col., 2016). En nuestros tratamientos con dos cepas, T5 (XT1+XT5) y T7 (XT1+XT6). Este último incrementó significativamente el crecimiento de las plantas. Al comparar con los tratamientos de cada cepa de forma independiente no encontramos diferencias significativas ni en el tratamiento con XT1 (T2) ni en el tratamiento con la cepa XT6 (T9), sugiriendo que la estimulación del crecimiento estuvo relacionada con un efecto sinérgico entre ellas, este comportamiento es contrario a los análisis *in vitro* en los que se demuestra que en medio sólido XT6 inhibe a XT1 aunque esto no ocurre con los sobrenadantes. Es probable que la inhibición provocada en medio sólido sea debida a la utilización de una elevada concentración bacteriana. Caso contrario ocurrió con el tratamiento T5 en donde la mezcla no favoreció el crecimiento de los olivos pero ambas bacterias por separado estimularon significativamente el crecimiento. El comportamiento de la mezcla T5 podría deberse a la actividad antagónica de la cepa XT1 sobre la cepa XT5 mostrada previamente en análisis *in vitro*. Por tanto los resultados de compatibilidad realizados *in vitro* no coinciden totalmente con los realizados *in vivo* con plantas de olivo.

En base a los resultados obtenidos en las experiencias previas, nos centramos en el estudio de la cepa XT1 para evaluar su actividad post-infección en condiciones de semi-campo y el efecto curativo en campo.

En el **ensayo en condiciones de semi-campo realizado en Murcia** se evaluó la actividad post-infección de la cepa XT1. Para ello los olivos, antes de ser tratados con XT1 son infectados con *V. dahliae*. En estos ensayos no se observaron síntomas visibles de la infección por *V. dahliae* pero las comparaciones del grupo infectado (T1) con el grupo no infectado (T2) mostraron diferencias significativas en las tres variables estudiadas: tamaño de las plantas, peso fresco de raíces y peso fresco de las plantas a los 166 días de la infección con el patógeno. Por una parte, el control inoculado con *V. dahliae* y no tratado con las cepas (T8) y el control (T1, inoculado con *V. dahliae* y tratado con el medio de cultivo) ambos tuvieron una **altura de planta** significativamente menor que las plantas tratadas con medio de cultivo sin inocular con *V. dahliae* (T2). Esto nos indica que la infección con *V. dahliae* disminuyó significativamente la altura de las plantas. Los grupos de plantones tratados con XT1, Tellus y Cercobin tuvieron una altura de planta significativamente mayor que el control positivo (T1). En el caso de XT1, encontramos una relación entre la concentración de bacteria aplicada y el tamaño de los plantones de cada grupo. A mayor concentración de XT1, mayor longitud de la planta (4%>2%>1%), destacando que la altura promedio de los plantones tratados con XT1 al

4% (T5) fue similar a la altura promedio de los plantones tratados con medio de cultivo y no inoculados con el hongo (T2), confirmando el efecto de XT1 sobre el crecimiento de las plantas y descartando el efecto del medio de cultivo. Al comparar las distintas concentraciones aplicadas de XT1 con los productos comerciales Tellus y Cercobin, observamos que al 2% (T4) la altura de las plantas fue similar a la encontrada por el producto biológico Tellus, y al 4% la altura promedio de las plantas fue mayor que la de las plantas tratadas con el producto químico Cercobin.

En relación al **peso fresco de las raíces**, encontramos diferencias significativas entre el control positivo (T1, inoculado con *V. dahliae* y tratado con el medio de cultivo) y el control negativo (T2, plantas no infectadas con *V. dahliae* y tratadas con medio de cultivo) lo que nos señala que la presencia del hongo redujo significativamente el peso de las raíces. El peso de las raíces de las plantas tratadas con XT1 al 1 y 4% se incrementó significativamente en comparación con el control positivo, sin embargo, no encontramos una respuesta de dosis clara entre la concentración aplicada de XT1 y el incremento en peso de las raíces. A diferencia de XT1, los productos comerciales evaluados no mostraron diferencias significativas con el control inoculado con el hongo (T1).

Finalmente, para el **peso fresco de la parte aérea** de las plantas encontramos un efecto dosis dependiente entre los grupos de plantas tratadas con XT1 (4%>2%>1%) y un mayor peso en el grupo de plantas del tratamiento de XT1 al 4% que el grupo tratado con el producto biológico Tellus.

Como último ensayo de la actividad antifúngica, evaluamos la **actividad curativa de la cepa XT1 en condiciones de campo**, en olivos con síntomas de verticilosis. El terreno donde actualmente se encuentran estos olivos fue anteriormente utilizado para cultivar algodón, un cultivo muy relacionado con la diseminación de la verticilosis en Andalucía. Para este ensayo se utilizó la cepa XT1 en un preparado comercial elaborado por la empresa Herogra especiales denominado Heoprotec Micro® <http://herogra.es/tag/heroprotec-micro/>

En primer lugar, los recuentos de las esporas en el suelo nos permitieron confirmar la presencia del hongo en el mismo, obteniéndose valores entre x-y. Esto se corresponde con los síntomas característicos de la verticilosis en los olivos.

La aplicación del tratamiento disminuyó la **severidad** de los síntomas de todos los olivos a los 7 meses y a los 14 meses se mostraron recuperados, con nuevos brotes y con ramas en buen estado. Todos los olivos con severidad inicial entre 1 y 3 respondieron positivamente al tratamiento y ninguno regresó a los valores de severidad iniciales a pesar de que se observó un ligero aumento de la misma entre los meses 7 y 14. Sin embargo, la severidad de un árbol que inicialmente mostró valores superiores a 3, se logró disminuir hasta 2,8 a los 7 meses del tratamiento, pero a los 14 meses alcanzó la mayor severidad o seca total. Esto nos hace pensar que la efectividad de Heoprotec Micro® podría depender del estadio inicial de la enfermedad. En nuestras experiencias anteriores en condiciones de invernadero y semi-campo, observamos una relación directamente proporcional entre la concentración de microorganismos aplicada y la disminución de la incidencia y severidad de la verticilosis. En este caso se aplicó únicamente la concentración de 2% v/v por lo que se necesitan más estudios que

puedan aportar datos útiles relacionados con la dosis del producto a utilizar dependiendo de la severidad inicial.

Una característica deseable de los agentes de biocontrol es la capacidad para persistir durante largos períodos de tiempo en el suelo en condiciones ambientales adversas. La alta tasa de supervivencia en los suelos de algunas especies de *Bacillus* (Gómez-Lama y col., 2018) así como, la capacidad para colonizar endofíticamente las raíces (Prieto y Mercado Blanco, 2008; Prieto y col., 2011), juegan un papel importante en su efectividad. En este estudio evaluamos la presencia y permanencia de la cepa seleccionada como la mejor de la colección de Xtrem Biotech SL, la cepa XT1 y la cepa de mayor actividad de las seleccionadas de Rambla Salada por la técnica de dilución a extinción, la cepa XT212 en sustratos y raíces de plántulas de olivos. Los recuentos comprobaron la permanencia de las dos cepas hasta los 4 meses en los sustratos y el carácter endofítico de ambas en las raíces de olivos a los 30 días. Esta propiedad endofítica, que permite establecer una asociación íntima con la planta huésped, puede estar relacionada con la capacidad para estimular el crecimiento y reducir la severidad de infecciones por patógenos (Compant y col., 2016). Se requiere llevar a cabo más estudios que permitan profundizar en la diversidad, la complejidad y las interacciones de las poblaciones microbianas en las raíces de los olivos.

Muchas especies del género *Bacillus* son conocidas por su producción de lipopéptidos con actividad frente a patógenos de plantas (Dunlap y col., 2013; Volpon y col., 2000). Estas moléculas biosurfactantes tienen varias ventajas frente a los tensioactivos químicos, que incluyen baja toxicidad, alta biodegradabilidad y efectividad a temperaturas y pH extremos (Ayed y col., 2014). La evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de la fracción lipopeptídica de las cepas XT1 y XT212 frente a *V. dahliae* mostró una reducción del crecimiento del hongo que estuvo directamente relacionado con la concentración del lipopéptido y el medio en que se creció la bacteria. Entre los lipopéptidos producidos por *Bacillus spp.* se encuentran bacilomicina, iturina, micosubtilina, surfactina y fengicina (Gong y col., 2015; Jacques y col., 1999). Investigaciones llevadas a cabo previamente por nuestro grupo de investigación han demostrado la producción de surfactina y bacilomicina D por la cepa XT1 (Toral y col., 2018) y de surfactina, bacilomicina D, fengicina A y fengicina B por la cepa XT212 (Rodríguez-Ruiz, 2018). La producción de estas moléculas en estas cepas añade especial interés en aplicaciones para la agricultura, la biotecnología y la industria farmacéutica (Shafi y col., 2017).

Finalmente, determinamos la bioseguridad de la cepa más eficaz para el control de la verticilosis, la cepa XT1 mediante el impacto sobre otros microorganismos y su metabolismo, así como sobre la viabilidad y supervivencia de nematodos. Los resultados en conjunto nos permitieron conocer que la cepa XT1 mostró un efecto antagónico sobre *E. coli* MC4100 pero inferior al mostrado por *P. putida* KT2440 y *B. cepacia* CC-A174. El agroquímico sulfato de cobre, que es frecuentemente utilizado en el olivar, redujo prácticamente la totalidad de la población de *E. coli* MC4100. Por otra parte, los sobrenadantes de XT1 no redujeron la luminiscencia de *V. fischeri* y la DL50 se alcanzó tras 15 minutos con los sobrenadantes a una concentración del 89,9%. Estos resultados ponen de manifiesto una baja toxicidad de la cepa sobre las comunidades microbianas, otra característica deseable de los agentes de biocontrol. Adicionalmente, los estudios

con *C. elegans* demostraron que XT1 no ejerció un efecto tóxico significativo sobre la viabilidad del nematodo y mostró un comportamiento similar al de *E. coli* OP50 al final del ensayo. Las comparaciones de XT1 con *P. aeruginosa* PAO demuestran su baja o inexistente toxicidad. Los ensayos en medio líquido demostraron que la dosis de uso en campo de XT1 (Heroprotec Micro®) tiene una toxicidad 9 veces menor que la CL50 mientras que las concentraciones recomendadas para el uso de la abamectina y sulfato de cobre en campo resultaron tóxicas en este modelo.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. La técnica de dilución a extinción ha permitido cultivar 354 cepas pertenecientes a 60 especies válidamente descritas de los filos *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Bacteroidetes*. Los géneros más abundantes fueron *Marinobacter*, *Halomonas* y *Bacillus*.
2. El cultivo por extinción permitió incrementar la diversidad cultivable de los suelos de Rambla Salada. Concretamente se obtuvieron más representantes de los filos *Actinobacteria* y *Bacteroidetes* que cuando se utilizan los métodos de cultivo clásicos.
3. Utilizando la técnica de dilución a extinción hemos descrito hasta la fecha 3 especies nuevas: *Blastomonas quesadae* 912^T, *Roseovarius ramblicola* D15^T y *Roseovarius bejariae* A21^T.
4. Una alta proporción de las cepas con actividad antifúngica *in vitro* frente a *V. dahliae* pertenecen al filo *Firmicutes*, orden *Bacillales*.
5. Los metabolitos responsables de la actividad antifúngica fueron los lipopéptidos y los compuestos volátiles en las cepas XT1, XT6 y XT212.
6. La aplicación preventiva de las seis cepas seleccionadas en olivos infectados con *V. dahliae* puso de manifiesto una protección a la infección mediante la disminución de la incidencia y la severidad de los síntomas de la verticilosis, la reducción de las esporas en el suelo, la inducción de una respuesta sistémica defensiva frente al hongo y un incremento en el crecimiento de los plantones, siendo XT1 la cepa que mostró los resultados más prometedores.
7. El formulado Heroprotec Micro® realizado con la cepa XT1 mostró actividad curativa en olivos afectados por *V. dahliae* en condiciones de campo.
8. La aplicación de la cepa XT1 constituye una alternativa segura y ecológica en relación a los métodos de control tradicionales y podría establecerse como elemento clave en las estrategias integradas para el manejo de la verticilosis.

7. BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Abdelnasser S.S.I., Salamah A.A.A., Elbadawi Y.B., Tayeb M.A.E., Ibrahim S.S. (2015). Production of extracellular alkaline protease by new halotolerant alkaliphilic *Bacillus* sp. NPST-AK15 isolated from hyper saline soda lakes. *Electron J Biotechnol.* 18: 236-243.

Abdul-Baki A., Anderson, J.D. (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple Criteria. *Crop Sci* 13: 630-633.

Adeniji A.A., Loots D.T., Babalola O.O. (2019). *Bacillus velezensis*: phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation. *Appl Microbiol Biotechnol* 103 (9): 3669-3682.

Agencia de Información y Control Alimentarios (AICA). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España. <http://www.aica.gob.es>. Consultada 30 de octubre de 2019.

Agrillo B., Mirino S., Tatè R, Gratino L., Gogliettino M., Cocca E., Tabli N., Nabti E., Palmieri G. (2019). An alternative biocontrol agent of soil-borne phytopathogens: A new antifungal compound produced by a plant growth promoting bacterium isolated from North Algeria. *Microbiol Res* 221: 60-69.

Agrios G. (2005). *Plant Pathology.* 5th Edition, Elsevier Academic Press, Amsterdam, 26-27: 208-272.

Aguado-Santacruz G.A., Moreno-Gómez B., Jiménez-Francisco B., García-Moya E., Preciado-Ortiz Ricardo E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Rev fitotec mex* 35 (1): 9-21.

Ahimou F., Jacques P., Deleu M. (2000). Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. *Enzyme Microb Technol* 27 (10): 749-754.

Alikhan N.F., Petty N.K., Ben Zakour N.L., Beatson S.A. (2011). BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. *BMC Genom* 12: 402.

Allgaier M., Uphoff H., Felske A., Wagner-Döbler I. (2003). Aerobic anoxygenic photosynthesis in *Roseobacter* clade bacteria from diverse marine habitats. *Appl Environ Microbiol* 69: 5051-5059.

Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25 (17): 3389-3402.

Analytical Software (2013). Statistix®10. Data analysis software for researchers. Analytical Software, Tallahassee, FL. www.statistix.com

Arahal D.R., Ludwig W., Schleifer K.H., Ventosa A. (2002). Phylogeny of the family *Halomonadaceae* based on 23S and 16S rDNA sequence analyses. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 241- 49.

ASTM E2172-01 (2002). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity tests with the nematode *Caenorhabditis elegans*. America Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA: 1606-1616.

Ayed H.B., Hmidet N., Béchet M., Chollet M., Chataigné G., Leclère V., Jacques P., Nasria M. (2014). Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21. *Process Biochem* 49 (10): 1699-1707.

Baird-Parker A.C. (1963). A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical tests. *J Gen Microbiol* 30: 409-427.

Bakker P.A.H.M., Pieterse C.M.J., Loon L.C. (2007). Induced systemic resistance by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology* 97: 239-243.

Barrow G.I., Feltham R.K.A. (1993). Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria Barrow G.I., Feltham R.K.A. (eds) Cambridge University Press, Cambridge.

Benloch S., López-López A., Casamayor E.O., Ovreas L., Goddard V., Daeë F.L., Smerdon G., Massana R., Joint I., Thingstad F., Pedrós-Alió C., Rodríguez-Valera F. (2002). Prokaryotic genetic diversity throughout the salinity gradient of a coastal solar saltern. *Environ Microbiol* 4: 349-360.

Berlanger I., Powelson M.L. (2000). Verticillium wilt. The Plant Health Instructor. American. The American Phytopathological Society (APS). DOI: 10.1094/PHI-I-2000-0801-01.

Biebl H., Allgaier M., Lünsdorf H., Pukall R., Tindall B.J., Wagner-Döbler I. (2005). *Roseovarius mucosus* sp. nov., a member of the *Roseobacter* clade with trace amounts of bacteriochlorophyll *a*. *Int J Syst Evol Microbiol* 55: 2377-2383.

Biebl H., Pukall R., Lünsdorf H., Schulz S., Allgaier M., Tindall B.J., Wagner-Döbler I. (2007). Description of *Labrenzia alexandrii* gen. nov., sp. nov., a novel alphaproteobacterium containing bacteriochlorophyll *a*, and a proposal for reclassification of *Stappia aggregata* as *Labrenzia aggregata* comb. nov., of *Stappia marina* as *Labrenzia marina* comb. nov. and of *Stappia alba* as *Labrenzia alba* comb. nov., and emended descriptions of the genera *Pannonibacter*, *Stappia* and *Roseibium*, and of the species *Roseibium denhamense* and *Roseibium hamelinense*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 1095-1107.

Blanco-López M.A., Jimenez-Díaz R.M. (1995). Una propuesta de lucha integrada contra la verticilosis del olivo. *Fruticultura Profesional*. 70: 52-59.

Bleecker A.B., Kende H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annu Rev Cell Develop Biol* 16: 1-18.

Boyd W.A., Smith M.V., Freedman J.H. (2012). *Caenorhabditis elegans* as a model in developmental toxicology. *Methods Mol Biol* 889:15-24.

Bruns A., Nübel U., Cypionka H., Overmann J. (2003). Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* 69 (4): 1980-1989.

Bulich A.A. (1979). Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments, in *Aquatic Toxicology: Second Conference*, L.L. Marking, R.A. Kimerle (eds.), ASTM STP 667, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 98-110.

Button D.K., Schut F., Quang P., Martin R., Robertson B.R. (1993). Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory, procedures, and initial results. *Appl Environ Microbiol* 59 (3): 881-891.

Carder J.H., Morton A., Tabrett A.M., Barbara D.J. (1994). Detection and differentiation by PCR of subspecific groups within two *Verticillium* species causing vascular wilts in herbaceous hosts. En: Schots A., Dewey F.M., Oliver R. (Eds.) 1994: *Modern Assays for plant pathogenic Fungi: Identification, detection and quantification*. CAB International, Oxford: 91-97.

Castro D.J., Cerezo I., Sampedro I., Martínez-Checa F. (2018). *Roseovarius ramblicola* sp. nov., a moderately halophilic bacterium isolated from saline soil in Spain. *Int J Syst Evol Microbiol* 68 (6): 1851-1856.

Castro D.J., Gomez-Altuve A., Reina J.C, Rodríguez M., Sampedro I., Llamas I., Martínez-Checa F. (2019). *Roseovarius bejariae* sp. nov. - a moderately halophilic bacterium isolated from a saline soil in Rambla Salada (Murcia). *Int J Syst Evol Microbiol*. Artículo en Revisión.

Castro D.J., Llamas I., Béjar V., Martínez-Checa F. (2017). *Blastomonas quesadae* sp. nov., isolated from a saline soil by dilution-to-extinction cultivation. *Int J Syst Evol Microbiol* 67 (6): 2001-2007.

Caswell-Chen E.P., Chen J., Lewis E.E., Douhan G.W., Nadler S.A., Carey J.R. (2005). Revising the standard wisdom of *C. elegans* natural history: ecology of longevity. *Sci Aging Knowledge Environ* 2005 (40): 30.

Chaiharn M., Chunnaleuchanon S., Lumyong S. (2009). Screening siderophore producing bacteria as potential biological control agent for fungal rice pathogens in Thailand. *World J Microbiol Biotechnol* 25 (11): 1919-1928.

Chaudhary D.K., Khulan A., Kim J. (2019). Development of a novel cultivation technique for uncultured soil bacteria. *Sci Rep* 9: 6666.

Chelo I.M., Ze-Ze L., Tenreiro R. (2007). Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, *ADNA*, *gyrB*, *rpoC* and *ADNK*. *Int J Syst Evol Microbiol* 57: 276-286.

Collado J., Platas G., Paulus B., Bills G.F. (2007). High-throughput culturing of fungi from plant litter by a dilution-to-extinction technique. *FEMS Microbiol Ecol* 60 (3): 521-533.

Collins T.J. (2007). ImageJ for microscopy. *BioTechniques* 43: S25-S30.

Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka E.A. (2005). Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl Environ Microbiol* 71 (9): 4951-4959.

Compant S., Saikkonen K., Mitter B., Campisano A., Blanco J.M. (2016). Soil, plants and endophytes. *Plant Soil* 405: 1-11.

Connon S.A., Giovannoni S.J. (2002). High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates. *Appl Environ Microbiol* 68 (8): 3878-3885.

Danielsson J., Reva O., Meijer J. (2007). Protection of Oilseed Rape (*Brassica napus*) Toward Fungal Pathogens by Strains of Plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens*. *Microb Ecol* 54: 134-140.

Darby C., Cosma C.L., Thomas J.H., Manoil C. (1999). Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (26): 15202-15207.

Davis K.E., Joseph S.J., Janssen P.H. (2005). Effects of growth medium, inoculum size, and incubation time on culturability and isolation of soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* 71 (2): 826-834.

De la Haba R.R., Sánchez-Porro C., Márquez M.C., Ventosa A. (2011). Taxonomy of Halophiles En: *Extremophiles: Halophiles Part 3* Koki Horikoshi (ed). *Extremophiles handbook* Springer. pp. 1-31.

Deketelaere S., Tyvaert L., Franca S.C., Hofte M. (2017). Desirable traits of a good biocontrol agent against *Verticillium* wilt. *Front. Microbiol* 8: 1186.

Del Moral A., Quesada E., Ramos-Cormenzana A. (1987). Distribution and types of bacteria isolated from an island saltern. *Ann Inst Pasteur/Microbiol* 138: 59-66.

D'Onofrio A., Crawford J.M., Stewart E.J., Witt K., Gavrish E., Epstein S., Clardy J., Lewis K. (2010). Siderophores from neighboring organisms promote the growth of uncultured bacteria. *Chem Biol* 17 (3): 254-264.

Doyle J.J., Doyle J.L. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12: 13-15.

Duncan D.B. (1955). Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11: 1-42.

- Dunlap C.A., Bowman M.J., Schisler D.A. (2013).** Genomic analysis and secondary metabolite production in *Bacillus amyloliquefaciens* AS 43.3: a biocontrol antagonist of *Fusarium* head blight. *Biol Control* 64 (2): 166-175.
- Esquivel-Cote R., Gavilanes-Ruiz M., Cruz-Ortega R., Huante P. (2013).** Importancia agrobiotecnológica de la enzima ACC desaminasa en rizobacterias, una revisión. *Rev Fitotec Mex* 36 (3): 251-258.
- Ferragut C., Leclerc H. (1976).** Etude comparative des methodes de determination du Tm de l' ADN bactérien. *Ann Microbiol* 127: 223-235.
- Ferrari B.C., Gillings M.R. (2009).** Cultivation of fastidious bacteria by viability staining and micromanipulation in a soil substrate membrane system. *Appl Environ Microbiol* 75: 3352–3354.
- Ferrer C., Rodriguez-Prats J.L., Abad J.L., Alió J.L. (2004).** Unusual anaerobic bacteria in keratitis after laser in situ keratomileusis: Diagnosis using molecular biology methods. *J Cataract Refract Surg* 30: 1790-1794.
- Fradin E.F., Thomma B. P. (2006).** Physiology and molecular aspects of verticillium wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol Plant Path* 7 (2): 71-86.
- Gauvreau K., Pagano M. (1993).** Student's t test. *Nutrition* 9 (4): 386.
- Gharbi Y., Barkallah M., Bouazizi E., Cheffi M., Gdoura R., Triki M.A. (2016).** Differential fungal colonization and physiological defense responses of new olive cultivars infected by the necrotrophic fungus *Verticillium dahliae*. *Acta Physiol Plant* 38 (10): 242.
- Gharbi Y., Barkallah M., Bouazizi E., Hibar K., Gdoura R., Triki M.A. (2017).** Lignification, phenols accumulation, induction of PR proteins and antioxidant-related enzymes are key factors in the resistance of *Olea europaea* to verticillium wilt of olive. *Acta Physiol Plant* 39 (2): 43.
- Gómez-Lama Cabanás C., Ruano-Rosa D., Legarda G., Pizarro-Tobías P., Valverde-Corredor A., Triviño J.C., Roca, A., Mercado-Blanco J. (2018).** *Bacillales* Members from the Olive Rhizosphere Are Effective Biological Control Agents against the Defoliating Pathotype of *Verticillium dahliae*. *Agriculture* 8: 90.
- Gong A.D., Li H.P., Yuan Q.S., Song X.S., Yao W., He W.J., Zhang J.B., Liao Y.C. (2015).** Antagonistic Mechanism of Iturin A and Plipastatin A from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum* PLoS One 10 (2): e0116871.
- Goris J., Konstantinidis K.T., Klappenbach J.A., Coenye T., Vandamme P., Tiedje J.M. (2007).** DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57(Pt 1):81-91.
- Graf R., Anzali S., Buenger J., Pfluecker F., Driller H. (2008)** The multifunctional role of ectoine as a natural cell protectant. *Clin Dermatol* 26 (4): 326-333.

Green B.D., Keller M. (2006). Capturing the uncultivated majority. *Curr Opin Biotechnol* 17: 236-240.

Guía de gestión integrada de plagas para el cultivo de olivar (2014). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado. <http://publicacionesoficiales.boe.es>. Consultada 30 de octubre de 2019.

Hall T.A. (1999). BioEdit a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41: 95-98.

Hall T.J., Schreiber L.R., Leben C. (1986). Effects of xylemcolonizing *Bacillus* spp. on Verticillium wilt in Maples. *Plant Dis* 70: 521.

Hans G. Trüper. (1999). How to name a prokaryote?: Etymological considerations, proposals and practical advice in prokaryote nomenclature, *FEMS Microbiology Reviews*, 23: 231–249.

Hiraishi A., Kuraishi H., Kawahara K. (2000). Emendation of the description of *Blastomonas natatoria* (Sly 1985) Sly and Cahill 1997 as an aerobic photosynthetic bacterium and reclassification of *Erythromonas ursincola* Yurkov et al. 1997 as *Blastomonas ursincola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50: 1113–1118.

Hiraishi A., Nagashima K.V., Matsuura K., Shimada K., Takaichi S., Wakao N., Katayama Y. (1998). Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 48: 1389-1398.

Hoffman B.M., Lukoyanov D., Yang Z.Y., Dean D.R., Seefeldt L.C. (2014). Mechanism of nitrogen fixation by nitrogenase: the next stage. *Chem Rev* 114 (8): 4041-4062.

Jacques P., Hbid C., Destain J., Razafindralambo H., Paquot M., De Pauw E., Thonart P. (1999). *Appl Biochem Biotechnol* 77: 223.

Janssen P.H. (2008). New cultivation strategies for terrestrial microorganisms. En *Accessing Uncultivated Microorganisms*. Zengler, K., (ed). ASM Press. pp. 173–192.

Janssen P.H., Schuhmann A., Morschel E., Rainey F.A. (1997). Novel anaerobic ultramicrobacteria belonging to the Verrucomicrobiales lineage of bacterial descent isolated by dilution culture from anoxic rice paddy soil. *Appl Environ Microbiol* 63: 1382-1388.

Janssen P.H., Yates P.S., Grinton B.E., Taylor P.M., Sait, M. (2002). Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel numbers of the divisions Acidobacteria, Acidobacteria, Proteobacteria and Verrucomicrobia. *Appl Environ Microbiol* 68: 2391-2396.

Jeyarajan R., Nakkeeran S. (2000). Exploitation of microorganisms and viruses as biocontrol agents for crop disease management. En: *Biocontrol potential and their*

exploitation in sustainable agricultura. Upadhyay RK (ed). Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. pp. 95-116.

Jiang Y., Chen J., Wu Y., Wang Q., Li H. (2016). Sublethal Toxicity Endpoints of Heavy Metals to the Nematode *Caenorhabditis elegans*. PLoS One 11 (1): e0148014.

Jiménez-Díaz R., Castillo-Castillo P., Landa del Castillo B., Montes-Borrego M., Olivares-García C., Palomares-Rius J., Trapero-Casas J., Navas-Cortés J. (2015). Avances en la investigación sobre el control de la verticilosis del olivo. Vida Rural 1: 44-52.

Jiménez-Díaz R.M., Cirulli M., Bubici G., del M.J., Antoniou P.P., Tjamos E.C. (2012). Verticillium wilt, a major threat to olive production: Current status and future prospects for its management. Plant Dis 96 (3): 304-329.

Jiménez-Díaz R.M., Tjamos E.C., Cirulli M. (1998). *Verticillium* wilt in major tree hosts: Olive. En: Compendium of *Verticillium* Wilt in Tree Species. Hiemstra, J. and Harris, D. (ed). Commission of the European Communities. Ponsen & Looijen, Wageningen, The Netherlands. pp.13-16.

Jiménez-Ruiz J., Leyva-Pérez M.O., Schilirò E., Barroso J., Bombarely A., Mueller L., Luque F. (2017). Transcriptomic analysis of *Olea europaea* L. roots during the *Verticillium dahliae* early infection process. Plant genome 10.

Johnson B.T. (2005) Microtox® Acute Toxicity Test. En: Blaise C., Féraud J.F. (eds) Small-scale Freshwater Toxicity Investigations. Springer, Dordrecht.

Joseph S.J., Hugenholtz P., Sangwan P., Osborne C.A., Janssen P.H. (2003). Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. Appl Environ Microbiol 69 (12): 7210-7215.

Jukes T.H., Cantor C.R. (1969). Evolution of protein molecules. En: Mammalian Protein Metabolism. Munro H.N. (ed.), pp. 21-132. Boca Raton: Academic Press.

Kabir Z., Bhat R.G., Subbarao K.V. (2004). Comparison of Media for Recovery of *Verticillium dahliae* from Soil. Plant Dis 88 (1): 49-55.

Kaletta T., Hengartner M.O. (2006). Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. Nat Rev Drug Discov 5 (5): 387-398.

Kalwasińska A., Jankiewicz U., Felföldi T., Burkowska-But A., Brzezinska M.S. (2018). Alkaline and Halophilic Protease Production by *Bacillus luteus* H11 and Its Potential Industrial Applications. Food Technol Biotechnol 56 (4): 553-561.

Kamekura M. (1986). Production and function of enzymes from eubacterial halophiles. FEMS Microbiol Rev 39: 145-150.

Kannoja P., Choudhary K.K., Srivastava A.K., Singh A.K. (2019). PGPR Bioelicitors: Induced Systemic Resistance (ISR) and Proteomic Perspective on Biocontrol. En PGPR Amelioration in Sustainable Agriculture: Food Security and

Environmental Management. Singh A.K., Kumar A., Singh P.K. (eds). Woodhead Publishing. Cambridge, UK. pp. 67-84.

Keykhasaber M., Thomma B.P., Hiemstra J.A. (2018). Verticillium wilt caused by *Verticillium dahliae* in woody plants with emphasis on olive and shade trees. European Journal of Plant Pathology 150 (1): 21-37.

Khan N., Martínez-Hidalgo P., Ice T.A., Maymon M., Humm E.A., Nejat N., Sanders E.R., Kaplan D., Hirsch A.M. (2018). Antifungal Activity of *Bacillus* Species Against *Fusarium* and Analysis of the Potential Mechanisms Used in Biocontrol. Front Microbiol 9: 2363.

Kim K., Kim J.J., Masui R., Kuramitsu S., Sung M.H. (2011). A comensal symbiotic interrelationship for the growth of *Symbiobacterium toebii* with its partner bacterium, *Geobacillus toebii*. BMC Res Notes 4: 437.

Kim Y.O., Kong H.J., Park S., Kang S.J., Kim W.J., Kim K.K., Oh T.K., Yoon J.H. (2012). *Roseovarius halocynthiae* sp. nov., isolated from the sea squirt Halocynthia roretzi. Int J Syst Evol Microbiol 62: 931-936.

Koch I.H., Gich F., Dunfield P.F., Overmann J. (2008). *Edaphobacter modestus* gen. nov., sp. nov., and *Edaphobacter aggregans* sp. nov., acidobacteria isolated from alpine and forest soils. Int J Syst Evol Microbiol 58 (5): 1114-1122.

Kosako Y., Yabuuchi E., Naka T., Fujiwara N., Kobayashi K. (2000). Proposal of *Sphingomonadaceae* fam. nov., consisting of *Sphingomonas* Yabuuchi et al. 1990, *Erythrobacter* Shiba and Shimidu 1982, *Erythromicrobium* Yurkov et al. 1994, *Porphyrobacter* Fuerst et al. 1993, *Zymomonas* Kluyver and van Niel 1936, and *Sandaracinobacter* Yurkov et al. 1997, with the type genus *Sphingomonas* Yabuuchi et al. 1990. Microbiol Immunol 44: 563-575.

Kumar S., Stecher G., Tamura K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol Biol Evol 33 (7): 1870-1874.

Kumari B., Mallick M.A., Solanki M.K., Solanki A.C, Hora A., Guo W. (2019). Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): modern prospects for sustainable agriculture. En: Plant health under biotic stress. Ansari RA, Mahmood I (eds). Springer Singapore, Singapore. pp 109-127.

Kushner D.J. (1985). The Halobacteriaceae. En: The Bacteria. Woese, C.R. & Wolfe, R.S. (eds). London. pp. 171-214.

Kushner DJ, Kamekura M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. En: Halophilic Bacteria, vol. 1, F. Rodriguez-Valera (ed). CRC Press, Boca Raton. pp. 109-138.

Labrenz M., Collins M.D., Lawson P.A., Tindall B.J., Schumann P., Hirsch P. (1999). *Roseovarius tolerans* gen. nov., sp. nov., a budding bacterium with variable bacteriochlorophyll a production from hypersaline Ekho Lake. Int J Syst Bacteriol 49: 137-147.

- Lane D. (1991).** 16S/23S rRNA sequencing. En: Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics. Stackebrandt E., Goodfellow M. (eds). Chichester UK. pp. 115-148.
- Larpent J.P., Larpent-Gourgaud M. (1990).** Mémento technique de Microbiologie. Technique et Documentation-Lavoisier.
- Lattanzio V., Lattanzio V.M., Cardinali A. (2006).** Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry: Advances in Research* 661: 23-67.
- Leadbetter J.R. (2003).** Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr Opin Microbiol* 6: 274-281.
- Leighton T.J. y Doi R.H. (1971).** The stability of messenger ribonucleic acid during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 246 (10): 3189-3195.
- Leung M.C., Williams P.L., Benedetto A., Au C., Helmcke K.J., Aschner M., Meyer J.N. (2008).** *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology. *Toxicol Sci* 106 (1): 5-28.
- Leyva-Pérez M.O., Jiménez-Ruiz J., Gómez-Lama Cabanás C., Valverde-Corredor A., Barroso J.B., Luque F., Mercado-Blanco J. (2018).** Tolerance of olive (*Olea europaea*) cv Frantoio to *Verticillium dahliae* relies on both basal and pathogen-induced differential transcriptomic responses. *New Phytol* 217 (2): 671-686.
- Liu J., NanGong Z., Zhang J., Song P., Tang Y., Gao Y., Wang Q. (2019).** Expression and characterization of two chitinases with synergistic effect and antifungal activity from *Xenorhabdus nematophila*. *World J Microbiol Biotechnol* 35 (7): 106.
- Lloyd K.G., Steen A.D., Ladau J., Yin J., Crosby L. (2018).** Phylogenetically Novel Uncultured Microbial Cells Dominate Earth Microbiomes. *mSystems* 3 (5): e00055-18.
- Lopez-Escudero F.J., del Río C., Caballero J.M., Blanco-Lopez M.A. (2004).** Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 79-85.
- López-Escudero F.J., Mercado-Blanco J. (2011).** *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement an integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil* 344: 1.
- Louden B.C., Haarmann D., Lynne A.M. (2011).** Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *J Microbiol Biol Educ* 12 (1): 51-53.
- Loukas A., Kappas I., Abatzopoulos T.J. (2018).** HaloDom: a new database of halophiles across all life domains. *J Biol Res (Thessalon)* 25: 2. <http://halodom.bio.auth.gr>.
- Luque R., Béjar V., Quesada E., Llamas I. (2014).** Diversity of halophilic bacteria isolated from Rambla Salada, Murcia (Spain). *Can J Microbiol* 60 (12): 839-846.

Ma Y., Galinski E.A., Grant W.D., Oren A., Ventosa A. (2010). Halophiles 2010: life in saline environments. *Appl Environ Microbiol* 76 (21): 6971-681.

Margesin R., Schinner F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles* 5: 73-83.

Markakis E.A., Tjamos S.E., Antoniou P.P., Paplomatas E.J., Tjamos E.C. (2016). Biological control of *Verticillium* wilt of olive by *Paenibacillus alvei*, strain K165. *BioControl* 61: 293-303.

Marmur J. (1961). A Procedure for the Isolation of Deoxyribonucleic Acid from Micro – organismst. *J Mol Biol* 3: 208-218.

Marmur J., Doty P. (1962). Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *J Mol Biol* 5: 109-118.

Martín-Platero A.M., Valdivia E., Maqueda M., Martínez-Bueno M. (2007). Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein "salting-out" procedure. *Anal Biochem* 366 (1): 102-104.

Martos-Moreno C., López Escudero F.J., Blanco-López M.A. (2006). Resistance of Olive Cultivars to the Defoliating Pathotype of *Verticillium dahliae*. *HortScience* 41 (5): 1313-1316.

Maurer K.A., Radišek S., Berg G., Seefelder S. (2013). Real-time PCR assay to detect *Verticillium albo-atrum* and *V. dahliae* in hops: development and comparison with a standard PCR method. *J Plant Dis Prot* 120: 105.

Mercado-Blanco J., Rodríguez-Jurado D., Hervás A., Jiménez-Díaz R.M. (2004). Suppression of *Verticillium* wilt in olive planting stocks by root-associated fluorescent *Pseudomonas* spp. *Biol. Control* 30: 474-486.

Meziane H., Van der Sluis I., Van Loon L.C., Höfte M., Bakker P.A.H.M. (2005). Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Mol Plant Pathol* 6: 177-185.

Moore L.R., Coe A., Erik R., Zinser E.R., Saito M.A., Sullivan M.B., Lindell D., Frois-Moniz K., Waterbury J., Chisholm S.W. (2007). Culturing the marine cyanobacterium *Prochlorococcus*. *Limnol Oceanogr Methods* 5: 353-362.

Morris J.J., Lenski R.E., Zinser E.R. (2012). The Black Queen Hypothesis: evolution of dependencies through adaptive gene loss. *mBio* 3 (2): e00036-12.

Mourey A., Kilbertus G. (1976). Simple media containing stabilized tributyrin for demonstrating lipolytic bacteria in foods and soils. *J Appl Bacteriol* 40 (1): 47-51.

Mulero-Aparicio A., Varo A., Agustí-Brisach C., López-Escudero F.J., Trapero A. (2019). Biological control of *Verticillium* wilt of olive in the field. *J. Crop Prot Article In Press*.

- Navas A., Cobas G., Talavera M., Ayala J.A., López J.A., Martínez J.L. (2007).** Experimental validation of Haldane's hypothesis on the role of infection as an evolutionary force for Metazoans. *Proc Natl Acad Sci USA* 104 (34): 13728-13731.
- Nguyen T.M., Seo C., Ji M., Paik M.J., Myung S.W., Kim J. (2018).** Effective Soil Extraction Method for Cultivating Previously Uncultured Soil Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 84 (24): e01145-18.
- Nichols D. (2007).** Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol Ecol* 60: 351-357.
- Onorati F., Mecozzi M. (2004).** Effects of two diluents in the Microtox toxicity bioassay with marine sediments. *Chemosphere* 54: 679-687.
- Oren A.T (1988).** The microbial ecology of the Dead Sea. En: Marshall KC (Ed.), *Advances in Microbial Ecology*, vol. 10. Plenum Publishing (ed). New York. pp. 193-229.
- Oren A.T (1994).** The ecology of extremely halophilic archaea. *FEMS Microbiol Rev* 13: 415-440.
- Oren A.T (2002a).** Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28 (1): 56-63.
- Oren A.T (2002b).** Halophilic Microorganisms and Their Environments. Cellular origin and life in extreme habitats. Kluwer Academic Publishers (ed). Netherlands. pp. 23-68.
- Oren A.T (2011).** Thermodynamic limits to microbial life at high salt concentrations. *Environ Microbiol* 13:1908–1923.
- Oren A.T. (2008).** Microbial life at high salt concentrations: phylogenetic and metabolic diversity. *Saline Systems* 4: 2.
- Oueriaghli N., Béjar V., Quesada E., Martínez-Checa F. (2013).** Molecular ecology techniques reveal both spatial and temporal variations in the diversity of archaeal communities within the athalassohaline environment of Rambla Salada, Spain. *Microb Ecol* 66 (2): 297-311.
- Oueriaghli N., Castro D.J., Llamas I., Béjar V., Martínez-Checa F. (2018).** Study of Bacterial Community Composition and Correlation of Environmental Variables in Rambla Salada, a Hypersaline Environment in South-Eastern Spain. *Front Microbiol* 9: 1377.
- Oueriaghli N., Martínez-Checa F., Llamas I., Quesada E., Béjar V. (2010).** La diversidad microbiana de los ambiente extremos como fuente de productos de interés biotecnológico. XXIX Congreso internacional de la Sociedad Farmacéutica del Mediterráneo (SFML). Granada.

Owen R.J., Pitcher D. (1985). Current methods for estimating DNA base composition and levels of DNA-DNA hybridization. En: Goodfellow M., Minnikin D.E. (ed.), Chemical Methods in Bacterial systematics. Academic Press, London.

Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T. (1999). The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem* 29: 119-131.

Pedrós-Alió C. (2006). Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol* 14: 257-363.

Pham V.H, Kim J. (2012). Cultivation of unculturable soil bacteria. *Trends Biotechnol* 30(9):475-84.

Pikovskaya R.I. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with the vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya* 17: 362–370.

Plou F.J., Ferrer M., Oscar M. Nuero O.M., Calvo M.V., Alcalde M., Reyes F., Ballesteros A. (1998). Analysis of Tween 80 as an esterase/ lipase substrate for lipolytic activity assay. *Biotechnol Tech* 12 (3): 183-186.

Poonguzhali, S., Madhaiyan, M., Sa, T. (2006). Cultivation-dependent characterization of rhizobacterial communities from field grown Chinese cabbage *Brassica campestris* ssp *pekinensis* and screening of traits for potential plant growth promotion. *Plant Soil* 286: 167.

Prado B., Del Moral A., Quesada E., Ríos R., Monteoliva-Sanchez M., Campos V., Ramos-Cormenzana A. (1991). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram negative rods isolated from the Salar of Atacama, Chile. *Syst Appl Microbiol* 14: 275-281.

Prieto P., Navarro-Raya C., Valverde-Corredor A., Amyotte S.G., Dobinson K.F., Mercado-Blanco J. (2009). Colonization process of olive tissues by *Verticillium dahliae* and its in planta interaction with the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7. *Microb Biotechnol* 2 (4): 499-511.

Quesada E., Ventosa A., Rodríguez-Valera F., Ramos-Cormenzana A. (1982). Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J Appl Bacteriol* 53: 155-161.

Rajagopalan G., Krishnan C. (2008). Alpha-amylase production from catabolite derepressed *Bacillus subtilis* KCC103 utilizing sugarcane bagasse hydrolysate. *Bioresour Technol* 99 (8): 3044-3050.

Rajasabapathy R., Mohandass C., Dastager S.G., Liu Q., Khieu T.N., Son C.K., Li W.J., Colaco A. (2014). *Roseovarius azorensis* sp. nov., isolated from seawater at Espalamarca, Azores. *Antonie van Leeuwenhoek* 105: 571-578.

Ramnath L., Sithole B., Govinden R. (2017). Identification of lipolytic enzymes isolated from bacteria indigenous to *Eucalyptus* wood species for application in the pulping industry. *Biotechnol Rep (Amst)* 15: 114-124.

- Rappe M.S., Connon S.A., Vergin K.L., Giovannoni S.J. (2002).** Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418: 630–633.
- Rappé M.S., Giovannoni S.J. (2003).** The uncultured microbial majority *Annu Rev Microbiol* 57: 369-364.
- Ren L., Chang X., Jiang F., Kan W., Qu Z., Qiu X., Fang C., Peng F. (2015).** *Parablastomonas arctica* gen. nov., sp. nov., isolated from high Arctic glacial till. *Int J Syst Evol Microbiol* 65: 260-266.
- Riemann L., Farnelid H., Steward G.F. (2010).** Nitrogenase genes in non-cyanobacterial plankton: prevalence, diversity and regulation in marine waters. *Aquat Microb Ecol* 61: 235-247.
- Rodríguez-Ruíz J.P. (2018).** Control biológico de *Verticillium dahliae* por bacterias halófilas y aplicaciones en la producción de plantas de interés agrícola. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Granada, Granada, España.
- Rodríguez-Valera F., Ruiz-Berraquero F., Ramos-Cormenzana A. (1981).** Characteristics of the heterotrophic bacterial populations in hypersaline environments of different salt concentrations. *Microb Ecol* 7 (3): 235-243.
- Sait M., Davis K.E., Janssen P.H. (2006).** Effect of pH on isolation and distribution of members of subdivision 1 of the phylum Acidobacteria occurring in soil. *Appl Environ Microbiol* 72 (3): 1852-1857.
- Saitou N., Nei M. (1987).** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.
- Sakai Y., Hayatsu M., Hayano K. (2002).** Use of tween 20 as a substrate for assay of lipase activity in soils. *Soil Sci Plant Nutr* 48 (5): 729-734.
- Sambrook J., Russell D. (2001).** *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schaeffer P., Millet J., Aubert J.P. (1965).** Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 54 (3): 704-711.
- Schulz S., Dickschat J.S. (2007).** Bacterial volatiles: the smell of small organisms. *Nat Prod Rep* 24 (4): 814-842.
- Shafi J., Tian H., Ji M. (2017).** *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: A review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 31 (3): 446-459.
- Sharma S., Singh V., Kumar V., Devi S., Shukla K.P, Tiwari A., Singh J., Bisht S. (2015).** Plant Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR): Emergence and Future Facets in Medicinal Plants. pp. 109-131. En: Egamberdieva D., Shrivastava S., Varma A. (ed). *Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) and Medicinal Plants*. Springer Nature, Switzerland.

- Siddikee M.A., Chauhan P.S., Anandham R., Han G.H., Sa T. (2010).** Isolation, characterization, and use for plant growth promotion under salt stress, of ACC deaminase-producing halotolerant bacteria derived from coast soil. *J Microbiol Biotechnol* 20: 1577-1584.
- Sievers F., Wilm A., Dineen D., Gibson T.J., Karplus K., Li W., Lopez R., McWilliam H., Remmert M., Söding J., Thompson J.D., Higgins D.G. (2011).** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7: 539.
- Siyar S., Inayat N., Hussain F. (2019).** Plant Growth Promoting Rhizobacteria and Plants' Improvement: A Mini-Review. *PSM Biol Res* 4 (1): 1-5.
- Sofo A., Dichio B., Xiloyannis C., Masia A. (2004).** Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Sci* 166 (2): 293-302
- Stella M., Suhaimi M. (2010).** Selection of suitable growth medium for free-living diazotrophs isolated from compost. *J Trop Agric and Fd Sc* 38 (2): 211-219.
- Stevenson B.S., Eichorst S.A., Wertz J.T., Schmidt T.M., Breznak J.A. (2004).** New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol* 70: 4748-4755.
- Stewart E.J. (2012).** Growing unculturable bacteria. *J Bacteriol* 194 (16): 4151-4160.
- Stiernagle T. (2006).** Maintenance of *C. elegans*. *WormBook* 11: 1-11.
- Stingl U., Cho J., Foo W., Vergin K., Lanoil B., Giovannoni S. (2008).** Dilution-to-Extinction Culturing of Psychrotolerant Planktonic Bacteria from Permanently Ice-Covered Lakes in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Microb Ecol* 55 (3): 395-405.
- Tabassum B., Khan A., Tariq M., Ramzan M., Khan M.S.I., Shahid N., Aaliya K. (2017).** Bottlenecks in commercialisation and future prospects of PGPR. *Appl Soil Ecol* 121: 102-117.
- Tan M.W., Rahme L.G., Sternberg J.A., Tompkins R.G., Ausubel F.M. (1999).** *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (5): 2408-2413.
- Tanaka Y., Hanada S., Manome A., Tsuchida T., Kurane R., Nakamura K., Kamagata, Y. (2004).** *Catellibacterium nectarophilum* gen. nov., sp. nov., which requires a diffusible compound from a strain related to the genus *Sphingomonas* for vigorous growth. *Int J Syst Evol Microbiol* 54 (3): 955-959.
- Tiwari S., Prasad V., Lata C. (2019).** *Bacillus*: Plant Growth Promoting Bacteria for Sustainable Agriculture and Environment. En: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Sing J.S (ed). Elsevier. pp. 43–55.

Tjamos E., Jiménez-Díaz R. (1998). Verticillium wilt of major tree hosts: Olive. En: A Compendium of Verticillium Wilt in Tree Species. J.A. Hiemstra y D.C. Harris (ed). The Netherlands. pp. 13-16.

Tjamos E.C., Tsitsigiannis D.I., Tjamos S.E., Antoniou P.P., Katinakis P. (2004). Selection and screening of endorhizosphere bacteria from solarized soils as biocontrol agents against *Verticillium dahliae* of solanaceous hosts. Eur J Plant Pathol 110: 35-44.

Toral L., Rodríguez M., Béjar V., Sampedro I. (2018). Antifungal Activity of Lipopeptides From *Bacillus* XT1 CECT 8661 Against *Botrytis cinerea*. Front Microbiol 9: 1315.

Trapero C., Roca L.F., Moral J., López-Escudero F.J., Blanco-López M.A. (2009). Enfermedades del olivo. Phytoma 209: 18-24.

Trujillo M. (2014). Método para evaluar la actividad antifúngica en medio líquido. Comunicación personal al grupo de Investigación Bio188 de la Universidad de Granada.

Tukey John. (1949). Comparing Individual Means in the Analysis of Variance. Biometrics. 5 (2): 99-114.

Tukey multiple comparisons test was performed using GraphPad Prism version 8.2.1 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA. www.graphpad.com

Vallad G.E., Subbarao K.V. (2008). Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*. Phytopathology: 98 (8): 871-885.

Van-Thuoc D., Guzmán H., Quillaguamán J., Hatti-Kaul R. (2010). High productivity of ectoines by *Halomonas boliviensis* using a combined two-step fed-batch culture and milking process. J Biotechnol 147 (1): 46-51.

Varo A., Raya-Ortega M.C., Trapero A. (2016). Selection and evaluation of microorganisms for biocontrol of *Verticillium dahliae* in olive. J Appl Microbiol 121 (3): 767-777.

Vartoukian S.R., Palmer R.M., Wade W.G. (2010). Strategies for culture of 'unculturable' bacteria. FEMS Lett 309: 1-7.

Velasco J., Millán A., Hernandez J., Gutierrez C., Abellan P., Sanchez D., Ruiz M. (2006). Response of biotic communities to salinity changes in a Mediterranean hypersaline stream. Saline Systems 2: 12.

Ventosa A. (2010). Microbiología de los ambientes acuáticos hipersalinos. Actualidad Sociedad Española de Microbiología SEM 50: 24-26.

Ventosa A., Arahal D.R. (2002). Physico-Chemical characteristics of hypersaline environments and their biodiversity. Encyclopedia of life support system. Eolss Publishers Co. Ltd, Paris. pp. 10020-10031.

Ventosa A., Logan N.A., Lappin-Scott H.M., Oyston P.C.F. (2006). Unusual micro-organisms from unusual habitats: hypersaline environments. En: Prokaryotic diversity mechanism and significance. Cambridge University Press (ed). London. pp. 223-254.

Ventosa A., Mellado E., Sánchez-Porro C., Márquez M.C. (2008). Halophilic and halotolerant micro-organisms from soils. En: Microbiology of extreme soils. P. Dion, C.S Nautiyal (eds.). Springer-Verlag, Berlin. pp. 87-115.

Ventosa A., Nieto J.J., Oren A. (1998). Biology of moderately halophilic aerobic bacteria. Microbiol Mol Biol Rev 62 (2): 504-544.

Ventosa A., Quesada F., Rodríguez F.V., Ruiz B.Q.F., Ramos C.A. (1982). Numerical taxonomy of moderately gram negative rods. J Gen Microbiol 128: 1959-1968.

Vera H., Power D. (1980). Culture media. En: Manual of clinical microbiology. Lennette E.H., Ballows A., Housler W.J. Jr, Shadomy H.J. (ed). pp. 965-999.

Vera-Gargallo B., Chowdhury T.R., Brown J., Fansler S.J., Durán-Viseras A., Sánchez-Porro C., Bailey V.L., Jansson J.K., Ventosa A. (2019). Spatial distribution of prokaryotic communities in hypersaline soils. Sci Rep 9 (1): 1769.

Vílchez J.I., Navas A., González-López J., Arcos S.C., Manzanera M. (2016). Biosafety Test for Plant Growth-Promoting Bacteria: Proposed Environmental and Human Safety Index (EHSI) Protocol Front Microbiol 6: 1514.

Villalba L.S., Mikan J.F., Sánchez J. (2004). Actividades hidrolíticas y caracterización isoenzimáticas de poblaciones microbianas aisladas del patrimonio documental en el Archivo General de Colombia. Nova Publicación Científica 2 (2): 50-57.

Volpon L., Besson F Lancelin J.M. (2000). NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A2. FEBS Lett 485 (1): 76-80.

Vreeland R.H. (1993). Taxonomy of halophilic bacteria p. 105-134. En: The biology of halophilic bacteria. Vreeland R.H y Hochstein L.I (ed). CRC Press, Boca Raton, Florida.

Wang B., Tianfeng T., Zongze S. (2009). *Roseovarius pacificus* sp. nov., isolated from deep-sea sediment. Int J Syst Evol Microbiol 59: 1116-1121.

Ward D.M., Weller R., Bateson M.M. (1990). 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. Nature 345 (6270): 63-65.

Waterston R., Sulston J. (1995). The genome of *Caenorhabditis elegans*. Proc Natl Acad Sci USA 92 (24): 10836-10840.

- Whipps J.M. (2001).** Microbial Interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* 52: 487-511.
- Williams P.L. y Dusenbery D.B. (1990).** Aquatic toxicity testing using the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem* 9: 1285-1290.
- Wu Y., Cheng C., Li Y. (2009).** Cloning and expression of chitinase A from *Serratia marcescens* for large-scale preparation of N,N- diacetyl chitobiose. *J Chinese Chem Soc* 56: 688-695.
- Xiao N., Liu Y., Liu X., Gu Z., Jiao N. Liu H., Zhou Y., Shen L. (2015).** *Blastomonas aquatica* sp. nov., a bacteriochlorophyll-containing bacterium isolated from lake water. *Int J Syst Evol Microbiol* 65: 1653-1658.
- Yabuuchi E., Fujiwara N., Kosako Y., Kobayashi K., Ogura H., Kobayashi K. (2002).** Emendation of the genus *Sphingomonas* Yabuuchi et al. 1990 and junior objective synonymy of the species of three genera, *Sphingobium*, *Novosphingobium* and *Sphingopyxis*, in conjunction with *Blastomonas ursincola*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 1485-1496.
- Yang W., Zheng L., Liu H.X., Wang K.B, Yu Y.Y., Luo Y.M., Guo J.H. (2014).** Evaluation of the effectiveness of a consortium of three plant-growth promoting rhizobacteria for biocontrol of cotton *Verticillium* wilt, *Biocontrol Science and Technology*, 24:5, 489-502.
- Yoon S.H., Ha S.M., Kwon S., Lim J., Kim Y., Seo H., Chun J. (2017).** Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int J Syst Evol Microbiol* 67: 1613-1617.
- Yurkov V., Stackebrandt E., Buss O., Vermeglio A., Gorlenko V. Beatty J.T. (1997).** Reorganization of the genus *Erythromicrobium*: description of '*Erythromicrobium sibiricum*' as *Sandaracinobacter sibiricus* gen. nov., sp. nov., and of '*Erythromicrobium ursincola*' as *Erythromonas ursincola* gen. nov., sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47: 1172–1178.
- Zengler K., Toledo G., Rappe M., Elkins J., Mathur E.J., Short J.M., Keller M. (2002).** Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (24): 15681-15686.
- Zhang Y., Fan T., Jia W., Zhang W.F., Liu Q., Li B. (2012).** Identification and characterization of a *Bacillus subtilis* strain TS06 as bio-control agent of strawberry replant disease (*Fusarium* and *Verticillium* wilts). *Afr. J. Biotechnol.* 11: 570-580.