

# The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity

## El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola

María Fernanda Villarreal-Delgado, Eber Daniel Villa-Rodríguez, Luis Alberto Cira-Chávez, María Isabel Estrada-Alvarado, Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro CP. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México; Fannie Isela Parra-Cota, Campo Experimental Norman E. Borlaug, CP. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México; Sergio de los Santos-Villalobos\*, CONACYT-Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro CP. 85000, Ciudad Obregón, Sonora, México. \*Autor para correspondencia: sergio.delossantos@itson.edu.mx.

Recibido: 30 de Junio, 2017.

Aceptado: 15 de Diciembre, 2017.

Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, De los Santos-Villalobos S. 2017. The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 95-130.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1706-5

Primera publicación DOI: 03 de Enero, 2018.

First DOI publication: January 03, 2018.

**Resumen.** El género *Bacillus* se encuentra ampliamente distribuido en los agro-sistemas y una de sus principales aplicaciones es el control de enfermedades de cultivos agrícolas. En la presente revisión se describe y analiza al género *Bacillus*, y sus principales mecanismos de acción, tales como la excreción de antibióticos, toxinas, sideróforos, enzimas líticas e induciendo la resistencia sistémica,

**Abstract.** The genus *Bacillus* is widely distributed in agro-systems, being one of its main applications the control of diseases in agricultural crops. The present review describes and analyzes the genus *Bacillus*, and its main mechanisms of action, such the excretion of antibiotics, toxins, siderophores, lytic enzymes and Induced systemic resistance, focused on its ability to be used as biocontrol agent of pests and diseases in plants; as well as its use in formulations of biopesticides, which have been incorporated into Integrated Pest Management programs. In addition, the *Bacillus* genus is analyzed in terms of agricultural biosecurity, as well as the principal criteria for the effective selection of biocontrol agents, considering strains not pathogenic to humans, and that do not negatively impact the microbial communities of agro-ecosystems, as a side-effect by its non-specific biological activity against a particular plant pathogen.

enfocado en su capacidad para ser utilizado como agente de control biológico de plagas y enfermedades en plantas; así como su uso en la formulación de bioplaguicidas, que han sido incorporados a los programas de Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades. Además, se analiza el uso del género *Bacillus* en la agricultura bajo un enfoque de bioseguridad agrícola, así como los principales criterios indispensables de selección de agentes de control biológico promisorios, considerando cepas no patogénicas para el ser humano, y que no impacten negativamente a las comunidades microbianas de los agro-ecosistemas, como efecto secundario por su actividad biológica no específica contra un fitopatógeno en particular.

**Palabras clave:** biocontrol, fitopatógenos, bioplaguicidas.

La agricultura representa una actividad determinante en el desarrollo económico, social y ambiental del mundo, ya que contribuye con el 80% de los alimentos que se consumen (FAO, 2014). Sin embargo, aproximadamente entre el 20 y 30% de la producción agrícola anual es afectada por plagas y enfermedades, siendo los hongos, bacterias, nematodos, virus e insectos los principales agentes causales (Pérez-García *et al.*, 2011). De esta manera, con el objetivo de combatir las enfermedades en los cultivos agrícolas se han utilizado ampliamente diversos compuestos químicos tales como: insecticidas, fungicidas y nematicidas. No obstante, el éxito de la aplicación de estos compuestos en el incremento de la productividad agrícola mundial, su uso excesivo ha impactado negativamente los suelos, ecosistemas y la salud humana, *i.e.* el captan, fungicida utilizado en México, cuyo uso se ha prohibido en otros países por su efecto cancerígeno (Arellano-Aguilar y Rendón, 2016).

**Key words:** biocontrol, phytopathogens, biopesticides.

Agriculture is a decisive activity in worldwide economic, social and environmental development, since it contributes to 80% of the food consumed globally (FAO, 2014). However, approximately 20 to 30% of the agricultural production is affected by pests and diseases, with fungi, bacteria, nematodes, viruses and insects being the main causal agents (Pérez-García *et al.*, 2011). In this way, in order to fight diseases in crops, chemical compounds have been widely used, including insecticides, fungicides and nematicides. However, despite the success in the application of these compounds in the increase of worldwide agricultural activity, their excessive use has had a negative impact on soils, ecosystems and human health, *i.e.* captan, a fungicide used in Mexico, the use of which has been prohibited in other countries due to its carcinogenic effect (Arellano-Aguilar and Rendón, 2016).

On the other hand, the incidence of pests and diseases can be minimized by the use of cultural practices such as crop rotation and the system of planting in separate plots; however, these are not entirely efficient (Sainju *et al.*, 2016). Thus, the Integrated Pest and Disease Management (IPDM) is a crucial alternative in the development of a sustainable agriculture that guarantees global food security, which uses the combination of biological, cultural and chemical methods in a compatible way (from Olivar *et al.*, 2008). The IPDM highlights the use of biological control agents (BCA) as a sustainable alternative to mitigate the negative effects in the productivity and quality of the crops caused by different diseases, reducing the resistance of phytopathogenic organisms, and reducing the contamination of soils and water tables. This helps produce innocuous foods and reduces the costs of agricultural production (Reyes *et al.*, 2015).

Por otra parte, la incidencia de plagas y enfermedades puede ser minimizada por el uso de prácticas culturales, por ejemplo, la rotación de cultivos y el sistema de siembra por parcelas separadas; sin embargo, éstas no son completamente eficientes (Sainju *et al.*, 2016). Así, el Manejo Integrado de Plagas y Enfermedades (MIPE) es una alternativa indispensable en el desarrollo de una agricultura sustentable que garantiza la seguridad alimentaria global, en el cual se utiliza la combinación de métodos biológicos, culturales y químicos de forma compatible (de Olivar *et al.*, 2008). En el MIPE se destaca el uso de agentes de control biológico (ACB) como una alternativa sustentable para mitigar los efectos negativos en la productividad y calidad de los cultivos agrícolas causada por distintas enfermedades, disminuyendo la resistencia de los organismos fitopatógenos, y reduciendo la contaminación de los suelos y mantos acuíferos. Lo cual permite la producción de alimentos inocuos y disminuye los costos de producción agrícola (Reyes *et al.*, 2015).

El uso de ACB inició a principios del siglo XIX, utilizando organismos vivos o sus metabolitos para mitigar las enfermedades en cultivos agrícolas (Badii *et al.*, 2000). En las últimas décadas, se ha descrito el efecto que ejerce una gran diversidad de microorganismos rizosféricos en el control de organismos fitopatógenos, ya que la rizósfera representa la primera línea de defensa de la planta contra organismos fitopatógenos edáficos, evitando así el establecimiento de éstos en la raíz (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Lo anterior ha conducido al estudio de múltiples mecanismos utilizados por los ACB para controlar el crecimiento, desarrollo e infección de organismos fitopatógenos en diversos cultivos agrícolas de importancia económica, entre estos mecanismos destacan: a) mecanismos de contacto como, hiperparasitismo y predación (Chen *et al.*, 2016); b) la producción de compuestos de

The use of BCA began in the early 19th Century, using live organisms or their metabolites to mitigate diseases in agricultural crops (Badii *et al.*, 2000). In recent decades, the effect of a large diversity of rhizospheric microorganisms in the control of phytopathogenic organisms has been reported, since the rhizosphere represents the first line of defense of the plant against edaphic phytopathogenic organisms, thus avoiding their establishment in the roots (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). This has led to the study of multiple mechanisms used by the BCA to control the growth, development and infection of phytopathogenic organisms in diverse economically important crops; some of the most important of these mechanisms include: a) contact mechanisms such as hyperparasitism and predation (Chen *et al.*, 2016); b) the production of compounds with low molecular weights with a direct effect on the growth of the antibiotic pathogen (phenazines, 2,4-diacetylfluoroglucinol, cyclic lipopeptides), lytic enzymes (chitinases, glucanases, proteases), products of unregulated residues (ammonia, carbon dioxide, hydroxide cyanide) (Yan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016; Jaaffar *et al.*, 2017; Piechulla *et al.*, 2017) and c) indirect mechanisms from the competition for space and nutrients (consumption of leached-exudates, production of siderophores, induction to the systemic response in plants through the production of phytohormones and molecular patterns) (Pal and Gardener, 2006; Yu *et al.*, 2011; Chowdhury *et al.*, 2015). These action mechanisms have been observed in the microbial strains used as BCA, in which the *Bacillus* genus has been widely studied due to its high abundance and diversity in agro-systems (soil, water and plant), with a significantly higher population in comparison to other microbial genera, and also due to its diverse metabolic capabilities, with an outstanding capability to produce antibiotics and other antimicrobial and antifungal metabolites

bajo peso molecular con efecto directo sobre el crecimiento del patógeno antibióticos (fenazinas, 2,4-diacetilfloroglucinol, lipopéptidos cíclicos), enzimas líticas (quitinasas, glucanasas, proteasas), productos de residuos no regulados (amoníaco, dióxido de carbono, cianuro de hidróxido) (Yan *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2016; Jaaffar *et al.*, 2017; Piechulla *et al.*, 2017) y c) mecanismos indirectos por competencia de espacio y nutrientes (consumo de lixiviados-exudados, producción de sideróforos, inducción a la respuesta sistémica en plantas mediante la producción de fitohormonas y patrones moleculares) (Pal y Gardener, 2006; Yu *et al.*, 2011; Chowdhury *et al.*, 2015). Estos mecanismos de acción han sido observados en las cepas microbianas utilizadas como ACB, entre las cuales el género *Bacillus* ha sido ampliamente estudiado debido a su alta abundancia y diversidad en los agro-sistemas (suelo, agua y planta), siendo significativamente mayor su población en comparación a otros géneros microbianos, y además por sus diversas capacidades metabólicas, destacando su capacidad para producir antibióticos y otros metabolitos antimicrobianos y antifúngicos (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Por ejemplo, diversos estudios moleculares han revelado que un porcentaje significativo del genoma de cepas del género *Bacillus* está relacionado con la producción de metabolitos secundarios asociados al control de fitopatógenos, *i.e.* el 8.5 y 4% del genoma de las cepas *B. amyloliquefaciens* FZB42 y *B. subtilis* 168, respectivamente (Raaijmakers y Mazzola, 2012). Esto justifica el amplio uso de cepas de este género bacteriano como ACB para el control de enfermedades que afectan los cultivos agrícolas. Sin embargo, la eficiencia de cepas sin riesgos a la bioseguridad del género *Bacillus* utilizadas como ACB es maximizada por su introducción efectiva al agro-sistema, induciendo sus mecanismos de control biológico. Así, la presente revisión se centra en analizar y discutir el

(Tejera-Hernández *et al.*, 2011). For example, several molecular studies have revealed that a significant percentage of the genome of strains of the *Bacillus* genus is related to the production of secondary metabolites related to the control of phytopathogens, *i.e.* 8.5 and 4% of the genome of strains *B. amyloliquefaciens* FZB42 and *B. subtilis* 168, respectively (Raaijmakers and Mazzola, 2012). This justifies the wide use of strains of this bacterial genus as BCA for the control of diseases that affect agricultural crops. However, the efficiency of strains without risks to the biosecurity of the *Bacillus* genus used as BCA is maximized by their effective introduction to the agro-system, inducing their biological control mechanisms. Therefore, this study focuses on the analysis and discussion of the *Bacillus* genus, its main action mechanisms against plant diseases, as well as its implementation, without risks to biosafety with the development of biopesticides, since the scientific foundation of these bioproducts on its action mechanisms, environmental and biosafety implications, and the formulation of biopesticides are decisive for the development of a sustainable agriculture.

## The *Bacillus* genus

### Classification

The *Bacillus* genus was first reported by Cohn (1872), who described it as heat-resistant, endospore-producing bacteria. The species of *Bacillus* belong to the bacteria kingdom; Phylum Firmicutes; Class Bacilli; Order Bacillales and Family Bacillaceae (Maughan and van der Auwera, 2011). Currently, the genus includes over 336 species, which, because of their genetic similarity, can be classified into different groups, the most important of which are a) the group of *B. cereus*,

género *Bacillus*, sus principales mecanismos de acción contra enfermedades en plantas, así como su implementación, sin riesgos a la bioseguridad, mediante el desarrollo de bioplaguicidas, ya que el sustento científico de estos bioproductos sobre sus mecanismos de acción, implicaciones ecológicas, de bioseguridad, y la formulación de los bioplaguicidas son determinantes para el desarrollo de una agricultura sustentable.

## El género *Bacillus*

### Clasificación

El género *Bacillus* fue reportado por primera vez por Cohn (1872), quien lo describió como bacterias productoras de endosporas resistentes al calor. Las especies de *Bacillus* pertenecen al Reino Bacteria; Filo Firmicutes; Clase Bacilli; Orden Bacillales y Familia Bacillaceae (Maughan y van der Auwera, 2011). Actualmente, el género incluye más de 336 especies, las cuales por su similitud genética pueden clasificarse en distintos grupos, siendo los más destacados: a) el grupo de *B. cereus*, asociado a patogenicidad, que incluye a *B. cereus-anthraxis-thuringiensis*; b) los bacilos ambientales que son caracterizados por su presencia en distintos hábitats, como el grupo de *Bacillus subtilis*, comprendido por *B. subtilis-licheniformis-pumilus*; c) el grupo de *B. clausii-halodurans*; y d) el grupo que incluye a *Bacillus* sp. NRRLB-14911-*coahuilensis* (Alcaraz *et al.*, 2010; LPSN, 2016).

### Ecología

Las especies de *Bacillus* se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial debido a su habilidad para formar endosporas, característica que les confiere resistencia y potencia su aislamiento en diversos hábitats, tanto ecosistemas acuáticos

related to pathogenicity, which includes *B. cereus-anthraxis-thuringiensis*; b) the environmental bacilli, which are characteristically present in different habitats, such as the group of *Bacillus subtilis*, composed of *B. subtilis-licheniformis-pumilus*; c) the group of *B. clausii-halodurans*; and d) the group that includes *Bacillus* sp. NRRLB-14911-*coahuilensis* (Alcaraz *et al.*, 2010; LPSN, 2016).

### Ecology

The *Bacillus* species are widely distributed worldwide due to their ability to form endospores, a characteristic that provides them with resistance and boosts its isolation in several habitats, both water and terrestrial ecosystems, and even in environments under extreme conditions (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). However, soils are considered the main reservoir of this bacterial genus, since most *Bacillus* species are saprophytic and are able to use the large diversity of organic substrates in the soil, making this a complex matrix for the establishment of a large genetic and functional diversity of microbial species (McSpadden, 2004). For this reason, the multiple *Bacillus* species can grow in soil, the cultivable counts are found in the range of log 3 to log 6 per gram of fresh weight of soil, essentially in genetically similar species to the group of *B. subtilis* and *B. cereus* (Vargas-Ayala *et al.*, 2000). Regardless of rRNA studies in soil contradicting the relative abundance of cultivable and un-cultivable species of this bacterial genus (Kumar *et al.*, 2011).

Under a focus aimed at agricultural sustainability, few investigations have aimed at understanding the specific population diversity and dynamics of *Bacillus* in rhizospheric soils, in which the bacterial communities that inhabit the rhizosphere respond particularly to the soil fertility

como terrestres, e incluso en ambientes bajo condiciones extremas (Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Sin embargo, el suelo es considerado el principal reservorio de este género bacteriano, debido a que la mayoría de especies de *Bacillus* son saprófitas pudiendo utilizar la gran diversidad de sustratos orgánicos presentes en el suelo, siendo ésta una matriz compleja para el establecimiento de una gran diversidad genética y funcional de especies microbianas (McSpadden, 2004). Por lo cual, múltiples especies de *Bacillus* pueden desarrollarse en los suelos, cuyos recuentos cultivables se encuentra en el intervalo de log 3 a log 6 por gramo de peso fresco de suelo, esencialmente en especies similares genéticamente al grupo de *B. subtilis* y *B. cereus* (Vargas-Ayala *et al.*, 2000). No obstante que estudios de ARNr en suelo contradicen la abundancia relativa de especies cultivables y no cultivables de este género bacteriano (Kumar *et al.*, 2011).

Bajo un enfoque dirigido a la sustentabilidad agrícola se han realizado escasas investigaciones con el objetivo de comprender la diversidad y dinámica poblacional específica de *Bacillus* en suelos rizosféricos, donde las comunidades bacterianas que habitan la rizósfera responden particularmente a la fertilidad del suelo y los exudados de las raíces de las plantas, los cuales varían con la fenología y genotipo vegetal (de Souza *et al.*, 2015), por lo que bacterias que interaccionen con las plantas y presenten capacidades asociativas, endofíticas o procesos simbióticos para adaptarse a las condiciones rizosféricas son reconocidas como potenciales inoculantes microbianos. Rudrappa *et al.* (2008) reportaron que la producción de biopelículas de *B. subtilis* FB17 es un mecanismo de colonización rizosférica, esto debido a su atracción por el ácido L-málico secretado por las raíces de *Arabidopsis thaliana* e inducido por el patógeno foliar *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. Por otra parte, Kumar *et al.* (2011), López-Fernández *et al.* (2016) y

and the exudates of plant roots, which vary with the phenology and genotype of the plant (de Souza *et al.*, 2015), and therefore bacteria that interact with plants and present associative or endophytic capacities, or symbiotic processes to adapt to the rhizospheric conditions are acknowledged as potential microbial inoculants. Rudrappa *et al.* (2008) reported that the production of *B. subtilis* FB17 biofilm is a rhizosphere colonization mechanism, due to its attraction to the L-malic acid secreted by the roots of *Arabidopsis thaliana* and induced by the foliar pathogen *Pseudomonas syringae* pv *tomato*. On the other hand, Kumar *et al.* (2011), López-Fernández *et al.* (2016) and Selim *et al.* (2016) point out that diverse species of *Bacillus* may reside in internal tissues of grape (*Vitis vinifera*) and cotton plants (*Gossypium barbadense* L). These characteristics play a crucial role in the development, colonization and function of *Bacillus*, stimulating their relationship with the host plant, the biological control characteristics of which are strengthened.

### Main characteristics

Some of the main characteristics of the *Bacillus* genus are its optional aerobic or sometimes anaerobic growth, Gram-positive, bacillary morphology, flagellar motility, and variable size (0.5 to 10 µm), its optimal growth being in a neutral pH, with a wide interval of growth temperatures, although most species are mesophilic (temperature between 30 and 45 °C), its metabolic diversity related to the promotion of plant growth and control of pathogens (Tejera-Hernández *et al.*, 2011); other features that stand out are its capacity to produce endospores (oval or cylindrical) as a mechanism of resistance to diverse types of stress (Calvo and Zúñiga, 2010; Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011) (Figure 1).

Selim *et al.* (2016) señalan que diversas especies de *Bacillus* pueden ser residentes de tejidos internos en plantas de uva (*Vitis vinífera*) y algodón (*Gossypium barbadense* L). Estas características tienen un papel determinante en el desarrollo, colonización y función de *Bacillus* estimulando su asociación con la planta hospedera, cuyas características de control biológico son potenciadas.

### Principales características

Entre las características del género *Bacillus* destaca su crecimiento aerobio o en ocasiones anaerobio facultativo, Gram positivas, morfología bacilar, movilidad flagelar, y tamaño variable (0.5 a 10 µm), su crecimiento óptimo ocurre a pH neutro, presentando un amplio intervalo de temperaturas de crecimiento, aunque la mayoría de las especies son mesófilas (temperatura entre 30 y 45 °C), su diversidad metabólica asociada a la promoción del crecimiento vegetal y control de patógenos (Tejera-Hernández *et al.*, 2011); además destaca su capacidad de producir endosporas (ovales o cilíndricas) como mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés (Calvo y Zúñiga, 2010; Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011) (Figura 1).

La presencia de endosporas le confiere al género de *Bacillus* su capacidad de diseminación y prevalencia en los ecosistemas, éstas se forman durante su segunda fase del ciclo de vida, el cual se encuentra conformado por una fase de crecimiento vegetativo y una fase de esporulación (Figura 2). Durante la primera etapa, la bacteria crece de forma exponencial mediante fisión binaria, ya que se encuentra en un medio con las condiciones favorables para su desarrollo. La segunda fase comienza como una estrategia de supervivencia en presencia de algún tipo de estrés (alta densidad de población, escasez de nutrientes, factores externos como salinidad, temperatura, pH, entre otros), así la célula

The presence of endospores confers the *Bacillus* genus its capacity to spread and its prevalence in ecosystems. These form during the second phase of its life cycle, which is composed of a phase of vegetative growth and a phase of sporulation (Figure 2). During the first stage, the bacteria grows exponentially by binary fission, since it is found in a medium with favorable conditions for its growth. The second phase begins as a strategy for survival in the presence of some type of stress (high population density, lack of nutrients, external factors such as salinity, temperature, pH, and others). In this way, the vegetative cell begins the formation of the endospore, which implies an asymmetric cell division, giving way to the formation of two compartments: a mother cell and the immersion of a prespore. Later, the prespore is swallowed, forming a cell within the mother cell. During the later stages, the prespore is covered by protective layers (protein components, peptidoglycan and a wall that resides below it formed by germ cells), followed by the dehydration and the final maturation of the prespore. Finally, the mother cell is lysed by programmed cell death, releasing the endospore. The endospore can remain viable in the environment until the conditions become favorable to begin their metabolic processes and generate a vegetative cell (Errington 2003; Tejera-Hernández *et al.*, 2011; CALS; 2016). Due to this, the formation of endospores resistant to heat and desiccation is an important characteristic for the formulation of biotechnological products based on strains of this bacterial genus (Pérez-García *et al.*, 2011).

### The *Bacillus* genus as a Biological Control Agent

Large diversity of species of the *Bacillus* genus have proven to have antagonistic activity against diverse phytopathogenic microorganisms in agricultural crops, such as maize, rice, fruit

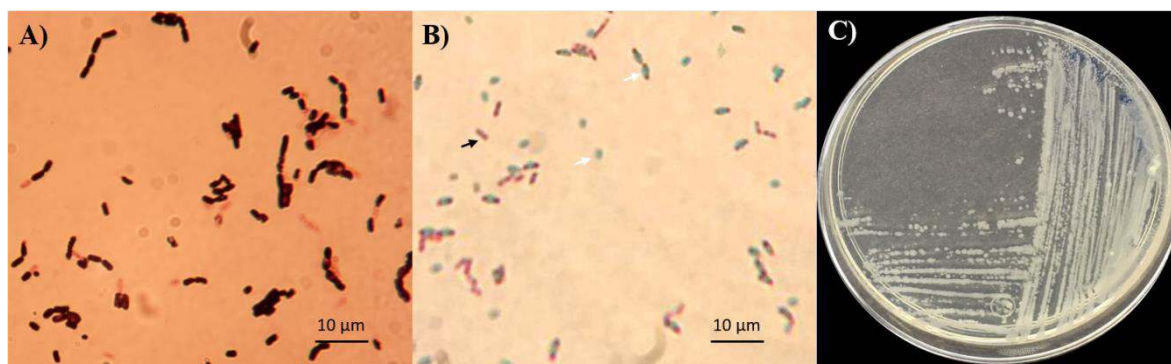


Figura 1. Características morfológicas de *Bacillus* sp. TE3 perteneciente a la Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativo ([www.itson.edu.mx/COLMENA](http://www.itson.edu.mx/COLMENA)). A) Células bacilares, Gram positivas; B) endosporas (flecha blanca) y células bacilares (flecha negra); y C) morfología macroscópica de la cepa TE3.

Figure 1. Morphological characteristics of *Bacillus* sp. TE3 belonging to the Collection of Native Edaphic and Endophytic Microorganisms ([www.itson.edu.mx/COLMENA](http://www.itson.edu.mx/COLMENA)). A) Bacillary cells, Gram positive; B) endospores (white arrow) and bacillary cells (black arrow); and C) macroscopic morphology of strain TE3.

vegetativa inicia la formación de la endospora, lo cual implica la división celular asimétrica, dando lugar a la formación de dos compartimentos, célula

trees, and others (Wang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). The study of this ability of *Bacillus* began with the discovery of insecticidal activity of Cry

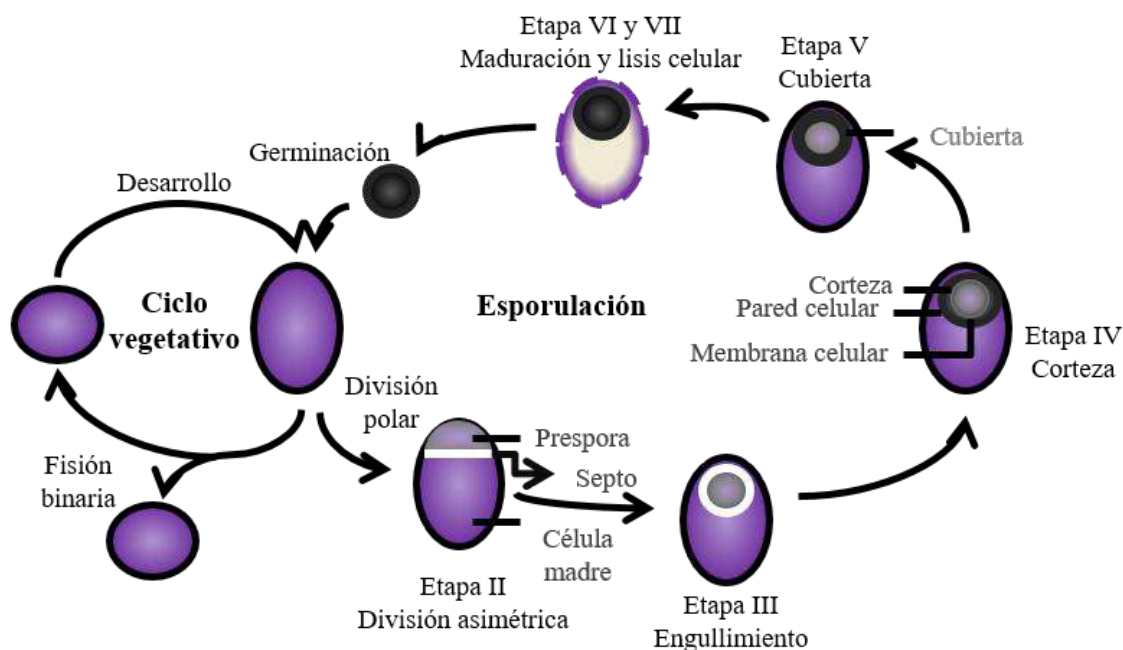


Figura 2. Ciclo de reproducción del género *Bacillus*. Modificado de Errigton, (2003).  
Figure 2. Reproduction cycle of the genus *Bacillus*. Modified from Errigton, (2003).



madre y la inmersión de una preespora. Posteriormente, la preespora es engullida, formando una célula dentro de la célula madre. Durante las etapas posteriores, la preespora es recubierta de capas protectoras (componentes proteicos, peptidoglicano y una pared que reside debajo de ésta, formada por células germinales), seguido de la deshidratación, y la maduración final de la preespora. Finalmente, la célula madre se lisa mediante muerte celular programada, liberando la endospora. La endospora puede permanecer viable en el ambiente hasta que las condiciones son favorables para iniciar sus procesos metabólicos y generar una célula vegetativa (Errington 2003; Tejera-Hernández *et al.*, 2011; CALS; 2016). Por lo anterior, la formación de endosporas resistentes al calor y desecación es una característica de importancia para la formulación de productos biotecnológicos a base de cepas de este género bacteriano (Pérez-García *et al.*, 2011).

### **El género *Bacillus* como Agente de Control Biológico**

Una gran diversidad de especies del género *Bacillus* han demostrado tener actividad antagónica contra diversos microorganismos fitopatógenos de cultivos agrícolas, tales como maíz, arroz, frutales, entre otros (Wang *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015). El estudio de esta capacidad de *Bacillus* se inició por el descubrimiento de la actividad insecticida de las proteínas Cry producidas por *B. thuringiensis*; en la actualidad diversas especies del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. licheniformis*) son ampliamente estudiadas para mitigar la incidencia de enfermedades de importancia agrícola (Raaijmakers y Mazzola, 2012). Entre las principales vías por las cuales estas cepas evitan el establecimiento y desarrollo de organismos fitopatógenos es a través de diferentes mecanismos, que incluyen A) la excreción

proteínas producidas por *B. thuringiensis*; actualmente, varias especies del género *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyloliquefaciens* and *B. licheniformis*) are widely studied to mitigate the incidence of diseases of importance to agriculture (Raaijmakers and Mazzola, 2012). Some of the main ways in which these strains avoid the establishment and development of phytopathogenic organisms is through different mechanisms, which include A) the excretion of antibiotics, B) siderophores, C) lytic enzymes, D) toxins and E) inducing the systemic resistance of the plant (ISR) (Figure 3) (Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

### **Main mechanisms of biological control of the *Bacillus* genus**

#### **Production of lipopeptides**

One of the most important characteristics of the *Bacillus* genus is its capacity to produce a large variety of antibiotics capable of inhibiting the growth of phytopathogenic agents, including non-ribosomal cyclic peptides, which have been the most widely studied. Lipopeptides (LPs) structurally consist of a cyclic peptide joined to a chain of  $\beta$ -hydroxy or  $\beta$ -amino fatty acids (Figure 4-A), classified into 3 different families (iturines, fengicines and surfactines), according to their amino acid sequences and length of the fatty acid (Ongena and Jaques, 2008; Falardeau *et al.*, 2013). These molecules are synthesized by multienzymatic complexes, known as nonribosomal peptide synthetase (NRPS), which are independent to messenger RNA (Chowdhury *et al.*, 2015). The families of iturines, fengicines and surfactines have been widely studied for their antibacterial and antifungal activity (Meena and Kanwar, 2015). The antimicrobial activity of these LPs occurs because of their interaction with the cytoplasmic membrane

de antibióticos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D) toxinas y E) induciendo la resistencia sistémica de la planta (IRS) (Figura 3) (Layton *et al.*, 2011; Tejera-Hernández *et al.*, 2011).

### Principales mecanismos de control biológico del género *Bacillus*

#### Producción de lipopéptidos

Una de las características más importantes del género *Bacillus* es su capacidad de producir una gran variedad de antibióticos con capacidad de inhibir el crecimiento de agentes fitopatógenos, entre éstos, los lipopéptidos cíclicos no ribosomales han sido los más estudiados. Los lipopéptidos (LPs), estructuralmente consisten en un péptido cíclico unido a una cadena de ácido graso  $\beta$ -hidroxi o  $\beta$ -amino (Figura 4-A), clasificándose en 3 diferentes familias (iturinas, fengicinas y surfactinas), de acuerdo con su secuencia de aminoácidos y longitud del ácido graso (Ongena y Jaques, 2008; Falardeau *et al.*, 2013). Estas moléculas

of bacterial or fungal cells, causing the formation of pores and an osmotic imbalance, which triggers the cell death of the phytopathogenic microorganisms (Figure 4-B) (Aranda *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2006). However, recent reports claim that some lipopeptides can have multiple action mechanisms, altering cell processes such as intracellular calcium homeostasis, energetic metabolism and RNA processing (Zhang *et al.*, 2016).

The role of the LPs has become evident in the growth inhibition in phytopathogenic microorganisms. Touré *et al.* (2004) identified several isoforms of lipopeptides in extracts produced from liquid cultures of *B. subtilis* GA1. Later, in a test for co-inoculation of strains GA1 and *Botrytis cinerea* in apple fruits, they identified the presence of fengicines and iturines in inhibitory concentrations, showing the activity of these lipopeptides *in-situ*. Likewise, genetic expression and mutagenesis analyses have contributed significantly to the understanding the role of lipopeptides in the microbial activity of the *Bacillus* genus against phytopathogenic microorganisms

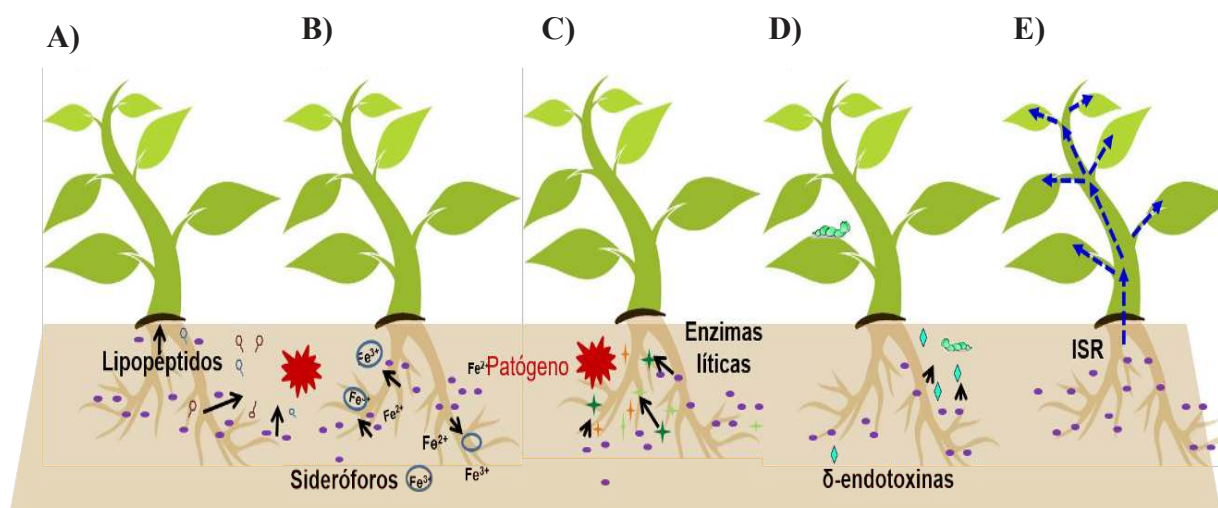
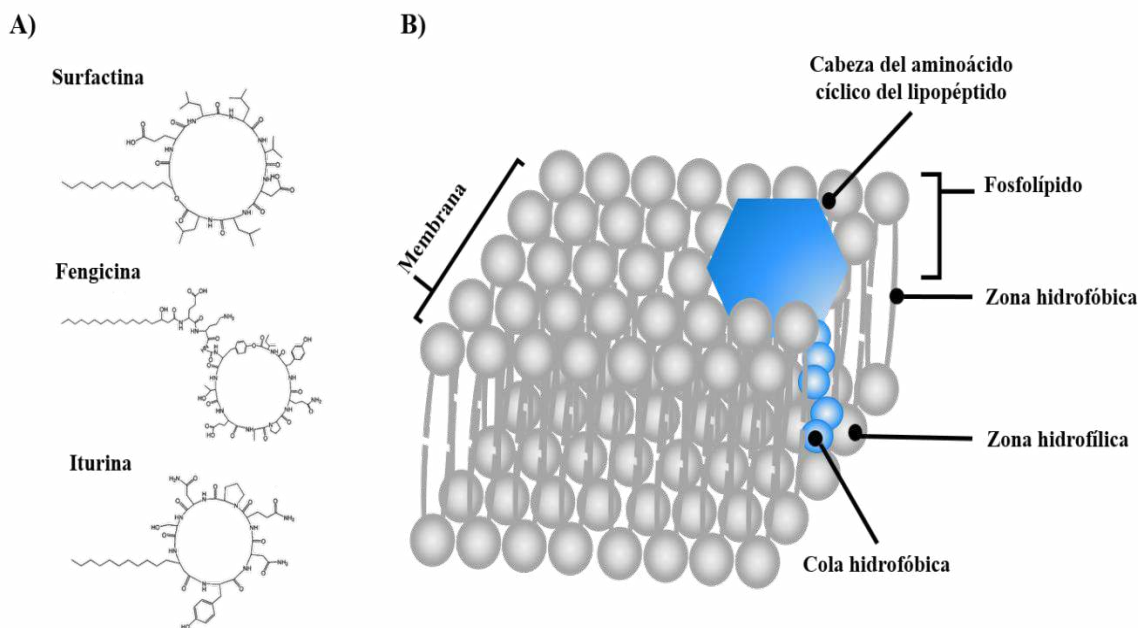


Figura 3. Principales mecanismos de control biológico del género *Bacillus*. Producción de A) lipopéptidos, B) sideróforos, C) enzimas líticas, D)  $\delta$ -endotoxinas, E) inducción a la respuesta sistémica.

Figure 3. Main biological control mechanisms of the genus *Bacillus*. Production of A) lipopeptides, B) siderophores, C) lytic enzymes, D)  $\delta$ -endotoxins, E) induction to the systemic response.



**Figura 4. Los lipopéptidos como metabolitos involucrados en el control biológico de fitopatógenos. A) Representantes de las familias de lipopéptidos, B) Mecanismo de acción de los lipopéptidos. Modificado de Ongena y Jaques (2008); Bayer (2016).**

**Figure 4. Lipopeptides as metabolites involved in the biological control of plant pathogens. A) Representatives of the family of lipopeptides, B) Action mechanism of lipopeptides. Modified from Ongena and Jaques (2008); Bayer (2016).**

son sintetizadas por complejos multi-enzimáticos, conocidos como sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS del inglés, nonribosomal peptide synthetase), las cuales son independientes del RNA mensajero (Chowdhury *et al.*, 2015). Las familias de las iturinas, fengicinas y surfactinas, han sido ampliamente estudiadas por su actividad antibacteriana y antifúngica (Meena y Kanwar, 2015). La actividad antimicrobiana de estos LPs tiene lugar por su interacción con la membrana citoplasmática de células bacterianas o fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos (Figura 4-B) (Aranda *et al.*, 2005; Gong *et al.*, 2006). Sin embargo, recientemente se ha reportado que algunos lipopéptidos pueden tener múltiples mecanismos de acción, al-

(Xu *et al.*, 2013). For example, Li *et al.* (2014) mutated the gene of the phosphopantetheine transferase (*sfp*) in the strain SQR9 of *B. amyloliquefaciens*, crucial for the functioning of non-ribosomal peptide synthetase (NRPS), and therefore the synthesis of lipopeptides. This mutation resulted in a phenotype lacking antifungal activity against diverse agriculturally important phytopathogens, including *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Phytophthora parasitica*. The efficient control of diseases by the biological control agents requires these to be able to establish in, and interact with, their host plant (Pérez-García *et al.*, 2011). Likewise, along with antibiosis, lipopeptides have an influence on the establishment of *Bacillus* with the regulation of

terando procesos celulares como homeostasis intracelular de calcio, metabolismo energético y procesamiento del RNA (Zhang *et al.*, 2016). El papel de los LPs se ha evidenciado en la inhibición del crecimiento de microorganismos fitopatógenos. Touré *et al.* (2004) identificaron múltiples isoformas de lipopéptidos en extractos generados a partir de cultivos líquidos de *B. subtilis* GA1. Posteriormente, en un ensayo de co-inoculación de la cepa GA1 y *Botrytis cinerea* en frutos de manzano, identificaron la presencia de fengicinas e iturinas en concentraciones inhibitorias, demostrando la actividad de estos lipopéptidos *in-situ*. Además, análisis de expresión génica y mutagénesis dirigida han contribuido de manera significativa a comprender el papel de los lipopéptidos en la actividad antimicrobiana del género *Bacillus* contra microorganismos fitopatógenos (Xu *et al.*, 2013). Por ejemplo, Li *et al.* (2014) mutaron el gen de la fosfopanteteína transferasa (*spf*) en la cepa SQR9 de *B. amyloliquefaciens*, indispensable en el funcionamiento de sintetasas de péptidos no ribosomales (NRPS), y por tanto de la síntesis de lipopéptidos. Dicha mutación resultó en un fenotipo carente de actividad antifúngica contra diversos fitopatógenos de importancia agrícola, incluyendo *Verticillium dahliae*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Phytophthora parasitica*.

El control eficiente de enfermedades por parte de los agentes de control biológico requiere que éstos sean capaces de establecerse e interactuar con su planta hospedera (Pérez-García *et al.*, 2011). Así, además de la antibiosis, los lipopéptidos influyen en el establecimiento de *Bacillus* mediante la regulación de procesos celulares como motilidad y formación de biopelículas (Choudhary y Jhori, 2009; Xu *et al.*, 2013). Esto último ha sido observado en la mutante de *B. subtilis* 6051 deficiente en la producción de surfactinas, observándose la formación de una biopelícula irregular durante la

cell processes such as motility and the formation of biofilms (Choudhary and Jhori, 2009; Xu *et al.*, 2013). The latter has been observed in the mutant of *B. subtilis* 6051, deficient in the production of surfactines, producing an irregular biofilm during colonization, as well as the reduction in its capacity to control infections caused by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* in *Arabidopsis thaliana* (Bais *et al.*, 2004). Similarly, the role of lipopeptides in the motility of *Bacillus* has been proven with the study of deficient mutants in the production of lipopeptides, *i.e.* *Bacillus subtilis* 168 deficient of the gen *spf* gene, displayed a loss in motility in semi-solid agar, although it was restored when purified lipopeptides were added to the culture medium (Kinsinger *et al.*, 2003). Due to the role of the lipopeptides in several cell processes (antibiosis, formation of biofilms and motility), its isolated study on the motility *in situ* of *Bacillus* is complex.

Despite lipopeptides not being the only metabolites of the antibiome of the *Bacillus* genus involved in the biological control of phytopathogens, they have been proposed as the most efficient metabolites for this biological activity, due to its ecological role and antimicrobial capability, which explains their use in the search and selection of promissory BCA of this genus (Cawoy *et al.*, 2015; Mora *et al.*, 2015).

### Production of lytic enzymes

The production of enzymes involved in the degradation of the cell wall of phytopathogenic agents is one of the most widely reported biological control mechanisms, in particular against pathogens of fungal origins. The fungal cell is made up of glycoproteins, polysaccharides and other components that vary according to the fungal species (Bowman and Free, 2006). The fraction

colonización, así como la disminución de su capacidad para controlar infecciones causadas por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en *Arabidopsis thaliana* (Bais *et al.*, 2004). De manera similar, el papel de los lipopéptidos en la motilidad de *Bacillus* ha sido demostrado mediante el estudio de mutantes deficientes en la producción de lipopéptidos, *i.e.* *Bacillus subtilis* 168 deficiente del gen *sfp*, mostró pérdida de la motilidad en agar semi-sólido, sin embargo, ésta fue restablecida cuando lipopéptidos purificados fueron agregados al medio de cultivo (Kinsinger *et al.*, 2003). Debido al papel de los lipopéptidos en múltiples procesos celulares (antibiosis, formación de biopelículas y motilidad), su estudio aislado sobre la motilidad *in situ* de *Bacillus* es complejo.

No obstante que los lipopéptidos no son los únicos metabolitos del antibioma del género *Bacillus* involucrados en el control biológico de fitopatógenos, éstos han sido propuestos como los metabolitos más eficientes para esta actividad biológica debido a su papel ecológico y capacidad antimicrobiana, por lo cual se han utilizado para la búsqueda y selección de ACB promisorios de este género (Cawoy *et al.*, 2015; Mora *et al.*, 2015).

### Producción de enzimas líticas

La producción de enzimas involucradas en la degradación de la pared celular de agentes fitopatógenos es uno de los mecanismos de control biológico más reportados, especialmente contra patógenos de origen fúngico. La pared celular de hongos está conformada por glicoproteínas, polisacáridos y otros componentes que varían según la especie fúngica (Bowman y Free, 2006). La fracción de polisacáridos puede comprender hasta un 80% de la pared celular de hongos, encontrándose principalmente quitina (~ 10 – 20%) y glucano (~ 50 – 60%), los cuales están compuestos por residuos de beta-1,3-glucosa y beta-1,4-N-acetilglucosamina,

of polysaccharides can comprise up to 80% of the cell wall of fungi, particularly chitin (~ 10 – 20%) and glucane (~ 50 – 60%), which are composed of residues of beta-1,3-glucose and beta-1,4-N-acetylglucosamine, respectively (Bowman and Free, 2006; Latgé, 2007). These polymers play a crucial role in the firmness of the cell wall by a wide network of glycosidic bonds. Therefore, the interference in these bonds can deteriorate the cell wall of phytopathogenic fungi, causing their lysis and cell death.

The production of lytic enzymes such as chitinases (EC 3.2.1.14) and  $\beta$ -glucanases (EC 3.2.1.6 and EC 3.2.1.39) excreted by the BCA, including the *Bacillus* genus, have displayed an inhibitory effect against pathogens of fungal origins (Compant *et al.*, 2005). These enzymes are responsible for the degradation of the main polysaccharides that make up the cell wall of the fungi, by the hydrolysis of their glycosidic bonds (Figure 5). There are currently diverse scientific studies that report the role of these enzymes in the *in vitro* antifungal activities obtained from strains of the *Bacillus* genus (Kishore *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010; Shafi *et al.*, 2017). For example, Yan *et al.* (2011) demonstrated the role a chitinase in the control of *Rhizoctonia solani* by *B. subtilis* SL-13, evaluating the inhibitory activity of the purified enzyme, confronted with this pathogen. Chien-Jui *et al.* (2004) cloned the gene *chiCW* of *B. cereus* 28-9 on *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  and showed that the purified products presented a high inhibitory activity in the germination of *Botrytis elliptica* spores. Likewise, Martínez-Absalón *et al.* (2014) observed that when placing liquid *B. thuringiensis* UM96 supernatants in the specific inhibitor of chitinases, alosamidine, they lost their ability to inhibit the growth of *Botrytis cinerea*, thus showing the importance of chitinases on the biological control activity of the strain. Similarly, different authors have reported  $\beta$ -glucanases as important

respectivamente (Bowman y Free, 2006; Latgé, 2007). Estos polímeros tienen un papel estructural determinante en la rigidez de la pared celular, mediante una red extensa de enlaces glucosídicos. Así, la interferencia en estos enlaces puede deteriorar la pared celular de hongos fitopatógenos, provocando su lisis y muerte celular.

La producción de enzimas líticas como quitinasas (EC 3.2.1.14) y  $\beta$ -glucanasas (EC 3.2.1.6 y EC 3.2.1.39) excretadas por los ACB, incluyendo al género *Bacillus*, han mostrado un efecto inhibitorio contra patógenos de origen fúngico (Compant *et al.*, 2005). Estas enzimas son responsables de la degradación de los principales polisacáridos que conforma la pared celular de hongos, mediante la hidrólisis de sus enlaces glucosídicos (Figura 5). Actualmente, existen diversos estudios científicos que reportan el papel de estas enzimas en la actividad antifúngica *in vitro* obtenidas de cepas del género *Bacillus* (Kishore *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010; Shafi *et al.*, 2017). Por ejemplo, Yan *et al.* (2011) demostraron el papel de una quitinasa en el control de *Rhizoctonia solani* por *B. subtilis* SL-13, evaluando la actividad inhibitoria de la enzima purificada y confrontada contra dicho patógeno. Chien-Jui *et al.* (2004) clonaron el gen *chiCW* de *B.*

components in the activity for the biological control strains of the *Bacillus* genus; Aktuganov *et al.* (2007), reported that  $\beta$ -1,3-glucanases are the main lytic enzymes involved in the *in vitro* control of *Bipolaris sorokiniana* by *Bacillus* sp. 739, and in studies with *B. amyloliquefaciens* MET0908, with the aid of scanning electronic microscopy, the lytic activity of a  $\beta$ -1,3-glucanases on the *Colletotrichum lagenarium* hyphae was observed. Also, genetic engineering studies focused on the increase of antifungal activity of *Bacillus* strains have successfully achieved the insertion of codifying genes into lytic enzymes, such as gene *ChiA* of *B. subtilis* F29-3 in *B. circulans*, obtaining a more aggressive phenotype against *Botrytis elliptica* (Chen *et al.*, 2004). In addition, Zhang *et al.* (2012) significantly increased the antifungal activity of *Burkholderia vietnamiensis* P418 in the face of different fungal phytopathogens by the chromosomal insertion of the gene *Chi113*, from a *B. Subtilis* strain.

#### Production of siderophores

Iron (Fe) is an essential nutrient for important cell functions, such as in redox reactions of proteins

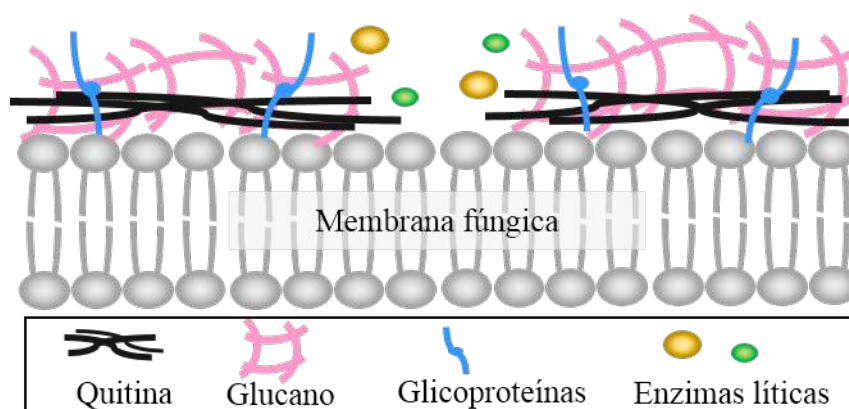


Figura 5. Degradación de la pared celular de hongos fitopatógenos por enzimas líticas. Modificado de Moebius *et al.* (2014).  
Figure 5. Degradation of the cell walls of plant pathogenic fungi by lytic enzymes. Modified from Moebius *et al.* (2014).

*cereus* 28-9 en *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y demostraron que los productos purificados presentaron una alta actividad inhibitoria en la germinación de esporas de *Botrytis elliptica*. Así también, Martínez-Absalón *et al.* (2014) observaron que al someter sobrenadantes líquidos de *B. thuringiensis* UM96 al inhibidor específico de quitinasas, alosamidina, éstos perdieron la capacidad de inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea*, evidenciando la importancia de las quitinasas en la actividad de control biológico de dicha cepa. De manera similar, diferentes autores han reportado a las  $\beta$ -glucanasas como componentes importantes en la actividad control biológico de cepas del género *Bacillus*; Aktuganov *et al.* (2007), reportaron que las  $\beta$ -1,3-glucanasas son las principales enzimas líticas involucradas en el control *in vitro* de *Bipolaris sorokiniana* por *Bacillus* sp. 739, y en estudios con *B. amyloliquefaciens* MET0908 se evidenció a través de microscopía electrónica de barrido la actividad lítica de una  $\beta$ -1,3-glucanasas sobre las hifas de *Colletotrichum lagenarium*. Además, estudios de ingeniería genética enfocados a incrementar la actividad antifúngica de cepas de *Bacillus* han logrado exitosamente la inserción de genes codificantes a enzimas líticas, tal como el gen *ChiA* de *B. subtilis* F29-3 en *B. circulans*, obteniendo un fenotipo más agresivo contra *Botrytis elliptica* (Chen *et al.*, 2004). Además, Zhang *et al.* (2012) incrementaron significativamente la actividad antifúngica de *Burkholderia vietnamiensis* P418 frente a diferentes fitopatógenos fúngicos mediante la inserción cromosómica de gen *Chi113*, proveniente de una cepa de *B. subtilis*.

### Producción de sideróforos

El hierro (Fe) es un nutriente esencial para importantes funciones celulares, tales como en las reacciones redox de las proteínas con cofactores (Fe-S), en la cadena de transporte de electrones, y

with cofactors (Fe-S), in the electron transportation chain, and catalyzing vital enzyme reactions, such as those involving hydrogen, oxygen and nitrogen (Faraldo-Gómez and Sansom, 2003). Fe is found in nature mostly in a ferric form (Fe<sup>3+</sup>) with a low solubility, making its use impossible for some live beings (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). In response to the iron restriction in the environment, some microorganisms have developed diverse receptor protein structures with low molecular weights and high affinity to iron, called siderophores, facilitating the capturing of Fe<sup>3+</sup> (Thyagarajan *et al.*, 2017). Siderophores are secondary metabolites that act as iron sequestrants or chelators, as a consequence of their high dissociation constant due to this metal, fluctuating between 10<sup>22</sup> and 10<sup>55</sup>. This allows for the formation of Fe<sup>3+</sup>-siderophore complexes, so siderophore-producing microorganisms, using a specific receptor located in the membrane, can use it using two mechanisms: 1) directly with the Fe<sup>3+</sup>-siderophore complex through the cell membrane, or 2) reducing extracellularly to Fe<sup>2+</sup> complexes (Neilands, 1995) (Figure 6-A). Siderophores, based on their main chelating group, are classified into: hydroxamates (using hydroxamic acids), catecholates (containing catechol rings), carboxylates, phenolates, and in a combination of two or more of these groups (Wilson *et al.*, 2016) (Figure 6-B). A wide diversity of strains with the capacity of biological control belonging to the *Bacillus* genus have shown the ability to synthesize siderophores, regulating the concentration of iron in the medium through its chelation (Fe<sup>3+</sup>-siderophore), causing this metal to become unavailable for pathogenic microorganisms, which depend highly on this element for growth (Scharf *et al.*, 2014). On the other hand, the formation of such complexes does not affect the development of the plants, since most of them can grow in lower iron concentrations than required by these

catalizando reacciones enzimáticas vitales, como aquellas en las que se encuentra involucrado el hidrógeno, oxígeno y nitrógeno (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003). El Fe es encontrado en la naturaleza mayormente en forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) de baja solubilidad, imposibilitando su uso por algunos seres vivos (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012). En respuesta a la restricción de hierro en el ambiente algunos microorganismos han desarrollado diversas estructuras proteicas receptoras, de bajo peso molecular y con alta afinidad por el hierro, llamadas sideróforos, facilitando la captación de  $\text{Fe}^{3+}$  (Thyagarajan *et al.*, 2017). Los sideróforos son metabolitos secundarios que actúan como secuestrantes o quelantes de hierro, consecuencia de su elevada constante de disociación por este metal, oscilando entre  $10^{22}$  y  $10^{55}$ . Lo cual permite la formación de complejos  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo, así los microorganismos productores de sideróforos, mediante un receptor específico localizado en la membrana, pueden utilizarlo por dos mecanismos: 1) directamente mediante el complejo  $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo a través de la membrana celular, o 2) reducido extracelularmente a complejos  $\text{Fe}^{2+}$  (Neilands, 1995) (Figura 6-A). Los sideróforos en función de su principal grupo quelante se clasifican en: hidroxamatos (utilizando ácidos hidroxámicos), catecolatos (conteniendo anillos catecol), carboxilatos, fenolatos, y en combinación de dos o más de estos grupos (Wilson *et al.*, 2016) (Figura 6-B). Una amplia diversidad de cepas con capacidad de control biológico pertenecientes al género *Bacillus* han mostrado la capacidad de sintetizar sideróforos, regulando la concentración de hierro en el medio a través de su quelación ( $\text{Fe}^{3+}$ -sideróforo), ocasionando que este metal no se encuentre disponible para microorganismos patógenos, cuyo crecimiento es altamente dependiente de este elemento (Scharf *et al.*, 2014). Por otra parte, la formación de dichos complejos no afecta el desarrollo de las plantas, la mayoría de ellas pueden

biological control agents; likewise, some plants have the ability to use these microbial complexes, increasing their bioavailability to this element (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012).

In this way, several species of the *Bacillus* genus have been reported for their ability to control plant diseases by the secretion of siderophores, limiting the growth and colonization of iron-dependent phytopathogenic microorganisms (Fgaier and Eberl, 2011). Yu *et al.* (2011) showed, in co-culture tests in chrome azurol sulfonate (CAS) agar slides that *B. subtilis* CAS15 strongly antagonized the growth of 15 pathogenic fungi belonging to the genera of *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Pythium*, *Magnaporthe* and *Phytophthora*, with inhibition rates in the interval of 19 to 94%, attributing this effect to the catecholate siderophores (Bacillibactin), identified by ESI-MS and DHB. Similarly, May *et al.* (2001) reported the potential of strains of the *Bacillus* genus on the production of siderophores by the analysis of genes involved in the synthesis of Bacillibactin (BB), particularly in *B. subtilis*, observing that the mutant strain JJM405 in gene *dhb*, presented a limited production of BB, while ATCC21332 (wild strain) presented a higher production of this siderophore.

### Production of $\delta$ -endotoxins

$\delta$ -endotoxins, produced particularly by *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), are protein parasporal bodies made up of polypeptide units of different molecular weights, from 27 to 140 kDa. There are currently 300 reported holotypes of *Bt* toxins, classified into 73 Cry and 3 Cyt families (Porcar and Juárez, 2004; Xu *et al.*, 2014). *Bt* toxins are produced during the sporulation phase; the Cry (crystal) protein is known for its toxic effects in an objective organism (most belong to the order of insects); likewise, Cyt (cytolytic) protein has been related to toxic



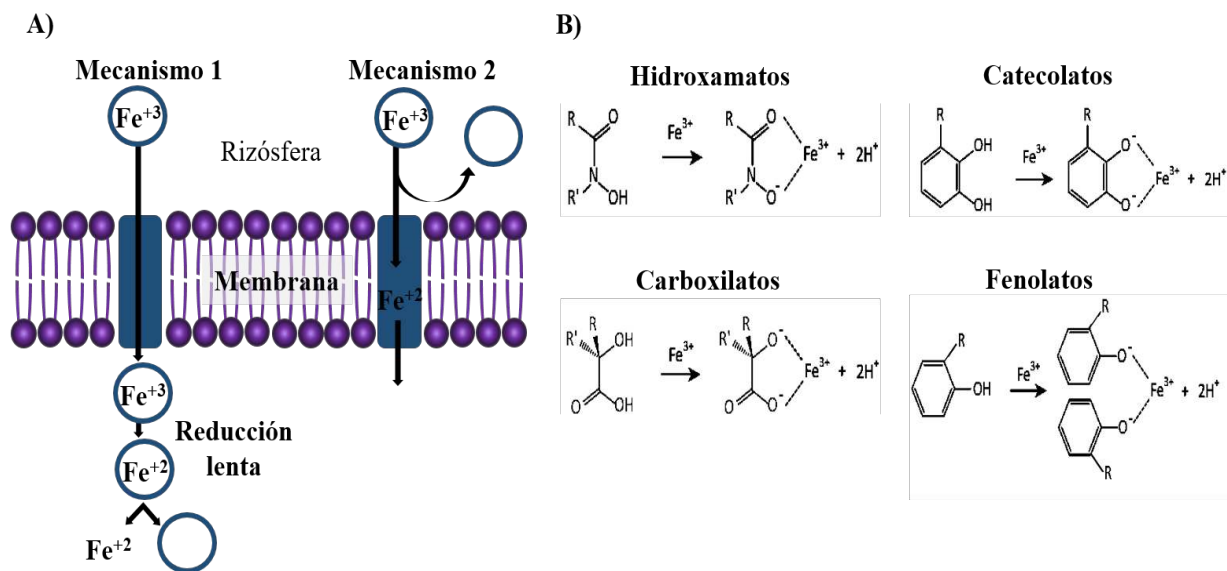


Figura 6. Los sideróforos como mecanismo de inhibición a fitopatógenos. A) Captura y solubilización de hierro, B) principales estructuras quelantes de los sideróforos. Modificado de Neilands (1995); Wilson *et al.* (2016).

Figure 6. Siderophores as a mechanism for the inhibition of plant pathogens. A) Capture and solubilization of iron, B) main chelating structures of siderophores. Modified from Neilands (1995); Wilson *et al.* (2016).

crecer en concentraciones de hierro inferiores que aquellas requeridas por estos agentes de control biológico, así mismo algunas plantas presentan la capacidad de aprovechar estos complejos microbianos, incrementando su biodisponibilidad a este elemento (Aguado-Santacruz *et al.*, 2012).

Así, diversas especies de género *Bacillus* han sido reportadas por su capacidad para controlar enfermedades de plantas mediante la secreción de sideróforos, limitando el crecimiento y colonización de microorganismos fitopatógenos dependientes de hierro (Fgaier y Eberl, 2011). Yu *et al.* (2011) demostraron en ensayos de co-cultivo en placas de agar cromo azurol sulfonato (CAS) que *B. subtilis* CAS15 antagonizó fuertemente el crecimiento de 15 patógenos fúngicos, pertenecientes a los géneros de *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Pythium*, *Magnaporthe* y *Phytophthora*, con tasas de inhibición que se ubicaron en el intervalo de 19 a 94%, atribuyendo

effects on a large variety of insects, particularly diptera; however, its cytotoxicity has been tested on mammal cells (Soberón and Bravo, 2007).

Cry proteins are widely used for their efficiency in the biological control of insects, the action mechanism of which begins once the Cry proteins are processed proteolytically through proteases present in the host's middle intestine, separating a section of amino acids in the N-terminal region and in the C-terminal end (depending on the nature of the Cry protein), thus releasing active and toxic fragments that interact with the receptor proteins present in the intestine cells (Figure 7). These fragments are acknowledged by specific receptors in the membrane and inserted through the cadherin (1), giving rise to a series of signals for the formation of a pre-porous oligomeric structure (2-3), and consequently lytic porous (4), which triggers an osmotic imbalance, which destroys the

este efecto a sideróforos de tipo catecolato (Bacillibactina), identificado por ESI-MS y DHB. De forma similar, May *et al.* (2001) reportaron el potencial de cepas del género *Bacillus* sobre la producción de sideróforos mediante el análisis de genes involucrados en la síntesis de Bacillibactina (BB), particularmente en *B. subtilis*, observando que la cepa mutante JJM405 en el gen *dhb*, presentó una limitada producción de BB, mientras ATCC21332 (cepa silvestre) presentó una mayor producción de este sideróforo.

### Producción de $\delta$ -endotoxinas

Las  $\delta$ -endotoxinas, producidas particularmente por *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), son cuerpos paraesporales proteicos conformados por unidades polipeptídicas de diferentes pesos moleculares, desde 27 a 140 kDa. Actualmente se han reportado 300 holotipos de toxinas *Bt*, clasificándose en 73 familias Cry, y 3 Cyt (Porcar y Juárez, 2004; Xu *et al.*, 2014). Las toxinas *Bt* son producidas durante la fase de esporulación, la proteína Cry (cristal) es conocida por sus efectos tóxicos específicos en un organismo objetivo (la mayoría pertenece al orden de los insectos), así mismo las proteínas Cyt (citólítica) han sido relacionadas con efectos tóxicos sobre una gran variedad de insectos, principalmente dípteros; sin embargo, también se ha comprobado su citotoxicidad contra células de mamíferos (Soberón y Bravo, 2007).

Las proteínas Cry se encuentran ampliamente utilizadas por su eficacia en el control biológico de insectos, cuyo mecanismo de acción inicia una vez que las proteínas Cry son procesadas proteolíticamente a través de proteasas presentes en el intestino medio del huésped, separando una sección de aminoácidos en la región N-terminal y en el extremo C-terminal (dependiendo de la naturaleza de la proteína Cry), liberando así fragmentos activos y tóxicos que interactúan con las proteínas receptoras

intestinal epithelium and the consequent cell death (5) (Portela-Dussán *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014). Several authors have reported the potential of Cry proteins in the toxicity of agriculturally important pests. For example, Niedmann and Meza-Basso (2006) point out that the tomato leafminer (*Tuta absoluta*) causes losses of between 60 and 100% of the crops that are not treated with insecticides, thus showing the potential of *Bt*, highlighting that in tests run on tomato leaves with added Cry protein concentrates extracted from strains LM-11, LM-12, LM-14 and LM-33 of *Bt*, mortality was reduced to between 20 and 60% of the *T. Absoluta* larvae, which would suggest the reduction in losses of up to 12 and 60%. On the other hand, Vázquez-Ramírez *et al.* (2015) highlight the prevailing role *Bt* strains can take against the pest of the fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), on biotests carried out with Cry protein extracts obtained from strains LBIT-13, LBIT-44, LBIT-383, LBIT-418 and LBIT-428 of *Bt*, showed that they all had a toxic effect on the fall armyworm, although strains LBIT-13 and LBIT-418 showed a high toxicity towards *S. frugiperda*, with  $CL_{50}$  of 137.2 and 197.2 ng cm<sup>-2</sup>, respectively, in comparison with the commercial standard HD-1 ( $CL_{50}$  of 142 ng cm<sup>-2</sup>).

### Induced systemic response

Throughout evolutionary history, plants have developed mechanisms to defend themselves against the invasion of pathogenic organisms (bacteria, fungi, nematodes, insects, etc.). These mechanisms are latent and are activated by stimuli during the interaction with pathogenic agents. In general terms, these mechanisms are known as systemic acquired resistance (SAR) and become activated, not only in the site of the infection, but systemically in other tissues (Pieterse *et al.*, 2014).

SAR is activated by stimuli perceived mainly by two receptors, the PRRs (pattern recognition

presentes en células intestinales (Figura 7). Estos fragmentos son reconocidos por receptores específicos en la membrana e insertados a través de la caderina (1), dando sucesión a una serie de señales para la formación de una estructura oligomérica pre-poro (2-3) y consecuentemente el poro lítico (4), por el cual se efectúa un desequilibrio osmótico, que finalmente destruye el epitelio intestinal y en consiguiente la muerte celular (5) (Portela-Dussán *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2014).

Diversos autores han reportado el potencial de las proteínas Cry en la toxicidad de plagas de importancia agrícola. Por ejemplo, Niedmann y Meza-Basso (2006) señalan que la polilla del tomate (*Tuta absoluta*) ocasiona pérdidas de un 60 al 100% de los cultivos que no son tratados con insecticidas, con ello, demuestran el potencial de *Bt* destacando que en ensayos en hojas de tomate adicionadas con concentrados de proteínas Cry extraídas de las cepas LM-11, LM-12, LM-14 y LM-33 de *Bt*, se logró la mortalidad entre un 20 y 60% de las larvas de *T. absoluta*, lo cual sugeriría la disminución de las pérdidas en un 12 y 60%. Por otra parte, Vázquez-Ramírez *et al.* (2015) destacan el papel preponderante

receptores) and NB-LRRs (nucleotide-binding-leucine-rich repeat) (Pieterse *et al.*, 2014). The former perceives cell components such as fungal chitin or flagellins (PAMPs o MAMPs, pathogen o microbe associated molecular patterns) triggering the first line of defense, known as PTI (PAMP-triggered immunity). In pathogens with mechanisms for the evasion of PTI, a second line of defense is activated, which perceives virulence effector proteins via receptors NB-LRRs (Boller *et al.*, 2009). SAR depends on the signaling of salicylic acid (SA), which activates *PR* (pathogenesis-related) genes by codifying many of them to *PR* proteins with antimicrobial ability (*e.i. PRI*) (Vlot *et al.*, 2009).

Similarly to SAR, the systemic response in plants may be induced (ISR, induced systemic resistance) by chemical signals (elicitors) produced by beneficial microorganisms (Pérez-Montañón *et al.*, 2014) (Figure 3-E). Despite SAR and ISR being considered synonymous due to the similarity between the mechanisms (Pieterse *et al.*, 2014), signaling in ISR depends on the jasmonic acid and ethylene (Pieterse, 1998The protection of

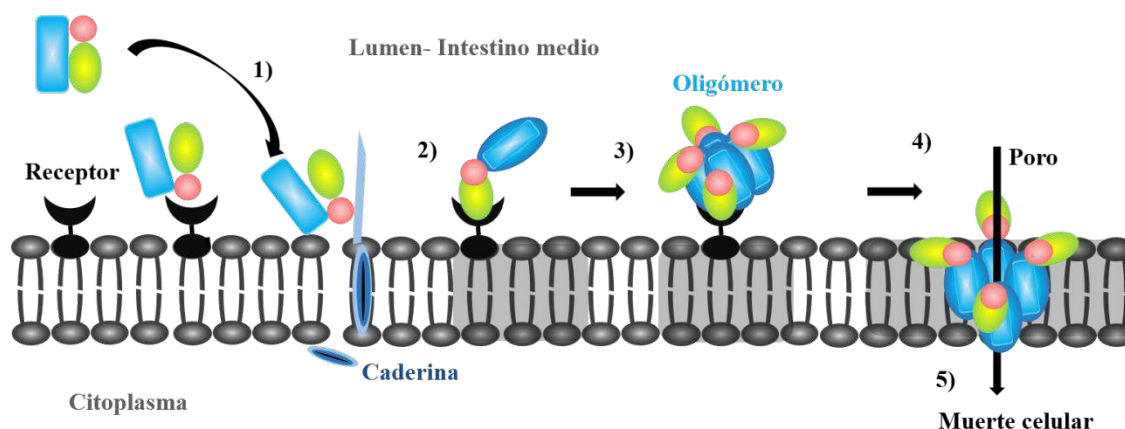


Figura 7. El mecanismo de acción de las proteínas Cry en insectos. Modificado de Xu *et al.* (2014).  
Figure 7. Action mechanism of Cry proteins in insects. Modified from Xu *et al.* (2014).

que pueden ocupar cepas de *Bt* contra la plaga del gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*), en bioensayos realizados con extractos de proteínas Cry obtenidos de las cepas LBIT-13, LBIT-44, LBIT-383, LBIT-418 y LBIT-428 de *Bt*, demostraron que todas ellas tenían un efecto tóxico en el gusano cogollero, sin embargo, las cepas LBIT-13 y LBIT-418 mostraron alta toxicidad hacia *S. frugiperda*, con  $CL_{50}$  de 137.2 y 197.2 ng cm<sup>-2</sup>, respectivamente, esto en comparación con el estándar comercial HD-1 ( $CL_{50}$  de 142 ng cm<sup>-2</sup>).

### Respuesta sistémica inducida

Durante la historia evolutiva, las plantas han desarrollado mecanismos para defenderse de la invasión de organismos patógenos (bacterias, hongos, nematodos, insectos, etc.). Dichos mecanismos se encuentran latentes y son activados por estímulos durante la interacción con agentes patógenos. En términos generales, estos mecanismos se conocen como resistencia sistémica adquirida (SAR del inglés, systemic acquired resistance) y se caracteriza por activarse no solo en el sitio de la infección, sino de manera sistémica en otros tejidos (Pieterse *et al.*, 2014).

SAR es activado a través de estímulos percibidos principalmente por dos receptores, los PRRs (pattern recognition receptors) y NB-LRRs (nucleotide-binding-leucine-rich repeat) (Pieterse *et al.*, 2014). El primero de éstos percibe componentes celulares como quitina fúngica o flagelinas (PAMPs o MAMPs, pathogen o microbe associated molecular patterns) desencadenando la primera línea de defensa, conocida como PTI (PAMP-triggered immunity). En patógenos con mecanismos para evadir a PTI, una segunda línea de defensa es activada, la cual percibe proteínas efectoras de virulencia mediante receptores NB-LRRs (Boller *et al.*, 2009). SAR es dependiente de la señalización

agriculturally important crops (tomato, peppers, bean, rice, etc.) by inducing the systemic response using strains of the *Bacillus* genus has been documented (Akram *et al.*, 2016; Choudhary and Johri, 2009; Wang *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2013). *Bacillus* produces a large diversity of eliciting molecules that induce a systemic response in plants, including lipopeptides (Chowdhury *et al.*, 2015), phytohormones (Ryu *et al.*, 2003) and volatile compounds (Kim *et al.*, 2015). The latter activate *PR* genes, which protect from the invasion of pathogenic genes. This has been observed in tobacco plants, where *PR2* codifies for one  $\beta$ -1,3 glucanase and *PR3* codifies for one chitinase, they were activated in response to volatile compounds of *Bacillus* sp. JS, conferring resistance to *Rhizocronia solani* and *Phytophthora nicotianae* (Kim *et al.*, 2015). Along with *PR* genes, *Bacillus* activates other plant protection mechanisms, which include structural changes in the cell wall with the accumulation of lignin (Singh *et al.*, 2016) or the production or secondary metabolites such as flavonoids, phytoalexins, auxins or glucosinolates in general (Pretali *et al.*, 2016). Despite the plant protection mechanisms induced by elicitors being activated by different metabolically routes, a microorganism can activate multiple protection mechanisms. This has been observed in wheat plants, where after the inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* B-16, the production of multiple *PR* proteins and secondary metabolites such as gallic acid and ferulic acid was induced, conferring resistance against *Bipolaris sorokiniana* (Singh *et al.*, 2016).

### The *Bacillus* genus and pesticides

The use of chemical pesticides as the main method for the control of pests and diseases in agriculture has helped increase agricultural

de ácido salicílico (SA), el cual, activa genes *PR* (pathogenesis-related) codificando muchos de ellos a proteínas PR con capacidad antimicrobiana (*e.i. PRI*) (Vlot *et al.*, 2009). De manera similar al SAR, la respuesta sistémica en plantas puede ser inducida (ISR, induced systemic resistance) por señales químicas (elicitors) producidas por microorganismos benéficos (Pérez-Montaña *et al.*, 2014) (Figura 3-E). No obstante que SAR e ISR son considerados sinónimos debido a la similitud entre los mecanismos (Pieterse *et al.*, 2014), la señalización en ISR es dependiente del ácido jasmónico y etileno (Pieterse, 1998).

La protección de cultivos de importancia agrícola (tomate, pimiento, frijol, arroz, etc.) mediante la inducción de respuesta sistémica utilizando cepas del género *Bacillus* ha sido bien documentada (Akram *et al.*, 2016; Choudhary and Johri, 2009; Wang *et al.*, 2013; Yi *et al.*, 2013). *Bacillus* produce una gran diversidad de moléculas elicitoras que inducen respuesta sistémica en plantas, incluyendo a lipopéptidos (Chowdhury *et al.*, 2015), fitohormonas (Ryu *et al.*, 2003) y compuestos volátiles (Kim *et al.*, 2015). Estos últimos activan genes *PR*, los cuales protegen de la invasión de agentes patógenos. Este hecho ha sido observado en plantas de tabaco, donde *PR2* codifica por una  $\beta$ -1,3 glucanasa y *PR3* codifica por una quitinasa, fueron activados en respuesta a compuestos volátiles de *Bacillus* sp. JS, confiriendo resistencia ante *Rhizocronia solani* y *Phytophthora nicotianae* (Kim *et al.*, 2015). Además de genes *PR*, *Bacillus* activa otros mecanismos de protección en plantas, los cuales incluyen cambios estructurales en la pared celular mediante la acumulación de lignina (Singh *et al.*, 2016) o la producción de metabolitos secundarios como flavonoides, fitoalexinas, auxinas o glucosinolatos en general (Pretali *et al.*, 2016). No obstante que los mecanismos de protección de plantas inducidos por elicitors son activados por diferentes

productivity significantly in the past decades. However, their excessive use has created resistance to these compounds by phytopathogenic microorganisms, while having harmful effects on human health and the environment. This shows the need to generate efficient and environmentally friendly alternatives to reduce the use of synthetic products in order to achieve an efficient and sustainable control of diseases in agricultural crops (Pérez-García *et al.*, 2011).

Biological control is an important part of the management of pests and diseases, and it consists of the use of living organisms to reduce and maintain the abundance of a pest or pathogen below the levels of economic damage. The potential of this alternative is based on an efficient control of a pest or disease in the middle and long terms, compatible with a low environmental risk and a sustainable production. In this way, the management of pests and diseases can be carried out by several methods: the use of synthetic pesticides, crops modified genetically to resist pests, biological control or the combination of one or more of these strategies. Biopesticides are a particular group of tools for the protection of crops used in the MIPE. Although there is not a formal definition for this term, a biopesticide refers to an agent produced at a massive scale, from a living microorganism or a natural product, and sold for the control of pests or diseases in plants (this definition covers most of the products classified as biopesticides, within the countries of the Organization for the Economic Co-operation and Development, OCDE, 2009). Biopesticides can be classified into three groups, depending on the active substance: i) biochemical products, that mainly comprise secondary metabolites of plants and microorganisms; ii) semi-chemical products, mostly made up of pheromones; and iii) microorganisms, which include bacteria, viruses, fungi, and protozoa (Chandler *et al.*, 2011).

rutas metabólicas, un microorganismo es capaz de activar múltiples mecanismos de protección. Esto último ha sido observado en plantas de trigo, donde tras la inoculación de *Bacillus amyloliquefaciens* B-16, se indujo producción de múltiples proteínas PR y metabolitos secundarios como ácido gálico y ácido ferúlico, confiriendo resistencia contra *Bipolaris sorokiniana* (Singh *et al.*, 2016).

### El género *Bacillus* y los bioplaguicidas

El uso de plaguicidas químicos como principal método de control de plagas y enfermedades en la agricultura, ha permitido incrementar significativamente la productividad agrícola en las últimas décadas; sin embargo, su uso excesivo ha originado resistencia a estos compuestos por microorganismos fitopatógenos, y a su vez se han asociado efectos nocivos a la salud humana, y al medio ambiente. Lo anterior, hace evidente la necesidad de generar alternativas eficientes y amigables con el ambiente para reducir el uso de productos sintéticos, logrando de esta manera un manejo eficaz y sustentable del control de enfermedades en los cultivos agrícolas (Pérez-García *et al.*, 2011).

El control biológico es una parte importante para el manejo de plagas y enfermedades, que consiste en la utilización de organismos vivos para reducir y mantener la abundancia de una plaga o un patógeno por debajo de los niveles de daño económico. El potencial de esta alternativa se fundamenta en un control eficiente de una plaga o enfermedad a mediano y largo plazo, compatible con un bajo riesgo ambiental, y una producción sustentable. Así, el manejo de plagas y enfermedades se puede llevar a cabo por varios métodos alternativos: el uso de plaguicidas sintéticos, cultivos genéticamente modificados resistentes a plagas, el control biológico, o bien la combinación de una o más de estas estrategias. Los bioplaguicidas son un grupo particular

Of the commercially available microbial pesticides, *Bacillus* is the most widely exploited in agricultural biotechnology, with 85% of the bacterial products, due to its large metabolic versatility that allow it to perform a biological control of pests and diseases through diverse mechanisms. Also, this bacterial genus is able to produce endospores, which are the main active ingredient of the formulae, and confer to them – as a property – a greater viability in time (Ongena and Jaques, 2008).

One of the biological control mechanisms that has been most exploited in the biopesticides market is the ability of the *Bacillus* genus of producing  $\delta$ -endotoxins. This mechanism was the milestone in the development of the first microbial biopesticide for the biological control of lepidoptera, produces from *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1. As mentioned earlier, *B. thuringiensis* (*Bt*) produces Cry proteins (*Bt*-  $\delta$  endotoxins) during spore formation, which is capable of producing lysis in cells of the digestive tract when consumed by susceptible insects. Strain HD-1 is one of the most studied strains, since it characteristically carries varieties of cry antilepidoptera genes: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* and *cry1Ia* (Höfte and Whiteley, 1989; Sauka and Benintende, 2008).

Currently, *B. Thuringiensis*-based products account for 75% of the biopesticides sold globally (Olson, 2015), with a substantial impact on the Mexican biopesticide market since 1980. In Mexico, the use of *Bt*-based formulae is an efficient formula for the control of insects and it accounts for between 4 and 10% of the total of insecticides used for maize, cotton and vegetable crops (Tamez *et al.*, 2001). Likewise, other species of the *Bacillus* genus, such as: *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* and *B. amyloliquefaciens*, stand out for their successful implementation in commercial formulations, and those developed mainly for the control of fungal

de herramientas de protección de cultivos utilizados en el MIPE, aunque no existe una definición formalmente para este término, un bioplaguicida hace referencia a un agente producido en masa a partir de un microorganismo vivo o un producto natural, y comercializado para el control de plagas o enfermedades de plantas (esta definición abarca la mayoría de los productos clasificados como bioplaguicidas, dentro de los países de la Organización de Cooperación y Desarrollo Económicos) (OCDE, 2009). Los bioplaguicidas pueden ser clasificados en tres tipos, de acuerdo con la sustancia activa: i) productos bioquímicos, que comprenden principalmente metabolitos secundarios de plantas y microorganismos; ii) productos semi-químicos, constituidos principalmente por feromonas; y iii) microorganismos, incluyen bacterias, virus, hongos y protozoarios, (Chandler *et al.*, 2011).

Dentro de los bioplaguicidas microbianos disponibles comercialmente, *Bacillus* es el género más explotado en la biotecnología agrícola, con un 85% de los productos bacterianos, debido a su gran versatilidad metabólica que le permiten llevar a cabo el control biológico de plagas y enfermedades por diversos mecanismos. Además, este género bacteriano es capaz de producir endosporas, siendo éstas el principal ingrediente activo de los formulados, y confiriéndoles -como propiedad- una mayor viabilidad en el tiempo (Ongena y Jaques, 2008).

Uno de los mecanismos de control biológico que ha sido mayormente explotado en el mercado de los bioplaguicidas, es la capacidad del género *Bacillus* de producir  $\delta$ -endotoxinas. Este mecanismo fue el parteaguas en el desarrollo del primer bioplaguicida microbiano para el control biológico de lepidópteros, el cual fue elaborado a base de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1. Como se mencionó anteriormente, *B. thuringiensis* (*Bt*) produce proteínas Cry (*Bt*- $\delta$  endotoxinas) durante la formación de esporas, la cual es capaz de producir lisis

diseases (Table 1). For example, Galindo *et al.*, (2015) developed the first Mexican wide-spectrum biofungicide “Fungifree AB”, produced with viable *B. subtilis* 83 spores. This bacteria is a natural antagonist to diverse phytopathogens, used to prevent at least 8 pathogens of different etiologies: *Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Leveillula*, *Botrytis*, *Sphaerothecamacularis*, in over 20 agriculture crops; They even indicate that the success of its formula resides, not only in the support provided by scientists, but also in the publication of its results in a journal read by professionals in agribusiness, thus allowing the linked that bonded crop exporting companies in search for sustainable alternatives that could allow them to control phytopathogens (*i. e. Colletotrichum gloeosporioides*).

In recent years, the chemical pesticide production market has declined 2% every year, while the production of biopesticides presents an annual increase of 20% (Cheng *et al.*, 2010). There are several reasons for the increasing interest towards microbial biopesticides, including the limited development of resistance of pathogenic organisms to them, a reduction in the rate of discovery of new insecticides, a greater public perception of the dangers related to synthetic pesticides, the highest number of studies on the specificity of microbial pesticides, improvements in production, the technology of formulation and dissemination, as well as the interaction with producers and regulation bodies. In this way, biopesticides account for a small fraction of the global market focused on crop protection: 5% (approximate value of \$3 billion USD). However, biopesticides are expected to have a Compound Annual Growth Rate (CAGR) of at least 8.64% by 2023, estimating a value of over \$4.5 billion USD (Olson *et al.*, 2013; Olson, 2015). It is worth mentioning that the transition and integration of the use of biopesticides in current agricultural practices

en células del tracto digestivo cuando es consumida por insectos susceptibles. La cepa HD-1 es una de las cepas mejor estudiadas, ya que se caracteriza por la portación de variedad de genes *cry* antilepidópteros: *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *cry1Ia* (Höfte y Whiteley, 1989; Sauka y Benintende, 2008).

Actualmente, los productos a base de *B. thuringiensis* representan el 75% de los bioplaguicidas comercializados mundialmente (Olson, 2015), impactando sustancialmente el mercado de bioplaguicidas nacional, desde 1980. En México, la aplicación de formulados a base de *Bt* representa una alternativa eficaz para el control de insectos, presentando un porcentaje de uso de 4 a 10% del total de insecticidas utilizados para los cultivos de maíz, algodón y hortalizas (Tamez *et al.*, 2001). Además, otras especies del género de *Bacillus*, tales como: *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis* y *B. amyloliquefaciens*, destacan por su implementación exitosa en formulaciones comerciales y desarrolladas principalmente para el control de enfermedades fúngicas (Cuadro 1). Por ejemplo, Galindo *et al.*, (2015) desarrollaron el primer biofungicida mexicano de amplio espectro “Fungifree AB”, formulado con esporas viables de *B. subtilis* 83. Esta bacteria es un antagonista natural de diversos fitopatógenos, utilizado para la prevención de por lo menos 8 patógenos de distinta etiología: *Colletotrichum*, *Erysiphe*, *Leveillula*, *Botrytis*, *Sphaerothecamacularis*, en más de 20 cultivos agrícolas; incluso señalan que el éxito de su formulado reside, además del sustento científico, en la publicación de sus resultados en una revista de divulgación consultada por los profesionales en agronegocios, permitiendo con esto el vínculo que enlazó a las compañías exportadoras de cultivos en búsqueda de alternativas sustentables que les permitiera el control de fitopatógenos (*i. e.* *Colletotrichum gloeosporioides*).

En los últimos años, el mercado de la producción de plaguicidas químicos ha declinado un 2%

should comply with the following requirements: a) effectiveness against the pest or disease; b) compatibility with other control methods; c) low or no environmental impact; d) long-lasting effect on the medium; e) economy, from a cost/benefit viewpoint; f) technical feasibility of its use; and g) acceptance by producers and society in general. Therefore, the use of biopesticides offers an opportunity to stimulate the development and modernization of current agricultural practices, with the aim of contributing to food security under the scope of biosecurity.

### **Discussion and perspectives of biosecurity and biodiversity in the use of the *Bacillus* genus in agro-systems**

The species of the *Bacillus* genus have a great metabolic and functional diversity, promoting its wide use in agriculture. In this sense, the groups of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* are the most widely used. However, in terms of biosecurity, they should be studied broadly before being used as biological control agents in the field. The group of *Bacillus subtilis*, which includes important species for agriculture, such as *B. subtilis*, *B. licheniformis* and *B. pumilus*, are not traditionally considered as pathogens for humans, and *B. subtilis* has even been granted the status of QPS (*Qualified Presumption of Safety*) by the European Food Security Authority (EFSA, 2015). However, there are some isolated cases of intoxications form digestive manifestations, such as the one reported by Pavic *et al.* (2005), pointing out *B. subtilis* and *B. licheniformis* as causal agents of the intoxication outbreak in a kindergarten caused by the consumption of powdered milk, which contained these bacterial species. On the other hand, in the group of *Bacillus cereus* made up of species such as *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. cytotoxicus* and



**Cuadro 1. *Bacillus* como ingrediente activo en formulaciones comerciales.**  
**Table 1. *Bacillus* as an active ingredient in commercial formulations.**

Agente de Control Biológico	Producto (Año)	Patógeno	Cultivos	Empresa
<i>B. pumilus</i> QST2808 <sup>a</sup>	Ballad Plus (2007)	<i>Erysiphe</i> sp., <i>Puccinia</i> spp., <i>Pyricularia</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Tilletia</i> sp., <i>Xanthomonas</i> spp, entre otros.	Gramíneas, oleaginosas, entre otros.	AgraQuest
<i>B. subtilis</i> QST713 <sup>r,s</sup>	Serenade ASO (2017)	<i>Pythium</i> spp., <i>Rhizoctonia</i> spp., <i>Fusarium</i> spp., <i>Phytophthora</i> sp., entre otros.	Frutales, hortalizas, entre otros.	Bayer CropScience
<i>B. subtilis</i> 83 <sup>t</sup>	Fungifree AB (2012)	<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Leveillula</i> sp., <i>Botrytis</i> sp., entre otros	Frutales, hortalizas	Agro & biotecnia
<i>B. subtilis</i> var. <i>amyloliquefaciens</i> FZB24 <sup>u,v</sup>	Taegro 2 (2014)	<i>Rhizoctonia</i> sp., <i>Fusarium</i> sp., <i>Pythium</i> sp., <i>Botrytis</i> sp., entre otros.	Diversas frutas, plantas ornamentales, entre otros.	ISAGRO
<i>B. licheniformis</i> SB3086 <sup>w,x</sup>	EcoGuard-GN (2013)	<i>Colletotrichum</i> sp., <i>Sclerotinia</i> sp., <i>Rhizoctonia</i> sp., entre otros.	Plantas ornamentales, entre otros.	Novozymes
<i>B. thuringiensis</i> var <i>kurstaki</i> <sup>y,z</sup>	DiPel WG (2007)	<i>Cydia</i> sp., <i>Otiorychus</i> sp., <i>Spodoptera</i> sp, entre otros.	Frutales, hortalizas, entre otros.	Valent BioSciences

(<sup>a</sup>AgraQuest, 2007; <sup>r</sup>Bayer CropScience, 2016; <sup>s</sup>EPA, 2004; <sup>t</sup>Galindo *et al.*, 2015; <sup>u</sup>ISAGRO, 2017; <sup>v</sup>EPA, 2014; <sup>w</sup>Novozymes, 2017; <sup>x</sup>EPA, 2013; <sup>y</sup>Valent BioSciences, 2017; <sup>z</sup>EPA, 2007) / (<sup>a</sup>AgraQuest, 2007; <sup>r</sup>Bayer CropScience, 2016; <sup>s</sup>EPA, 2004; <sup>t</sup>Galindo *et al.*, 2015; <sup>u</sup>ISAGRO, 2017; <sup>v</sup>EPA, 2014; <sup>w</sup>Novozymes, 2017; <sup>x</sup>EPA, 2013; <sup>y</sup>Valent BioSciences, 2017; <sup>z</sup>EPA, 2007).

anual, mientras que la producción de bioplaguicidas presenta un incremento anual del 20% (Cheng *et al.*, 2010). Existen varias razones para el interés creciente por los bioplaguicidas microbianos, las cuales incluyen el limitado desarrollo de resistencia por parte de los organismos patógenos a éstos, una disminución en la tasa de descubrimiento de nuevos insecticidas, una mayor percepción pública de los peligros asociados a los plaguicidas sintéticos, el mayor número de estudios sobre la especificidad de los bioplaguicidas microbianos, mejoras en la producción, la tecnología de formulación y divulgación, así como la interacción con productores e instancias de regulación. De esta manera, los bioplaguicidas representan una pequeña fracción del mercado global enfocados a la protección de cultivos, el 5% (valor aproximado de \$3 000.00

*B. weihenstephanensis*, some strains have been identified as pathogens for humans (Ceuppens *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016). Among these, *B. cereus* has been identified in a large diversity of foods (dairy products, fresh vegetables and others), causing important worldwide epidemiological crises, and in some cases, even death by emetic and diarrheal infections (Oh *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016; Glasset *et al.*, 2016). Also, *B. thuringiensis* strains have recently been related to intoxications caused by the ingestion of contaminated foods (Oh *et al.*, 2012).

The virulence of these species has been mainly related to the presence of two toxins, hemolysin BL (HBL) and the nonhemolytic enteric toxin (NHE), which form a protein complex (Kim *et al.*, 2016). Other toxins have also been identified in pathogenic

millones de USD). Sin embargo, se espera que para el 2023 los bioplaguicidas posean una tasa anual compuesta (CAGR) de, al menos, el 8.64%, estimando un valor de más de \$4 500 millones de USD (Olson *et al.*, 2013; Olson, 2015). Cabe mencionar que la transición e integración del uso de bioplaguicidas en las prácticas agrícolas actuales deberá cumplir con los siguientes requisitos: a) efectividad contra la plaga o enfermedad; b) compatibilidad con otros métodos de control; c) impacto ambiental bajo o nulo; d) efecto duradero en el medio; e) economía, desde el punto de vista costo/beneficio; f) factibilidad técnica de su empleo; y g) aceptación por los productores y sociedad en general. Por lo tanto, el uso de bioplaguicidas ofrece una oportunidad para estimular el desarrollo y modernización de las prácticas agrícolas actuales con el objetivo de contribuir a la seguridad alimentaria bajo enfoques de bioseguridad.

### **Discusión y perspectivas de bioseguridad y biodiversidad en el uso del género *Bacillus* en los agro-sistemas**

Las especies del género *Bacillus* poseen gran diversidad metabólica y funcional, propiciando su amplio uso en la agricultura. En este sentido, los grupos de *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis* son los mayormente utilizados; sin embargo, en términos de bioseguridad éstos deben ser estudiados ampliamente antes de su utilización como agentes de control biológico en el campo. El grupo de *Bacillus subtilis* que incluye especies de gran importancia en la agricultura como *B. subtilis*, *B. licheniformis* y *B. pumilus*, tradicionalmente no son considerados como patógenos para humanos, incluso a *B. subtilis* se le ha otorgado el estado de QPS (*Qualified Presumption of Safety*) por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2015). Sin embargo, existen algunos casos aislados de intoxicaciones por manifestaciones digestivas, es así el reportado

strains, including cytotoxin K (*cytK*), enterotoxin FM (*entFM*), enterotoxin S (*entS*) and enterotoxin T (*bceT*). In strains that produce the emetic toxin (toxin of high resistance to thermal treatments, extreme pH values and the activity of proteases), virulence has been related to the presence of the dodeca depsipeptide synthesized by non-ribosomal peptide synthases (NRPS) codified by genes *ces*, found in type pXO1 plasmids. Likewise, products of other genes, such as hemolysin A (*hlyA*), hemolysin II and III (*hlyI*, *hlyII*), cereolysin A and B (*cerA*, *cerB*), and the pleiotropic transcription factor (*pclR*) are involved in the pathogenicity of these strains (Ceuppens *et al.*, 2013).

Historically, the classification and differentiation of species in the *Bacillus cereus* group has been carried out using gene 16S rRNA and other characteristics such as i) virulence (*B. cereus*), ii) content of plasmids (*B. anthracis* and *B. thuringiensis*), iii) growth conditions (*B. cytotoxicus* and *B. weihenstephanensis*) and iv) morphological characteristics (*B. mycoides* and *B. pseudomycoides*). However, in widely related species such as *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*, the differentiation using virulence factors and contents of plasmids is limited, due to its loss and transference during the evolutionary history of these species (Hoffmaster *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015). Recent comparative studies with complete genomes using dDDH (digital DNA: DNA hybridization) showed the distribution of *cry* genes and type pXO plasmids in members of this group, showing the low correlation between the phylogenetic position and the presence or absence of these plasmids (Liu *et al.*, 2015). The above study also showed the low resolution of the multilocus sequence typing (MLST) for the differentiation at the level of species.

In this way, due to the high metabolic versatility with agricultural application shown by members of the *B. Cereus* group, particularly *B. cereus* and

por Pavic *et al.* (2005), señalando a *B. subtilis* y *B. licheniformis* como agentes causantes del brote de intoxicación en un jardín de niños, ocasionado por la ingesta de leche en polvo, la cual contenía dichas especies bacterianas. Por otra parte, en el grupo de *Bacillus cereus* conformado por especies como *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycooides*, *B. cytotoxicus* y *B. weihenstephanensis*, algunas cepas se han identificado como patógenos para humanos (Ceuppens *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2016). Entre éstos, *B. cereus* se ha identificado en una gran diversidad de alimentos (productos lácticos, vegetales frescos, entre otros), provocando crisis epidemiológicas importantes a nivel mundial, y en algunos casos hasta la muerte, debido a infecciones eméticas y diarreicas (Oh *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2016; Glasset *et al.*, 2016). Además, recientemente, cepas de *B. thuringiensis* han sido asociados a intoxicaciones por el consumo de alimentos contaminados (Oh *et al.*, 2012).

La virulencia de estas especies se ha asociado principalmente a la presencia de dos toxinas, la hemolisina BL (HBL) y la toxina entérica no hemolítica (NHE), los cuales forman un complejo proteico (Kim *et al.*, 2016). Además, otras toxinas se han identificado en cepas patógenas, incluyendo la citotoxina K (*cytK*), enterotoxina FM (*entFM*), enterotoxina S (*entS*) y enterotoxina T (*bceT*). En cepas que producen la toxina emética (toxina de alta resistencia a los tratamientos térmicos, valores de pH extremos y la actividad de proteasas), la virulencia se ha relacionado con la presencia del dodeca depsipéptido sintetizado por sintasas de péptidos no ribosomales (NRPS) codificadas por genes *ces*, encontrándose en plásmidos tipo pXO1. Asimismo, productos de otros genes, como la hemolisina A (*hlyA*), hemolisina II y III (*hlyI*, *hlyII*), cereolisina A y B (*cerA*, *cerB*), y el factor transcripción pleotrópico (*pclR*) están involucrados en la patogenicidad de estas cepas (Ceuppens *et al.*, 2013).

*B. thuringiensis*, the correct identification and the determination of its virulence for the human being is decisive for the selection and commercialization of biological control agents of these species. Although the study of comparative genomics using complete genomes is the only accurate alternative for the classification and determining its virulence, it is important to consider that they are costly tools for the discrimination of pathogenic strains during the primary process of selection of potential biological control agents.

On the other hand, in agro-systems, soil is a dynamic matrix that houses a large amount ( $\sim 1 \times 10^9$  cells/gram of soil) and diversity ( $1 \times 10^4$  species/gram of soil) of microorganisms (Curtis *et al.*, 2002). This edaphic microbiota plays a very important ecological part, offering several ecosystemic services, such as i) social and ecological sustainability, ii) adaptation to, and mitigation of, climate change, iii) biotechnological resource for humanity, iv) cycling of water and nutrients, and v) food security, mainly by the cycling of nutrients (van der Heijden *et al.*, 2008), and the boosting of plant growth through the production of phytohormones, solubilization of nutrients (Hayat *et al.*, 2010) and avoiding the establishment of phytopathogenic agents (Compant *et al.*, 2005). In this way, the use of biopesticides has acquired great relevance in the agricultural sector, offering a sustainable alternative, focused on increasing crop production. This generally implies the application of large populations of the microorganism of interest with the aim of promoting its establishment and colonization. However, this practice may cause disturbances in the microbial communities of the agro-systems (Trabelsi *et al.*, 2013), particularly when inoculating biological control agents, since their biological activity is not specific or selective for the phytopathogenic agent in question, which may cause unpredictable changes in the microbial

Históricamente, la clasificación y diferenciación de especies en el grupo de *Bacillus cereus* se ha llevado a cabo utilizando el gen 16S RNAr y otras características como i) virulencia (*B. cereus*), ii) contenido de plásmidos (*B. anthracis* y *B. thuringiensis*), iii) condiciones de crecimiento (*B. cytotoxicus* y *B. weihenstephanensis*) y iv) características morfológicas (*B. mycoides* y *B. pseudomycoides*). Sin embargo, en especies estrechamente relacionadas como *B. cereus*, *B. anthracis* y *B. thuringiensis*, la diferenciación utilizando factores de virulencia y contenido de plásmidos es limitada, debido a su pérdida y transferencia durante la historia evolutiva de estas especies (Hoffmaster *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2015). Recientemente, estudios comparativos con genomas completos mediante dDDH (digital DNA: DNA hybridization), evidenciaron la amplia distribución de genes *cry* y plásmidos tipo pXO en miembros de este grupo, demostrando la baja correlación que existe entre posición filogenética y la presencia o ausencia de estos plásmidos (Liu *et al.*, 2015). Además, el anterior estudio demostró la baja resolución del análisis multilocus (MLST) para la diferenciación a nivel de especies.

Así, debido a la gran versatilidad metabólica con aplicación agrícola que exhiben miembros del grupo de *B. cereus*, en especial *B. cereus* y *B. thuringiensis*, la correcta identificación y la determinación de su virulencia para el ser humano es determinante para la selección y comercialización de agentes de control biológico de estas especies. Siendo el estudio de genómica comparativa utilizando genomas completos, la única alternativa precisa de clasificar y determinar su virulencia, sin embargo, es importante considerar que son herramientas costosas para la discriminación de cepas patogénicas durante el proceso de selección primario de potenciales agentes de control biológico.

Por otra parte, en los agro-sistemas, el suelo es una matriz dinámica que alberga una gran canti-

structure of said agro-systems. It is therefore important to evaluate the impact of the inoculation of biological control agents on the structure and composition of the microbial communities in agro-systems, to guarantee the ecological balance, as well as the desired biological effect.

Different studies have shown the impact of the inoculation of strains with the ability for biological control on microbial communities in different crops. For example, Li *et al.* (2015) evaluated the effect of the *B. subtilis* strain B068150 on the microbial communities in the rhizosphere of cucumber plants using the DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) technique. The study was carried out using three different soil types, with no significant changes in the microbial diversity related to the cucumber rhizosphere, after the inoculation of strain B068150. On the other hand, You *et al.* (2016) reported that with the inoculation of *B. subtilis* Tpb55, not only was the *Phytophthora parasitica* infection reduced, but significant changes were also observed in the microbial community related to the rhizosphere of a tobacco plantation, with an ANDRA (Amplified ribosomal 16S rDNA restriction analysis), highlighting that the relative abundance of some communities was favored, essentially in those belonging to the dominant filia: Acidobacteria and Proteobacteria, in an increase of 2 and 10% respectively in regard to the control, yet reducing by at least 50% the relative abundance of the communities belonging to Planctomycetes, Nitrospirae, Bacteroidetes and Chloroflexi, which may be involved in an important activity for plant development. In this way, each BCA is a particular organism that performs its action in a specific manner, in which the studies of each microbial strain chosen must be explored in depth in order to acquire further knowledge on the way to strengthen its biological control with an effective formulation, considering aspects of ecological risk and biosafety for the agro-system.

dad ( $\sim 1 \times 10^9$  células/gramo de suelo) y diversidad ( $1 \times 10^4$  especies/gramo de suelo) de microorganismos (Curtis *et al.*, 2002). Esta microbiota edáfica tienen un papel ecológico muy importante ofreciendo diversos servicios eco-sistémicos, por ejemplo: i) la sostenibilidad social y ecológica, ii) adaptación y mitigación del cambio climático, iii) recurso biotecnológico para la humanidad, iv) ciclaje de agua y nutrientes, y v) seguridad alimentaria, principalmente por el ciclaje de nutrientes (van der Heijden *et al.*, 2008), y la promoción del crecimiento vegetal a través de la producción de fitohormonas, solubilización de nutrientes (Hayat *et al.*, 2010) y evitando el establecimiento de agentes fitopatógenos (Compant *et al.*, 2005). De esta manera, el uso de bioplaguicidas ha adquirido gran relevancia en el sector agrícola, ofreciendo una alternativa sostenible enfocada a incrementar la producción de los cultivos. Lo cual, generalmente implica la aplicación de altas poblaciones del microorganismo de interés con el objetivo de potenciar su establecimiento y colonización. Sin embargo, esta práctica puede causar perturbaciones en las comunidades microbianas de los agro-sistemas (Trabelsi *et al.*, 2013), aún más cuando se inoculan agentes de control biológico, ya que generalmente su actividad biológica no es específica o selectiva para el agente fitopatógeno en cuestión, lo cual puede generar cambios impredecibles en la estructura microbiana de dichos agro-sistemas. De esta manera, es importante evaluar el impacto de la inoculación de agentes de control biológico sobre la estructura y composición de las comunidades microbianas en los agro-sistemas, con el objetivo de garantizar el equilibrio ecológico, además del efecto biológico buscado.

Diferentes estudios han demostrado el impacto de la inoculación de cepas con capacidad de control biológico, sobre comunidades microbianas en diferentes cultivos. Por ejemplo, Li *et al.* (2015)

## CONCLUSIONS

The negative impacts of chemical pesticides on the environment has been widely documented, include health damages, resistance to compounds by phytopathogens, soil and water pollution, and produce the need to develop sustainable alternatives to protect agricultural soils against pathogens, for example, biological control agents.

The *Bacillus* genus presents a large metabolic diversity involved in the biological control of phytopathogens; given this, the academic and industrial sectors have concentrated on generating commercial formulae for their use in the field, and in the description of the main action mechanisms involved in this effect (competition for space and nutrients, antibiosis, production of lytic enzymes, secretion of toxins, inducing host resistance). However, it is unusual for a single action mechanism to be used by said antagonist for the suppression of phytopathogens *in situ*. In this way, the knowledge of the mechanisms with which the antagonist exerts its action is decisive for both the guarantee of its effect and for the development of commercial formulations, the success of which lies in the creation of microenvironments that boost their biological activity without stimulating the growth of the pathogen. Currently, several commercial formulations consider strains of the *Bacillus* genus as an active ingredient, due to its ability to colonize, reproduce easily and its high persistence related to the formation of endospores, with the latter being a characteristic of interest, since it allows it to live under conditions of abiotic stress, making its production and long-term storage easier. On the other hand, after the inoculation of biopesticides, it is possible to observe a dual effect on crops due to the action of biological control agents, mitigating phytopathogens and indirectly promoting plant growth with the improvement

evaluaron el afecto de la cepa B068150 de *B. subtilis* sobre las comunidades microbianas en la rizósfera de plantas de pepino utilizando la técnica de DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*). El estudio se llevó a cabo utilizando tres diferentes tipos de suelo, no encontrando cambios significativos en la diversidad microbiana asociada a la rizósfera de pepino, posterior a la inoculación de la cepa B068150. Por otra parte, You *et al.* (2016) reportaron que con la inoculación de *B. subtilis* Tpb55, además de reducir la infección de *Phytophthora parasítica*, también se observaron cambios significativos en la comunidad microbiana asociada a la rizósfera del cultivo de tabaco, mediante el análisis ANDRA (*Amplified ribosomal 16S rDNA restriction analysis*), destacando que la abundancia relativa de algunas comunidades fue favorecida, esencialmente en las pertenecientes a los filos dominantes: Acidobacterias y Proteobacterias, en un 2 y 10% de aumento respectivamente respecto al control, sin embargo, reduciendo en al menos un 50% la abundancia relativa de las comunidades correspondientes a Planctomycetes, Nitrospirae, Bacteroidetes y Chloroflexi, las cuales pudiesen estar involucradas en alguna actividad importante para el desarrollo de la planta. De esta manera, cada ACB es un organismo particular que efectúa su acción de forma específica, donde los estudios de cada cepa microbiana seleccionada se deben profundizar, con el objetivo de incrementar el conocimiento sobre la forma de potenciar su control biológico mediante una formulación efectiva, considerando aspectos de riesgo ecológico y la bioseguridad para el agro-sistema.

## CONCLUSIONES

El impacto negativo de los plaguicidas químicos en el ambiente se ha documentado amplia-

of the plant's health. However, it is necessary to carry out basic studies in depth, which integrate other MIPE strategies (cultural practices, chemical control), as well as in the correct identification of pathogenic strains for humans, such as *Bacillus cereus* NS *Bacillus anthracis*, which are even potentially effective strains for the control of phytopathogens. The potential risk of these species may be detected with taxonomy studies,  $\beta$ -hemolytic activity, detection with defined virulence molecular markers, guaranteeing the use of biologically safe strains for agriculture. In addition, studies on the ecological impact of the introduction of a BCA to agro-systems must be developed, since under certain circumstances, they can cause changes in the microbial communities with agro-ecologically unpredictable results. Finally, the success of the use of biopesticides will depend largely on the innovation, research, marketing strategies and dissemination of results amongst producers and the bodies in charge of making decisions related to regulation and the use of this type of technologies.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank and acknowledge the support given by Dr. Angélica Herrera for her suggestions for the improvement of this manuscript. The authors also wish to thank the National Science and Technology Council for the funding of the project 253663 "Fortalecimiento de la infraestructura del Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano del ITSON para la creación de COLMENA: Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos, para contribuir a la seguridad alimentaria regional y nacional (Fortifying the Infrastructure of the ITSON Microbial Resource Biotechnology Laboratory for the creation of COLMENA: Collection of Native Edaphic and Endophytic Microorganisms, to contribute to the regional and national food security)" and project 257246 "Interacción trigo x microorganismos promotores del crecimiento vegetal: identificando genes con

mente, tales como: daños a la salud, resistencia a compuestos por los fitopatógenos, contaminación de suelos y mantos acuíferos, surgiendo así la necesidad de desarrollar alternativas sostenibles para proteger a los cultivos agrícolas contra organismos patógenos, por ejemplo, la utilización de agentes de control biológico.

El género *Bacillus* presenta gran diversidad metabólica involucrada para el control biológico de fitopatógenos, así el sector académico e industrial ha enfocado esfuerzos para la generación de formulaciones comerciales para su aplicación en campo, y en la descripción de los principales mecanismos de acción involucrados en dicho efecto (competencia por espacio y nutrientes, antibiosis, producción de enzimas líticas, secreción de toxinas, induciendo la resistencia del hospedero); sin embargo, es inusual el hecho que un único mecanismo de acción sea utilizado por dicho antagonista para la supresión de fitopatógenos *in situ*. De esta manera, el conocimiento de los mecanismos por los cuales el antagonista ejerce su acción es determinante tanto para garantizar su efecto como para el desarrollo de formulaciones comerciales, cuyo éxito radica en la creación de microambientes que potencialice su actividad biológica sin estimular el desarrollo del patógeno. Actualmente, diversas formulaciones comerciales cuentan como ingrediente activo cepas del género *Bacillus*, debido a su capacidad de colonización, fácil reproducción y alta persistencia asociada a la formación de endosporas, siendo esta última una característica de especial interés ya que les permite sobrevivir bajo condiciones de estrés abiótico, facilitando su producción y almacenamiento durante largos periodos de tiempo. Por otra parte, posterior a la inoculación del bioplaguicidas, es posible observar un efecto dual en los cultivos agrícolas por la acción de control biológico, mitigando a fitopatógenos e indirectamente promoviendo el crecimiento vegetal con la mejora de la salud

potencial agro-biotecnológico (Interaction Wheat x Plant Growth Promoting Microorganisms: Identifying Genes with Agro-biotechnological Potential)”.

~~~~~ End of the English version ~~~~~

de la planta. Sin embargo, es necesario profundizar en estudios básicos que integren otras estrategias de MIPE (prácticas culturales, control químico), así como en la correcta identificación de cepas patógenas para el ser humano, por ejemplo, *Bacillus cereus* y *Bacillus anthracis*, que incluso son cepas potencialmente eficientes en el control de fitopatógenos. La detección del riesgo potencial de estas especies se puede llevar a cabo mediante estudios de taxonomía, actividad  $\beta$ -hemolítica, detección con marcadores moleculares de virulencia definidos, garantizando el uso de cepas bioseguras en la agricultura. Por otra parte, estudios sobre el impacto ecológico de la introducción de un ACB a los agro-sistemas deben ser desarrollados, ya que bajo ciertas condiciones pudiesen ocasionar cambios en las comunidades microbianas con resultados agroecológicamente impredecibles. Finalmente, el éxito del uso de bioplaguicidas dependerá en gran medida de la innovación, investigación, eficiencia, estrategias de marketing y divulgación de resultados entre los productores y las instancias encargadas de la toma de decisiones referentes a la regulación y uso de este tipo de tecnologías.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen y reconocen el apoyo recibido por la Dra. Angélica Herrera por sus sugerencias para la mejora del manuscrito. Además, los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento del proyecto 253663 “Fortalecimiento de la infraestructura del Laboratorio de Biotecnología del Recurso Microbiano del ITSON para la

creación de COLMENA: Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativos, para contribuir a la seguridad alimentaria regional y nacional”; y el proyecto 257246 “Interacción trigo x microorganismos promotores del crecimiento vegetal: identificando genes con potencial agro-biotecnológico”.

## LITERATURA CITADA

- AgraQuest. 2007. BALLAD PLUS, Biofungicide. Disponible en línea: [http://fs1.agrian.com/pdfs/Ballad\\_Plus\\_\(30\\_May\\_2007\)\\_Label.pdf](http://fs1.agrian.com/pdfs/Ballad_Plus_(30_May_2007)_Label.pdf)
- Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E y Preciado-Ortiz RE. 2012. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 35:9-21. Disponible en línea: [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-73802012000100004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802012000100004)
- Akram W, Anjum T and Ali B. 2016. Phenylacetic Acid Is ISR Determinant Produced by *Bacillus fortis* IAGS162, Which Involves Extensive Re-modulation in Metabolomics of Tomato to Protect against *Fusarium* Wilt. *Frontiers in Plant Science*. 7:1-12. [https://doi.org/10.3389/fpls.2016.0049Aktuganov\\_GE\\_Galimzyanova\\_NF\\_Melent'ev\\_AI\\_and\\_Kuz'mina\\_L\\_2007.Extracellular\\_hydrolyses\\_of\\_strain\\_Bacillus\\_sp.\\_739\\_and\\_their\\_involvement\\_in\\_the\\_lysis\\_of\\_micromycete\\_cell\\_walls.Microbiology.76:413-120](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.0049Aktuganov_GE_Galimzyanova_NF_Melent'ev_AI_and_Kuz'mina_L_2007.Extracellular_hydrolyses_of_strain_Bacillus_sp._739_and_their_involvement_in_the_lysis_of_micromycete_cell_walls.Microbiology.76:413-120)
- Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Eguiarte LE, Souza V, Herrera-Estrella L and Olmedo G. 2010. Understanding the evolutionary relationships and major traits of *Bacillus* through comparative genomics. *BMC Genomics*. 11:332. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-332>
- Aranda FJ, Teruel JA and Ortiz A. 2005. Further aspects on the hemolytic activity of the antibiotic lipopeptide iturin A. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. 1713:51-56. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.05.003>
- Arellano-Aguilar O y Rendón OJ. 2016. La huella de los plaguicidas en México. E. Martínez. Greenpeace México A. C. Las Flores 35 Col. Pueblo de Los Reyes, C.P. 04330, Coyoacán, México. 39 p. Disponible en línea: [http://www.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/Graficos/2016/comida-sana/Plaguicidas\\_en\\_agua\\_ok\\_EM.pdf](http://www.greenpeace.org/mexico/Global/mexico/Graficos/2016/comida-sana/Plaguicidas_en_agua_ok_EM.pdf)
- Badii MH, Tejada LO, Flores AE, Lopez CE y Quiróz H. 2000. Historia, fundamentos e importancia. Pp: 3-17. In: Badii MH, Flores AE y Galán LJ (eds.). *Fundamentos y Perspectivas de Control Biológico*. UANL, Monterrey.
- Bais HP, Fall R and Vivanco JM. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of Arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*. 134:307-319. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- Bayer AG. 2016. Serenade, Fungicida Biológico, Mejorando la Protección de Cultivos. Bayer Crop Science. Folleto Serenade. Santiago, Chile. 5p.
- Bayer CropScience. 2016. Serenade ASO. Disponible en línea : [http://www.cropscience.bayer.cl/upfiles/etiquetas/SERENADE\\_ASO\\_20170517.pdf](http://www.cropscience.bayer.cl/upfiles/etiquetas/SERENADE_ASO_20170517.pdf)
- Boller T and Felix G. 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review Plant Biology*. 60:379-406. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Bowman SM and Free SJ. 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28:799-808. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20441>
- CALS, College of Agriculture and Life Sciences. 2016. Bacterial Endospores. Department of Microbiology. Cornell University. Ithaca, Nueva York 14850, EE. UU. Disponible en línea: <https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/bacterial-endospores>
- Calvo P y Zúñiga D. 2010. Caracterización fisiológica de cepas de *Bacillus spp.* aisladas de la rizósfera de papa (*Solanum tuberosum*). *Ecología Aplicada*. 9:31-39. <http://dx.doi.org/10.21704/rea.v9i1-2.393>
- Cawoy H, Debois D, Franzil L, De Pauw E, Thonart P and Ongena M. 2015. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*. 8:281-295. <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12238>
- Ceuppens S, Boon N and Uyttendaele M. 2013. Diversity of *Bacillus cereus* group strains is reflected in their broad range of pathogenicity and diverse ecological lifestyles. *FEMS Microbiology Ecology*. 84:433-450. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12110>
- Chandler D, Bailey AS, Tatchell GM, Davison G, Graves J and Grant WP. 2011. The development, regulation and use of biopesticides for integrated pest management. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences*. 366:1987-1998. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2010.0390>
- Chen CY, Wang YH and Huang CJ. 2004. Enhancement of the antifungal activity of *Bacillus subtilis* F29-3 by the chitinase encoded by *Bacillus circulans* chiA gene. *Canadian Journal of Microbiology*. 50:451-454. <http://dx.doi.org/10.1139/w04-027>
- Chen YY, Chen PC, Tsay TT. 2016. The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthora capsica*. *Biological Control*. 98:34-42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.02.011>
- Cheng XL, Liu CJ and Yao JW. 2010. The Current Status, Development Trend and Strategy of the Bio-pesticide Industry in China. *Hubei Agricultural Sciences*. 49:2287-2290. Disponible en línea: [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTOTAL-HBHY201009086.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-HBHY201009086.htm)
- Chien-Jui H, Tang-Kai W, Shu-Chung C and Chao-Ying C. 2004. Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol Agent, *Bacillus cereus* 28-9. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*. 38:82-88. <http://dx.doi.org/10.5483/BMBRep.2005.38.1.082>
- Choudhary DK and Johri BN. 2009. Interactions of *Bacillus spp.* and plants with special reference to induced systemic resistance (ISR). *Microbiological Research*. 164:493-513. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2008.08.007>
- Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X and Borriss R. 2015. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Frontiers in Microbiology*. 6:780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00780>



- Cohn F. 1872. Untersuchungen Über Bakterien. Beitrage zur Biologie Pflanz. 1:127-1224.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C and Barka EA. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied Environmental Microbiology*. 71:4951-4959. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Curtis TP, Sloan WT and Scannel JW. 2002. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *PNAS USA*. 99:10494-10499. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.142680199>
- de Olivar CG, Castillo CCE, Cañizales BLM y Olivar R. 2008. Control Biológico: Una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Academia Trujillo Venezuela*. 7:50-74. Disponible en línea: <http://revistas.saber.ula.ve/index.php/academia/article/view/6030/5831>
- de Souza R, Ambrosini A and Passaglia LMP. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and Molecular Biology*. 38:401-419. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Environmental protection agency, EPA. 2004. Office of Pesticide Programs Biopesticides and Pollution Prevention Division (7511C). Disponible en línea: [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/ppls/070127-00012-20140207.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/070127-00012-20140207.pdf)
- Environmental protection agency, EPA. 2004. United States environmental protection agency. Disponible en línea: [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/ppls/069592-00012-20040902.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/069592-00012-20040902.pdf)
- Environmental protection agency, EPA. 2007. Office of Pesticide Programs Biopesticides and Pollution Prevention Division (7611C). Disponible en línea: [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/ppls/000004-00252-20070112.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/000004-00252-20070112.pdf)
- Environmental protection agency, EPA. 2013. Office of chemical safety and pollution prevention. Disponible en línea: [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/ppls/070127-00003-20130906.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/070127-00003-20130906.pdf)
- Errington J. 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*. 1:117-126. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro750>
- European Food Safety Authority, EFSA. 2015. Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. 2: Suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2015. *EFSA Journal*. 13:4138. <http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4138>
- Falardeau J, Wise C, Novitsky L and Avis TJ. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*. 39:869-878. <http://dx.doi.org/10.1007/s10886-013-0319-7>
- FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2014. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. FAO. Viale delle Terme di Caracalla 00153 Roma, Italia. Disponible en línea: <http://www.fao.org/3/a-i4040s.pdf>
- Faraldo-Gómez JD and Sansom MS. 2003. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 4:105-116. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm1015>
- Fgaier H and Eberl HJ. 2011. Antagonistic control of microbial pathogens under iron limitations by siderophore producing bacteria in a chemostat setup. *Journal of Theoretical Biology*. 273:103-114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2010.12.034>
- Galindo E, Serrano-Carreón L, Gutiérrez CR, Balderas-Ruiz KA, Muñoz-Celaya AL, Mezo-Villalobos M y Arroyo-Colín J. 2015. Desarrollo histórico y los retos tecnológicos y legales para comercializar Fungifree AB®, el primer biofungicida 100% mexicano. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 18:52-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.recqb.2015.05.005>
- Glasset B, Herbin S, Guillier L, Vignaud M, Grout J, Pairaud S and Ramarao N. 2016. *Bacillus cereus*-induced food-borne outbreaks in France, 2007 to 2014: epidemiology and genetic characterisation. *Eurosurveillance*. 21:1-11. <https://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.es.2016.21.48.30413>
- Gong M, Wang JD, Zhang J, Yang H, Lu XF, Pei Y and Cheng JQ. 2006. Study of the Antifungal Ability of *Bacillus subtilis* Strain PY-1 *in vitro* and Identification of its Antifungal Substance (Iturin A). *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 38:233-240. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00157.x>
- Hayat R, Ali S, and Amara U. 2010. Soil beneficial bacteria and their role in plant growth promotion: a review. *Annals of Microbiology*. 60:579-598. <http://dx.doi.org/10.1007/s13213-010-0117-1>
- Hoffmaster AR, Hill KK, Gee JE, Marston CK, De B K, Popovic T, Sue D, Wilkins PP, Avashia SB, Drumgoole R, Helma CH, Ticknor LO, Okinaka RT and Jackson PJ. 2006. Characterization of *Bacillus cereus* isolates associated with fatal pneumonias: strains are closely related to *Bacillus anthracis* and harbor *B. anthracis* virulence genes. *Journal of Clinical Microbiology*. ca44:3352-3360. <https://dx.doi.org/10.1128/jcm.00561-06>
- Höfte H and Whiteley H. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiological Reviews*. 53:242-255. Disponible en línea: <http://mmb.asm.org/content/53/2/242.long>
- ISAGRO. 2017. Isagro, TAEGRO 2, biofungicide – Product Training. Disponible en línea: <http://www.isagro-usa.com/assets/taegro-2-training-presentation-usa-final-2017-05-02.pdf>
- Jaaffar AKM, Parejko JA, Paulitz TC, Weller DM and Thomashow LS. 2017. Sensitivity of *Rhizoctonia* Isolates to Phenazine-1-Carboxylic Acid and Biological Control by Phenazine-Producing *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. 107:692-703. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-07-16-0257-R>
- Kim JS, Lee J, Lee CH, Woo SY, Kamg H, Seo SG and Kim SH. 2015. Activation of pathogenesis-related genes by the rhizobacterium, *Bacillus* sp. JS, which induces systemic resistance in tobacco plants. *Plant Pathology Journal*. 31:195-201. <http://dx.doi.org/10.5423/PPJ.NT.11.2014.0122>
- Kim MJ, Han JK, Park JS, Lee JS, Lee SH, Cho JI and Kim KS. 2016. Various Enterotoxin and Other Virulence Factor Genes Widespread Among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25:872-879 <https://dx.doi.org/10.4014/jmb.1502.02003>

- Kim Y, Kim H, Kim K, Chon J, Kim D and Seo K. 2016. High Occurrence Rate and Contamination Level of *Bacillus cereus* in Organic Vegetables on Sale in Retail Markets. *Foodborne Pathogens and Disease*. 13:656-660. <https://dx.doi.org/10.1089/fpd.2016.2163>
- Kinsinger RF, Shirk MC and Fall R. 2003. Rapid surface motility in *Bacillus subtilis* is dependent on extracellular surfactin and potassium ion. *Journal of Bacteriology*. 185:5627-5631. Disponible en línea: <http://jb.asm.org/content/185/18/5627.long>
- Kishore GK, Pande S and Podile AR. 2005. Biological Control of Late Leaf Spot of Peanut (*Arachis hypogaea*) with Chitinolytic Bacteria. *Phytopathology*. 95:1157-1165. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-95-1157>
- Kumar A, Prakash A and Johri BN. 2011. *Bacillus* as PGPR in Crop Ecosystem. *Bacteria in Agrobiolgy: Crop Ecosystems*. 37-59. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2)
- Latgé JP. 2007. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*. 66:279-290. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05872.x>
- Layton C, Maldonado E, Monroy L, Corrales LC y Sánchez LC. 2011. *Bacillus* spp.; perspectiva de su efecto biocontrolador mediante antibiosis en cultivos afectados por fitopatógenos. *Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 9:177-187. <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.501>
- Li B, Li Q, Xu Z, Zhang N, Shen Q and Zhang R. 2014. Response of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production. *Frontiers in Microbiology*. 5:636. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00636>
- Li L, Ma J, Ibekwe AM, Wang Q and Yang C. 2016. Cucumber Rhizosphere Microbial Community Response to Biocontrol Agent *Bacillus subtilis* B068150. *Agriculture*. 6:1-15. <https://dx.doi.org/10.3390/agriculture6010002>
- Li Y, Gu Y, Li J, Xu M, Wei Q and Wang Y. 2015. Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers Microbiology*. 6:883. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00883>
- Liu D, Cai J, Xie C, Liu C and Chen Y. 2010. Purification and partial characterization of a 36-kDa chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *colmeri*, and its biocontrol potential. *Enzyme Microbial Technology*. 46:252-256. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzymtec.2009.10.007>
- Liu Y, Lai Q, Göker M, Meier-kolthoff JP, Wang M, Sun Y and Shao Z. 2015. Genomic insights into the taxonomic status of the *Bacillus cereus* group. *Scientific Reports*. 5:1-11. <http://dx.doi.org/10.1038/srep14082>
- López-Fernández S, Compat S, Vrhovsek U, Bianchedi PL, Sessitsch A, Pertot I and Campisano A. 2016. Grapevine colonization by endophytic bacteria shifts secondary metabolism and suggests activation of defense pathways. *Plant and Soil*. 405:155-175. <http://dx.doi.org/10.1007/s11104-015-2631-1>
- LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. 2016. Genus *Bacillus*. Microbiology Society. Charles Darwin House, 12 Roger St, London WC1N 2JU, United Kingdom. <http://www.bacterio.net/bacillus.html> (consulta, mayo 2017)
- Martínez-Absalón S, Rojas-Solís D, Hernández-León R, Prieto-Barajas C, Orozco-Mosqueda MC, Peña-Cabriales JJ, Sakuda S, Valencia-Cantero E and Santoyo G. 2014. Potential use and mode of action of the new strain *Bacillus thuringiensis* UM96 for the biological control of the gray mold phytopathogen *Botrytis cinerea*. *Biocontrol Science Technology*. 24:1349-1362. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2014.940846>
- Maughan H and van der Auwera G. 2011. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution*. 11:789-797. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.001>
- May JJ, Wendrich TM and Marahiel MA. 2001. The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *Journal of Biological Chemistry*. 276:7209-7217. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M009140200>
- Mc Spadden GBB. 2004 Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. *Phytopathology*. 94:1252-1258. <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO.2004.94.11.1252>
- Meena KR and Kanwar SS. 2015. Lipopeptides as the Antifungal and Antibacterial Agents: Applications in Food Safety and Therapeutics. *BioMed Research International*. 2015:1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/473050>
- Moebius N, Üzümlü Z, Dijksterhuis J, Lackner G and Hertweck C. 2014. Active invasion of bacteria into living fungal cells. *Microbiology and infectious disease*. 1:1-20. <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.03007>
- Mora I, Cabrefiga J and Montesinos E. 2015. Cyclic Lipopeptide Biosynthetic Genes and Products, and Inhibitory Activity of Plant-Associated *Bacillus* against Phytopathogenic Bacteria. *PLoS One*. 10: e0127738. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0127738>
- Neilands JB. 1995. Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*. 270:26723-26726. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.270.45.26723>
- Niedmann LL y Meza-Basso L. 2006. Evaluación de Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* Como una Alternativa de Manejo Integrado de la Polilla del Tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) en Chile. *Agricultura Técnica*. 66:235-246. <http://dx.doi.org/10.4067/S0365-28072006000300002>
- Novozymes. 2017. EcoGuard-GN, BioFungicide. Disponible en línea: [http://www.kellysolutions.com/ere-news/documentsubmit/KellyData%5CNC%5Cpesticide%5CProduct%20Label%5C70127%5C70127-3%5C70127-3\\_ROOTS\\_ECOGUARD\\_GN\\_BIOFUNGICIDE\\_12\\_9\\_2010\\_2\\_33\\_14\\_PM.pdf](http://www.kellysolutions.com/ere-news/documentsubmit/KellyData%5CNC%5Cpesticide%5CProduct%20Label%5C70127%5C70127-3%5C70127-3_ROOTS_ECOGUARD_GN_BIOFUNGICIDE_12_9_2010_2_33_14_PM.pdf)
- OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. 2009. Series on pesticides no. 44. Report of Workshop on the Regulation of Biopesticides: Registration and Communication Issues. Disponible en línea: [http://www.oecd.org/env/ehs/pesticides-biocides/ENV-JM-MONO\(2009\)19-ENG.pdf](http://www.oecd.org/env/ehs/pesticides-biocides/ENV-JM-MONO(2009)19-ENG.pdf)
- Oh, M., Ham, J. and Cox, J. M. 2012. Diversity and toxigenicity among members of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology*, 152:1-8. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.018>

- Olson S, Ranade A, Kurkijy N, Pang K and Hazekamp C. 2013. Green Dreams or Growth Opportunities: Assessing the Market Potential for "Greener" Agricultural Technologies. Lux Research Inc, Boston, MA, USA. Disponible en línea: <https://portal.luxresearchinc.com/research/tidbit/15753>
- Olson S. 2015. An analysis of the biopesticide market now and where it is going. *Outlooks on Pest Management*. 26:203-206. [http://dx.doi.org/10.1564/v26\\_oct\\_04](http://dx.doi.org/10.1564/v26_oct_04)
- Ongena M and Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiology*. 16:115-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Pal KK and Gardener BM. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*. 1:1-25. <http://dx.doi.org/10.1094/PHI-A-2006-1117-02>
- Pavic S, Brett M, Petric N, Lastre D, Smoljanovic M and Atkinson M. 2005. An outbreak of food poisoning in a kindergarten caused by milk powder containing toxigenic *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene*. 56:20-22. Disponible en línea: <https://www.tib.eu/en/search/id/BLSE%3ARN163847095/An-outbreak-of-food-poisoning-in-a-kindergarten/>
- Pérez-García A, Romero D and de Vicente A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*. 22:187-193. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2010.12.003>
- Pérez-Montaño F, Alias-Villegas RA, Bellogín RA, del Cerro P, Espuny MR, Jiménez-Guerrero I, López-Baena FJ, Ollero FJ and Cubo T. 2014. Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological Research*. 169:325-336. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.011>
- Piechulla B, Lemfack MC and Kai M. 2017. Effects of discrete bioactive microbial volatiles on plants and fungi. *Plant, Cell & Environment*. 40: 2042-2067. <http://dx.doi.org/10.1111/pce.13011>
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SC and Bakker PA. 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annual Review of Phytopathology*, 52:347-375. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102340>
- Pieterse CMJ. 1998. A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant cell*. 10:1571-1580. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.9.1571>
- Porcar M y Juárez V. 2004. Aislamiento y establecimiento de una colección de *Bacillus thuringiensis*. Pp:69-100. In: Bravo A y Cerón J (eds). *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Portela-Dussán DD, Chaparro-Giraldo A y López-Pazos SA. 2013. La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Revista NOVA Publicación Científica en Ciencias Biomédicas*. 11:87-96. <http://dx.doi.org/10.22490/24629448.1031>
- Pretali L, Bernardo L, Butterfield TS, Trevisan M and Lucini L. 2016. Botanical and biological pesticides elicit a similar Induced Systemic Response in tomato (*Solanum lycopersicum*) secondary metabolism. *Phytochemistry*, 130:56-63. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.04.002>
- Raaijmakers JM and Mazzola M. 2012. Diversity and Natural Functions of Antibiotics Produced by Beneficial and Plant Pathogenic Bacteria. *Annual Reviews of Phytopathology*. 50:403-424. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-081211-172908>
- Reyes A, Ricón G, López L, Martínez ZE y Quiñones E. 2015. Lucha entre microbios: una herramienta para el control de enfermedades de plantas. *Revista Digital Universitaria UNAM*. 16:2-15. Disponible en línea: <http://www.revista.unam.mx/vol.16/num11/art92/>
- Rudrappa T, Czymme KJ, Paré PW and Bais HP. 2008. Root-Secreted Malic Acid Recruits Beneficial Soil Bacteria. *Plant Physiology*. 148:1547-1556. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.108.127613>
- Ryu C-M, Hu C-H, Reddy MS and Kloepper JW. 2003. Different signaling pathways of induced resistance by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana* against two pathovars of *Pseudomonas syringae*. *New Phytologist*. 160:413-20. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00883.x>
- Sainju UM, Lissens AW, Allen BL, Stevens WB and Jabro J. 2016. Nitrogen balance in response to dryland crop rotations and cultural practices. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 233:25-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2016.08.023>
- Sauka DH y Benintende GB. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Revista argentina de microbiología*. 40:124-140. Disponible en línea: <http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v40n2/v40n2a13.pdf>
- Scharf DH, Heinekamp T and Brakjage AA. 2014. Human and Plant Fungal Pathogens: The Role of Secondary Metabolites. *PLoS Pathogens*. 10(1):e1003859. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003859>
- Selim HMM, Gomaa NM and Essa AMM. 2016. Application of endophytic bacteria for the biocontrol of *Rhizoctonia solani* (Cantharellales: Ceratobasidiaceae) damping-off disease in cotton seedlings. *Biocontrol Science and Technology*. 27:81-95. <http://dx.doi.org/10.1080/09583157.2016.1258452>
- Shafi J, Tian H and Ji M. 2017. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 31:446-459. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Singh UB, Malvivya D, Wasiullah, Singh S, Imran M, Pathak N, Alam M, Rai JP, Singh RK, Sarma Bk, Sharma PK and Sharma AK. 2016. Compatible salt-tolerant rhizosphere microbe-mediated induction of phenylpropanoid cascade and induced systemic responses against *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Applied Soil Ecology*. 108:300-306. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.09.014>
- Soberón M y Bravo A. 2007. Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotecnología*. 14:303-314. Disponible en línea: [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro\\_25\\_aniv/capitulo\\_27.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_27.pdf)
- Tamez GP, Galán WLJ, Medrano RH, García GC, Rodríguez PC, Gómez FRA y Tamez GGRS. 2001. Bioinsecticidas:

- su empleo, producción y comercialización en México. Ciencia UANL. 4:143-152. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/402/40240205.pdf>
- Tejera-Hernández B, Rojas-Badía MM y Heydrich-Pérez M. 2011. Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control de hongos fitopatógenos. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 42:131-138. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181222321004.pdf>
- Thyagarajan SI, Ramanathan G, Singaravelu S, Kandhasamy S, Perumal PT and Sivagnam UT. 2017. Microbial Siderophore as MMP inhibitor: An interactive approach on wound healing application. Wound Medicine. 17:7-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wndm.2016.12.002>
- Touré Y, Ongena M, Jacques P, Guiró A and Thonart P. 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. Journal of Applied Microbiology. 96: 1151-1160. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02252.x>
- Trabelsi D and Mhamdi R. 2013. Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. BioMed Research International. ID 863240:1-11. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/863240>
- Valent BioSciences. 2017. DiPel WG (*Bacillus thuringiensis*). Disponible en línea: [http://www.cropscience.bayer.cl/upfiles/etiquetas/Dipel\\_WG.pdf](http://www.cropscience.bayer.cl/upfiles/etiquetas/Dipel_WG.pdf)
- Van der Heijden M, Bardgett R and van Straalen N. 2008. The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. Ecology Letters. 11: 296-310. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1461-0248.2007.01139.x>
- Vargas-Ayala R, Rodríguez-Kábana R, Morgan-Jones G, McInroy JA and Klopper JW. 2000. Shifts in Soil Microflora Induced by Velvetbean (*Mucuna deeringiana*) in Cropping Systems to Control Root-Knot Nematodes. Biological Control. 17:11-22. <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0769>
- Vázquez-Ramírez MF, Rangel-Nnñez JC, Ibarra JE y del Rincón-Castro MC. 2015. Evaluación como agentes de control biológico y caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda*. Interciencia. 40:397-402. Disponible en línea: <http://www.redalyc.org/pdf/339/33938675006.pdf>
- Vlot AC, Dempsey DA and Klessig DF. 2009. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. Annual Review of Phytopathology. 47:177-206 <http://doi.org/10.1146/annurev.phyto.050908.135202>
- Wang W, Chen LN, Wu H, Zang H, Yang Y, Xie S and Gao X. 2013. Comparative proteomic analysis of rice seedlings in response to inoculation with *Bacillus cereus*. Letters in Applied Microbiology. 56(3):208-215. <http://dx.doi.org/10.1111/lam.12035>
- Wang X, Wang L, Wang J, Jin P, Liu H and Zheng Y. 2014. *Bacillus cereus* AR156-Induced Resistance to *Colletotrichum acutatum* Is Associated with Priming of Defense Responses in Loquat Fruit. PLoS ONE. 9(11):e112494. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0112494>
- Wilson BR, Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K and Tsuji Y. 2016. Siderophores in Iron Metabolism: From Mechanism to Therapy Potential. Trends in Molecular Medicine. 22:1077-1090. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2016.10.005>
- Xu C, Wang BC, Yu Z and Sun M. 2014. Structural Insights into *Bacillus thuringiensis* Cry<sub>1</sub> Cyt and Parasporin Toxins. Toxins. 6:2732-2770. <http://dx.doi.org/10.3390/toxins6092732>
- Xu Z, Shao J, Li B, Yan X, Shen Q and Zhang R. 2013. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. Applied Environmental Microbiology. 79:808-815. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02645-12>
- Yan L, Jing T, Yujun Y, Bin L, Hui L and Chun L. 2011. Biocontrol Efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and Characterization of an Antifungal Chitinase. Chinese Journal Chemical Engineering. 19:128-134. [http://dx.doi.org/10.1016/s1004-9541\(09\)60188-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1004-9541(09)60188-9)
- You C, Zhang C, Kong F, Feng C and Wang J. 2016. Comparison of the effects of biocontrol agent *Bacillus subtilis* and fungicide metalaxyl – mancozeb on bacterial communities in tobacco rhizospheric soil. Ecological Engineering. 91:119-125. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoeng.2016.02.011>
- Yu X, Ai C, Xin L and Zhou G. 2011. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on *Fusarium* wilt and promotes the growth of pepper. European Journal of Soil Biology. 47:138-145. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejsobi.2010.11.001>
- Zhang B, Qin Y, Han Y, Dong C, Li P and Shang Q. 2016. Comparative proteomic analysis reveals intracellular targets for bacillomycin L to induce *Rhizoctonia solani* Kühn hyphal cell death. Biochimica Biophysica Acta (BBA), Proteins and Proteomics. 1864:1152-1159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.06.003>
- Zhang X, Huang Y, Harvey PR, Ren Y, Zhang G, Zhou H and Yang H. 2012. Enhancing plant disease suppression by *Burkholderia vietnamiensis* through chromosomal integration of *Bacillus subtilis* chitinase gene *chi113*. Biotechnology Letters. 34:287-293. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-011-0760-z>