

Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*

Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*

Rocío Jiménez-Delgadillo, Silvia Edith Valdés-Rodríguez, Víctor Olalde-Portugal*, Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN, Unidad Irapuato Km. 9.6 Libramiento Norte Carretera Irapuato-León, CP. 36821, Irapuato, Guanajuato, México; Rosario Abraham-Juárez, Departamento de Alimentos, División de Ciencias de la Vida. Campus Irapuato-Salamanca. Universidad de Guanajuato, Km9 carretera Irapuato-Silao, CP. 36500, Irapuato, Guanajuato, México; José Luis García-Hernández, Facultad de Agricultura y Zootecnia, Universidad Juárez del Estado de Durango, Ej. Venecia, Gómez Palacio, CP. 35000, Durango, México. *Autor para correspondencia: v_olalde@yahoo.com.mx.

Recibido: 15 de Noviembre, 2017. Aceptado: 30 de Abril, 2018.

Jiménez-Delgadillo R, Valdés-Rodríguez SE, Olalde-Portugal V, Abraham-Juárez R, García-Hernández JL. 2018. Effect of pH and temperature on the growth and antagonistic activity of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani*. Revista Mexicana de Fitopatología 36(2) 256-275.

DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1711-3

Primera publicación DOI: 05 de Mayo, 2018.

First DOI publication: May 05, 2018.

Resumen. En este estudio, se evaluaron los efectos de las condiciones ambientales (pH y temperatura) sobre la tasa de crecimiento y el efecto inhibitorio de diferentes cepas de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. Las cepas de *B. subtilis* se cultivaron en caldo de infusión de papa. Se analizaron el comportamiento fisiológico y la tasa de crecimiento (dN / dt) de las cepas bajo diferentes condiciones de pH y temperatura. Las cepas mostraron un comportamiento diferente, lo que permitió establecer las condiciones óptimas y subóptimas

Abstract. In this study, the effects of environmental conditions (pH and temperature) on the growth rate and the inhibitory effect of different strains of *Bacillus subtilis* on *Rhizoctonia solani* were evaluated. Strains of *B. subtilis* were grown in potato infusion broth. The physiological behavior and the growth rate (dN / dt) of the strains were analyzed under different pH and temperature conditions. The strains behaved differently, which allowed establishing optimum and suboptimal growth conditions for each strain. Cell-free supernatants obtained under different growth conditions were used in a quantitative test of in vitro antagonist activity against *R. solani*. This study showed that the inhibitory effect of the strains occurs mainly in the stationary phase.

Key words: biocontrol, growth rate, antagonism, physiological state

The genus *Bacillus* includes a variety of industrially important species that are commonly

de crecimiento para cada cepa. Los sobrenadantes exentos de células obtenidos en diferentes condiciones de crecimiento se usaron en una prueba cuantitativa de actividad antagonista *in vitro* frente a *R. solani*. Se demostró que el efecto inhibitorio de las cepas se presenta principalmente en la fase estacionaria.

Palabras clave: biocontrol, tasa de crecimiento, antagonismo, estado fisiológico.

El género *Bacillus* comprende diversas especies de importancia industrial que por lo general se utilizan en la industria de la fermentación (Veith *et al.*, 2004; Rey *et al.*, 2004; Fujinami y Fujisawa, 2010). Al igual que muchas de las especies del género *Bacillus*, *Bacillus subtilis* es una bacteria muy común, pues se encuentra en el suelo, el agua, el aire y en materia vegetal en descomposición (Ashlee *et al.*, 2008). Las bacterias del género *Bacillus* forman esporas, es decir, forman una pared gruesa que rodea su ADN y otras estructuras celulares internas. Esta característica las hace resistentes e inmunes a temperaturas extremas, químicos, factores ambientales e incluso algunos tipos de radiación, y, por tanto, se pueden utilizar en procesos industriales. Las bacterias tienen gran capacidad de mutación genética y, por ello, se utilizan en experimentos en el laboratorio (Ashlee *et al.*, 2008; Schallmeyer *et al.*, 2004). Al igual que la mayoría de sus parientes más cercanos, *B. subtilis* es no patógeno, se puede cultivar y manipular genéticamente con relativa facilidad y es eficaz en la secreción de proteínas y metabolitos (Matarante *et al.*, 2004). Además, muchas bacterias grampositivas que viven en complejas comunidades ecológicas, como las que se encuentran en ambientes terrestres y acuáticos, producen una gran variedad de compuestos especiales que son valiosos por sus propiedades farmacológicas

used in the fermentation industry (Veith *et al.*, 2004; Rey *et al.*, 2004; Fujinami y Fujisawa, 2010) *Bacillus subtilis*, as with many in the *Bacillus* genus, is an extremely common bacterium. It is found in soil, water, air, and decomposing plant matter (Ashlee, *et al.*, 2008.). Bacteria in the *Bacillus* genus are spore-forming, which means that they create a thick wall which surrounds their DNA and other internal cell structures. In this way, they are hardy and impervious to extreme temperatures, chemicals, environmental factors, even some types of radiation. As a consequence, they can be use in industrial processes. Bacteria are highly responsive to genetic mutation, resulting in experimental uses in a laboratory setting (Ashlee *et al.*, 2008; Schallmeyer *et al.*, 2004). Like most of its closest relative *B. subtilis* is non-pathogenic, the relative ease of cultivation and genetic manipulation, and the efficient secretion of proteins and metabolites (Matarante *et al.*, 2004). Furthermore, many gram-positive bacteria that inhabit complex ecological communities, such as those within soil and aquatic environments, produce a great variety of special compounds that are valuable for their pharmacological and antimetabolic properties. *Bacillus subtilis* is used to produce many antibiotics, such as difficidin, oxydifficidin, subtilosin A, bacillomycin B, and bacitracin, bacilysin which is helpful in treating bacterial skin infections and preventing infection in minor cuts and burns (Shelburne *et al.*, 2007; Stein 2005; Tamehiro *et al.*, 2002) *Bacillus subtilis* is also used as a fungicide (Savluchinske *et al.*, 2004). The bacteria colonize the root system, leaving no room for fungal diseases organisms; it is used on agricultural seeds of vegetables, its multicellular behavior and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent (Bais *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2006; Leclère *et al.*, 2005; Nagórska

y antimetabólicas. *Bacillus subtilis* se utiliza en la producción de numerosos antibióticos, como difidina, oxidificidina, subtilisina A, bacilomicina B y bacitracina, así como bacilisocina, auxiliar en el tratamiento de infecciones cutáneas causadas por bacterias, y evita infecciones en cortaduras y quemaduras leves (Shelburne *et al.*, 2007; Stein, 2005; Tamehiro *et al.*, 2002). *Bacillus subtilis* se utiliza también como fungicida (Savluchinske *et al.*, 2004). Las bacterias colonizan el sistema radicular de las plantas y no permiten que se desarrollen organismos causantes de enfermedades fúngicas; en la agricultura se utiliza en semilla de verduras, ya que su comportamiento multicelular y la producción de una gran variedad de sustancias tóxicas respaldan el uso de *Bacillus subtilis* como un potente agente de biocontrol (Bais *et al.*, 2004; Gong *et al.*, 2006; Leclère *et al.*, 2005; Nagórska *et al.*, 2007). La producción de estos metabolitos sería decisiva en la formulación de estrategias para su adaptación al ambiente terrestre que ocupa la planta, lo cual contribuiría a la supervivencia del organismo en sistemas ecológicos complejos. Estos bacilos genéticamente diversos muestran resultados prometedores que justificarían promover su desarrollo en varios cultivos para el control biológico de diversos fitopatógenos (Bapat y Shah, 2000; Bernal *et al.*, 2002; Kim, 2010). Desafortunadamente, la variabilidad en el comportamiento inherente de muchos agentes de biocontrol entre los sitios en el campo y los ciclos de cultivo ha impedido el desarrollo comercial de agentes biológicos de uso agrícola (Pal y Gardener, 2006). Mucha de esta variabilidad ha sido atribuida a las diferencias entre las propiedades de los hábitats naturales de los agentes de biocontrol y los lugares donde éstos son aplicados (O'Callaghan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005). Conocer los factores ambientales que regulan la biosíntesis de los compuestos antimicrobianos por las cepas de *Bacillus* es un paso fundamental para

et al., 2007). The production of these metabolites may be crucial to develop strategies to adapt themselves to the soil environment occupied by the plant, which contributes to the survival of the organism in complex ecological systems. The genetically diverse bacilli show promising results for the promotion of growth on several crops and the biological control of various plant pathogens (Bapat y Shah 2000; Bernal *et al.* 2002; Kim 2010). Unfortunately, the inherent variable performance of most biocontrol agents between field locations and cropping seasons has hampered the commercial development of biological agents for use in agriculture (Pal y Gardener, 2006). Most of this variability has been attributed to differences between properties of the natural habitats of biocontrol agents and the places where they are applied (O'Callaghan *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005). Understanding the environmental factors that regulate the biosynthesis of antimicrobial compounds by strains of *Bacillus* is an essential step in improving their antagonistic activities, which have not been adequately described (Bloemberg y Lugtenberg, 2001). Physiological studies are necessary to develop and optimize the use of biocontrol agents as plant protectants. It is important to establish the relationship between proliferation and status of the bacteria, as well as the influence of environmental factors that modulate the biosynthesis of antifungal compounds. Other factors that must be considered are the type and concentration of carbon and nitrogen sources, oxygen tension, osmotic pressure, pH, temperature, and water availability (Kamney, 2008). These studies will provide essential information for the selection of new strains and products for the biological control of plant pathogens. In the current study, the effects of pH and temperature on antagonistic activity of different strains of *Bacillus subtilis* were evaluated, while keeping in mind the physiological stage of development.

mejorar sus actividades antagonicas, las cuales no han sido adecuadamente descritas (Bloemberg y Lugtenberg, 2001). Es necesario realizar estudios fisiológicos para crear y optimizar el uso de agentes de biocontrol como protectores de plantas. Es importante establecer la relación entre la proliferación y las condiciones de las bacterias, así como la influencia de los factores ambientales que modulan la biosíntesis de los compuestos antifúngicos. Otros factores que se deben considerar son el tipo y la concentración de las fuentes de carbono y nitrógeno, la tensión de oxígeno, la presión osmótica, el pH, la temperatura y la disponibilidad de agua (Kamney, 2008). Estos estudios proporcionarían información básica para seleccionar nuevas cepas y nuevos productos para el control biológico de los fitopatógenos. En el presente estudio se evaluaron los efectos de la temperatura y el pH en la actividad antagonista de diferentes cepas de *Bacillus subtilis* y, al mismo tiempo, se consideró la fase fisiológica del desarrollo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas microbianas, medios y condiciones de cultivo

Rhizoctonia solani se obtuvo de la colección del laboratorio de bioquímica del Cinvestav-Irapuato. La cepa se cultivó principalmente en caldo de infusión de papa (Johnson y Curl, 1972). Las cepas BEB-8 y BEB-13 de *Bacillus subtilis* fueron aisladas de la rizosfera de un campo de papas en el estado de Guanajuato, México. La supuesta identificación se realizó con Microplacas Biolog GP2 (Biolog, Hayward, CA, EE UU). Las microplacas fueron inoculadas siguiendo las instrucciones de fabricante. La cepa PY-79 de *Bacillus subtilis* (Laboratorio de Bacteriología Molecular; Cinvestav-

MATERIALS AND METHODS

Microbial strains, culture media and conditions

Rhizoctonia solani, was obtained from the ecological biochemistry laboratory collection at Cinvestav-Irapuato. This strain was primarily grown on potato-infusion broth (Johnson y Curl, 1972). The strain BEB-8 and BEB-13 of *Bacillus subtilis* were isolated from the rhizosphere of a potato field in the state of Guanajuato, México. Putative identification was made using Biolog GP2 MicroPlates (Biolog, Hayward, CA, USA). The microplates were inoculated according to the manufacturer's instructions. The *Bacillus subtilis* PY-79 strain (Molecular Bacteriology Laboratory; Cinvestav-Irapuato) was used as a negative control for antagonistic activity; while *Bacillus subtilis* Kodiak (GBO3) obtained as a dry spore formulation (Bayer Crop Science Kansas City, MO US) was used as a positive control for biological activity. For long-term storage, bacterial cultures were maintained at -80 °C in potato-infusion agar containing 20% glycerol.

Bacterial growth rate

Growth rate studies were carried out in flasks containing 100 mL of potato-infusion broth. Pre-inoculum densities were adjusted to an initial population density of 10^5 cfu /mL. An inoculum (1% v/v) of the different strains of *Bacillus subtilis* was added to the liquid medium and incubated at 28 °C, with continuous stirring at 120 rpm; the optimal density was monitored at 535 nm on a 50 Cary Spectronic spectrophotometer (Varian, Australia Pty Lid) every hour for up to 18 h. The bacterial concentration (cfu/ mL) was estimated in plates containing the potato infusion with 1.5% (w/v) agar (BD, Bioxon, Becton-Dickinson), using

Irapuato) se utilizó como control negativo en la actividad antagonista, en tanto que la cepa Kodiak (GBO3) de *Bacillus subtilis*, que se obtuvo como una formulación de esporas secas (Bayer Crop Science Kansas City, MO, EE UU), se utilizó como control positivo en la actividad biológica. Para su almacenamiento prolongado, los cultivos de bacterias se mantuvieron a -80 °C en agar infusión de papa con glicerol al 20%.

Tasa de crecimiento bacteriano

Los estudios de la tasa de crecimiento se realizaron en frascos con 100 mL de caldo de infusión de papa. Antes de aplicar el inóculo, las densidades de población se ajustaron a una densidad inicial de 10^5 cfu /mL. Se agregó inóculo (1% v/v) de las diferentes cepas de *Bacillus subtilis* al medio líquido y se incubaron a 28 °C, moviendo constantemente a 120 rpm; la densidad óptima se monitoreó a 535 nm en un espectrofotómetro Cary Spectronic 50 (Varian, Australia Pty Ltd) cada hora durante 18 h. La concentración bacteriana (cfu/ mL) se estimó en placas que contenían infusión de papa con agar al 1.5% (w/v) (BD, Bioxon, Becton-Dickinson) en un Giraplasas Automático en Espiral 4000 (Spiral Biotech, Inc., EE UU). Los parámetros cinéticos y el momento en que ocurrieron las fases del crecimiento se obtuvieron aplicando el modelo Verhulst-Pearl (Slater, 1985) o el modelo logístico, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$N = \frac{K}{1 + \exp^{a - \mu^* t}}$$

En este modelo se utiliza un factor de correlación no lineal que es calculado estadísticamente por el programa SYSTAT (Inc. Programa para Windows V11.0).

an Automated Spiral Plater 4000 (Spiral Biotech, Inc. USA). The kinetic parameters and the time of occurrence of the phases of growth were obtained by the Verhulst-Pearl (Slater, 1985) or the logistic model, according to the following equation:

$$N = \frac{K}{1 + \exp^{a - \mu^* t}}$$

This model employs a non-linear correlation factor statistically calculated by the SYSTAT software (Inc. program for Windows V11.0).

Physiological studies

Effect of pH and temperature

To study the influence of pH and temperature on bacterial growth, the pH of potato-infusion broth was adjusted to 5, 6, 7 and 8, with HCl 1M. The cultures initiated with a 1% v/v inoculum were incubated at 15 °C, 28 °C and 37°C with continuous agitation at 120 rpm for 18 h. Bacterial growth was determined as described above. All analyses were carried out in triplicate. The optimal conditions for the maximum growth rate ($dN/dt_{\max}$) were determined using the statistical program S-Plus 4.0 for Windows.

Effect of the physiological state on antagonistic activity

Under optimal growth conditions ($dN/dt_{\max}$), potato-infusion broth inoculated with 3% (v/v) of a cellular suspension (N_0) was incubated at the pre-determined pH and temperature with continuous agitation at 120 rpm for the time required to reach the desired phase of growth. The cells were collected by centrifugation at 10,000 g for 20 min 0 °C (J2-MC Centrifuge Beckman Germany) at all stages of growth. The sterilized (at 115 °C for

Estudios fisiológicos

Efecto del pH y la temperatura

Con el fin de estudiar la influencia del pH y la temperatura en el crecimiento bacteriano, el pH del caldo de infusión de papa se ajustó a 5, 6, 7 y 8 con 1M de HCl. Los cultivos iniciados con inóculo al 1% v/v fueron incubados a 15 °C, 28 °C y 37 °C, agitando constantemente a 120 rpm durante 18 h. El crecimiento bacteriano se determinó como se indicó anteriormente. Todos los análisis se realizaron por triplicado. Las condiciones óptimas para lograr la tasa de máximo crecimiento (dN/dt_{max}) se determinaron utilizando el programa estadístico S-Plus 4.0 para Windows.

Efecto del estado fisiológico en la actividad antagonista

En condiciones óptimas de desarrollo (dN/dt_{max}), el caldo de infusión de papa inoculado con (v/v) suspensión celular al 3% (N_0) fue incubado a rangos de pH y temperatura predeterminados con agitación constante a 120 rpm durante el tiempo requerido para alcanzar la fase de crecimiento deseada. Las células fueron recolectadas mediante centrifugación a 10,000 g durante 20 min 0 °C (J2-MC Centrifuge Beckman, Alemania) en todas las etapas de crecimiento. El sobrenadante esterilizado (a 115 °C por 15 min) y libre de células (CFS) de cada tratamiento se utilizó en la prueba cuantitativa de la actividad antagonista. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Prueba cuantitativa de la actividad antagonista

La actividad antimicrobiana fue determinada *in vitro* midiendo la inhibición del crecimiento micelial en un medio de agar de infusión de papa con el CFS obtenido. El agar de infusión de papa fundido fue enfriado a 45 °C y suplementado de manera homogénea con 3 mL de CFS de cada cultivo de

15 min) cell-free supernatant (CFS) of each of the treatments was used for the quantitative test of the antagonistic activity. All analyses were carried out in triplicate.

Quantitative test of antagonistic activity

Antimicrobial activity was determined *in vitro* by measuring inhibition of mycelial growth in potato-infusion-agar medium supplemented with the obtained CFS. Melted Potato-infusion agar was cooled to 45 °C and homogenously supplemented with 3 mL of CFS of each strain culture. A 5 mm diameter disc from an agar culture of the *Rhizotonia solani* belonging to the AG3 anastomosis group (donated by Dr. Gil Virgen of the University of Guadalajara) was inoculated at the center of Petri dishes containing the different supplemented media. Plates were incubated at 28 °C and fungi growth was measured at 24, 48, 72 and 96 h after start incubation. Each CFS was done in triplicate. The fungal growth observed on non-supplemented medium for 96 h was used as a control. Growth inhibition (%) was calculated as the ratio of mean diameter of fungal colony in medium with CFS / mean diameter of fungal colony in medium without CFS multiplied by 100 and the result was subtracted to 100.

AFLP analysis

The AFLP protocol used was similar to that reported by Vos *et al.* (1995), with the exception that two, rather than three selective nucleotides were used in order to generate an adequate number of bands for analysis. Total bacterial genomic DNA was digested with the restriction enzymes *EcoRI* and *MseI*, or the Tru 91 isoschizomer. The oligonucleotide primers used for the pre-amplification step were 5'-AGCTGCGTACCAATTC/A-3' and 5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA/A-3'. The

cepas. En el centro de placas Petri que contenían los diferentes medios suplementados se inoculó un disco de 5 mm de diámetro de un cultivo de agar de *Rhizotonia solani* perteneciente al grupo de anastomosis AG3 (donado por el Dr. Gil Virgen de la Universidad de Guadalajara). Las placas se incubaron a 28 °C y se midió el crecimiento de los hongos a 24, 48, 72 y 96 h después de que comenzó la incubación. Cada CFS se hizo por triplicado. El crecimiento de hongos observado durante 96 h en el medio sin suplementos que se utilizó como control. La inhibición del crecimiento (%) se calculó como la relación entre el diámetro promedio de la colonia de hongos en un medio con CFS y el diámetro promedio de la colonia de hongos en un medio sin CFS multiplicado por 100, y al resultado se le restó 100.

Análisis AFLP

El protocolo AFLP que se utilizó fue similar al reportado por Vos *et al.* (1995), excepto que en este caso se utilizaron dos, en lugar de tres, nucleótidos selectivos, a fin de generar un número adecuado de bandas para el análisis. El ADN genómico bacteriano total fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *MseI*, o con el isoesquizómero Tru 91. Los iniciadores oligonucleótidos utilizados en el paso de pre-amplificación fueron 5'-AGCTGCGTACCAATTTC/A-3' y 5'-GACGATGAGTCCTGAGTAA/A-3'. Después del paso de la pre-amplificación se llevó a cabo una segunda amplificación selectiva en la que se utilizaron iniciadores similares, pero con dos nucleótidos selectivos. El iniciador *EcoRI*+AG se combinó con el iniciador *MseI* +AA, AC, AG y AT. El iniciador *EcoRI* que se utilizó en la segunda reacción de amplificación fue marcado radioactivamente con quinasa T4. Las reacciones de AFLP con los iniciadores sin ningún nucleótido o con uno selectivo se realizaron durante 20 ciclos de acuerdo con el siguiente perfil de ciclo: un paso de desnaturalización

pre-amplificación step was followed by a second selective amplification using similar primers but with two selective nucleotides. The *EcoRI*+AG primer was combined with the *MseI* primer +AA, AC, AG and AT. The *EcoRI* primer used in the second amplification reaction was radioactively labeled by using T4 kinase. AFLP reactions with primers having none or a single selective nucleotide were performed for 20 cycles with the following cycle profile: a 30 s DNA denaturation step at 94°C, a 1 min annealing step at 56°C, and a 1 min extension step at 72°C. AFLP reactions with primers having two selective nucleotides were performed for 36 cycles with the following cycle profile: a 30 s DNA denaturation step at 94°C, a 30 s annealing step (see below), and a 1 min extension step at 72°C. The annealing temperature in the first cycle was 65 °C, was subsequently reduced each cycle by 0.7°C for the next 12 cycles, and was continued at 56°C for the remaining 23 cycles. The amplification products of the second reaction were analyzed by electrophoresis on a polyacrylamide sequencing gel and visualized via autoradiography. Electrophoresis was performed at constant power, 110 W, for -2 h. Finally, the gel was analyzed in a Li-Cor Automatas sequencer mod. 4200 (Li-Cor Lincoln, Nebraska), the bands were captured and scored by use of LI-COR software.

Statistical Analyses

The design of the treatments was completely random. Data were subjected to ANOVA by using the version 2.5 FAUANL statistical software, for Microsoft Windows (University of Nuevo Leon, Mexico). The significance of the treatments was determined by the magnitude of the *F* value ($P < 0.05$). For the differences among treatment means, the least significant difference (LSD) test was applied to obtain 95% simultaneous confidence intervals.

de ADN de 30 s a 94 °C, un paso de recocido de 1 min a 56 °C y un paso de extensión de 1 min a 72 °C. Las reacciones de AFLP con los iniciadores que tenían dos nucleótidos selectivos se realizaron durante 36 ciclos con el siguiente perfil de ciclo: un paso de desnaturalización de ADN a 94 °C, un paso de recocido de 30 s (ver abajo) y un paso de extensión de 1 min a 72 °C. La temperatura de recocido en el primer ciclo fue de 65 °C; posteriormente los ciclos se redujeron 0.7 °C durante los siguientes 12 ciclos, y continuaron a 56 °C en los 23 ciclos restantes. Los productos de la amplificación de la segunda reacción fueron analizados mediante la electroforesis utilizando un gel secuenciador de poliacrilamida y visualizados por autorradiografía. La electroforesis se realizó con corriente constante de 110 W por 2 h. Por último, el gel fue analizado en un secuenciador Automatas Li-Cor, mod. 4200 (Li-Cor Lincoln, Nebraska), las bandas se capturaron y se marcaron utilizando el programa LI-COR.

Análisis estadísticos

En los tratamientos se utilizó un diseño completamente al azar. Los datos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) con el programa estadístico FAUANL versión 2.5 para Microsoft Windows (Universidad de Nuevo León, México). La significancia de los tratamientos fue determinada por la magnitud del valor de F ($P < 0.05$). Para determinar las diferencias entre las medias de los tratamientos, se aplicó la prueba de la diferencia mínima significativa (LSD), a fin de obtener intervalos de confianza simultáneos de 95%.

RESULTADOS

Los análisis de AFLP basados en el agrupamiento de coeficientes de similitud de Dice (Figura 1) revelaron tres grupos genéticos de bacilos. En

RESULTS

The AFP analyses based on clustering of dice-similarity coefficients (Figure 1) revealed three genetic groups of bacilli. Group I includes *B. subtilis* Kodiak and LS213 *B. amyloliquefaciens*, group II includes BEB-13 and PY-79 *B. subtilis*; and group III includes BEB-8 *B. subtilis*. The physiological characterization of these bacteria confirmed that they are different strains. According to the Biolog database (Biolog System equipment), the microplate for the BEB-8 isolated showed the highest similarity SIM values (0.786) with *B. subtilis* providing a typical metabolic profile response for this strain (data not shown). The pH and temperature effects on the rates of growth (dN/dt) for the different strains are shown in Figure 2. The surface areas represent the growth as a function of pH and temperature. ANOVA analysis indicated that temperature, pH, and the interaction between the two factors were highly significant for the growth rate (dN/dt) of the PY-79 strain (Figure 2a). Based on this, two optimal growth conditions were determined to be 28 °C/pH 5 and 28 °C/pH 8 (Table 1A-II), which produced the maximum rates of growth of 2.19×10^5 and 2.36×10^5 cfu/ mL/ h respectively (Table 1A-III). For the Kodiak strain, the temperature and its interaction with pH were significant to produce the maximum rate of growth (Figure 2b). This maximum was observed at 28 °C to 5 pH units (Table 2A-II), showing no statistically significant differences in the values of the dN/dt in this range (Table 2A-III). In contrast, the BEB-8bs growth rate was strongly influenced by pH, but temperature and its interaction with pH showed no differences significance (Figure 2c). Optimal conditions of growth were obtained at pH 5 and 8 independently of the incubation temperature, reaching a maximum dN/dt value of 3.5 to 4×10^8 cfu /mL/h, respectively. The observed growing patterns were quite different for the different strains of *B. subtilis* (Table 1A-II and 1A-III).

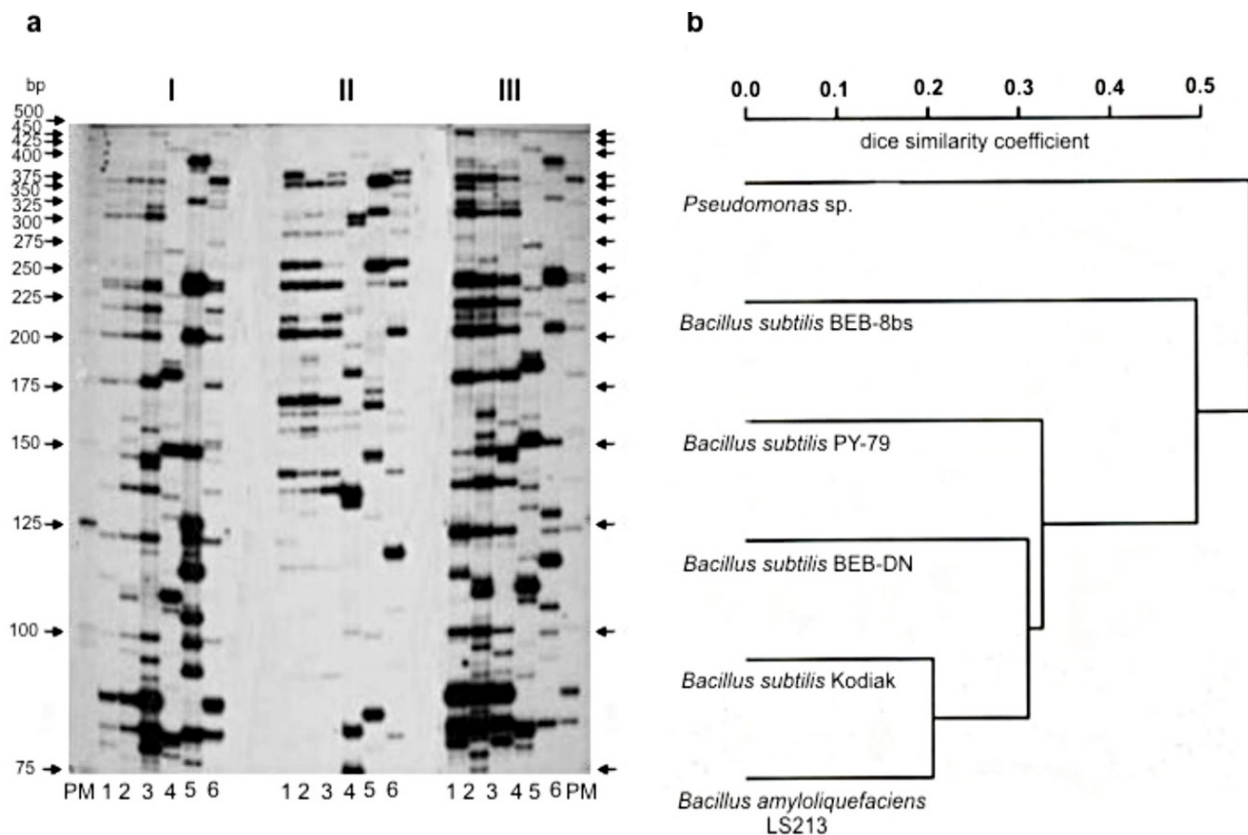


Figura 1. Huellas AFLP de las cepas de *Bacillus* utilizando el iniciador *EcoRI* marcado como 32 -P E+AG con tres iniciadores *MseI*: *MseI*+AA (I), *MseI*+AC (II) y *MseI*+AT (III). (a) Dendrograma de diferentes cepas de *Bacillus* con base en el análisis de AFLP de las muestras con los iniciadores *EcoRI*+AG y dos *MseI*; (b) Los fragmentos de AFLP fueron analizados y los dendrogramas fueron generados como se describe en la sección de materiales y métodos. Kodiak de *B. subtilis* (1), PY-79 de *B. subtilis* (2), LS213 de *B. amyloliquefaciens* (3), *Pseudomonas* sp. (4), BEB-8bs de *B. subtilis* (5), BEB-DN de *B. subtilis* (6).

Figure 1. AFLP fingerprints of the *Bacillus* strains using the 32 -P labeled *EcoRI* primer E+AG with three *MseI* primers *MseI*+AA (I), *MseI*+AC (II) and *MseI*+AT (III) (a). Dendrogram of different *Bacillus* strains based on AFLP analysis of the samples with *EcoRI*+AG and *MseI*-two primers (b). AFLP fragments were analyzed and dendograms were generated as described in materials and methods. *B. subtilis* Kodiak (1), *B. subtilis* PY-79 (2), *B. amyloliquefaciens* LS213 (3), *Pseudomonas* sp. (4), *B. subtilis* BEB-8bs (5), *B. subtilis* BEB-DN (6)

el Grupo I se observaron Kodiak de *B. subtilis* y LS213 de *B. amyloliquefaciens*; en el Grupo II, BEB-13 y PY-79 de *B. subtilis*; y en el Grupo III, BEB-8 de *B. subtilis*. La caracterización fisiológica de estas bacterias confirmó que se trataba de cepas diferentes. Según la base de datos Biolog (equipo del Sistema Biolog), la microplaca de la cepa BEB-8 aislada mostró los valores de similitud SIM más

Effect of growth conditions and physiological stage of *Bacillus* strains on the production of antagonistic metabolites

For each of the strains, the kinetic parameters were determined in the optimal growth conditions (Table 1A) and sub-optimal conditions (Table 1B). Under sub-optimal conditions of growth, a

altos (0.786), y *B. subtilis* tuvo una respuesta típica del perfil metabólico de esta cepa (datos no incluidos). Los efectos del pH y la temperatura en la tasa de crecimiento (dN/dt) de las diferentes cepas se muestran en la Figura 2. Las áreas de la superficie representan el crecimiento como una función del pH y la temperatura. Los análisis ANOVA indicaron que la temperatura, el pH y la interacción entre estos dos factores fueron muy significativos en la tasa de crecimiento (dN/dt) de la cepa PY-79 (Figura 2a). Con base en lo anterior, se estableció que las condiciones óptimas de desarrollo fueron 28 °C/pH 5 y 28 °C/pH 8 (Cuadro 1A-II), las cuales produjeron las máximas tasas de crecimiento de 2.19×10^5 y 2.36×10^5 cfu/ mL/ h, respectivamente (Cuadro 1A-III). En el caso de la cepa Kodiak, la temperatura y su interacción con el pH fueron significativas y produjeron la tasa máxima de crecimiento (Figura 2b). Esta tasa máxima se observó a 28 °C y a 5 unidades de pH (Cuadro 1A-II), pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de dN/dt en este rango (Cuadro 1A-III). En cambio, el pH influyó mucho en la tasa de crecimiento de la cepa BEB-8b, pero la temperatura y su interacción con el pH no mostraron diferencias significativas (Figura 2c). Las condiciones óptimas de crecimiento se obtuvieron con pH 5 y 8, independientemente de la temperatura de incubación, y alcanzaron un valor máximo de dN/dt , de 3.5 a 4×10^8 cfu/ mL/h, respectivamente. Los patrones de crecimiento observados fueron muy diferentes entre las diferentes cepas de *B. subtilis* (Cuadros 1A-II y 1A-III).

Efecto de las condiciones de crecimiento y la etapa fisiológica de las cepas de *Bacillus* en la producción de metabolitos antagonistas

Los parámetros cinéticos de cada una de las cepas se determinaron en condiciones óptimas (Cuadro 1A)

significant decrease in the specific rate of growth (μ) of each strain was observed, which contrast with the conditions in which the rate dN/dt was maximum. Under suboptimal conditions they show faster growth rates than optimal conditions, however, under these conditions there is no inhibition of *Rhizoctonia* except for the BeB 8 strain. (Figure 3). However, the time required to reach the stationary phase was similar for the Kodiak and BeB-8 strains, in both conditions, while the PY-79 took almost 10 more hours in sub-optimal conditions (Table 1A-III and 1B-III). Nevertheless, the most significant effect was observed in the carrying capacity of media (K). Under sub-optimal growth conditions, a reduction of one logarithmic unit (1.97 to 0.19×10^5 cfu/ mL/ h) was detected for PY-79 strain, a slight reduction from 0.804×10^6 to 0.65×10^6 cfu/ mL/ h corresponded to Kodiak strain, and a reduction from 3.14×10^8 to 2.48×10^8 cfu/ mL/ h for the BEB-8 strain was observed. The effect of the physiological stage of each strain on the antagonistic activity against *Rhizoctonia solani* AG-3, under optimal and sub-optimal conditions of growth is shown in Figure 3. Under optimal conditions of growth, the BEB-8bs strain showed a similar antagonistic activity to the Kodiak strain (positive control). In the exponential growth phase (log), they both caused 15 to 25% fungal growth inhibition, while in the stationary phase, they caused 64 to 72% of fungal growth inhibition. As expected, the PY-79 strain (negative control) showed no significant inhibition of fungal growth (Figure 3a). Under conditions of minimal growth, the positive control Kodiak strain in the different stages of development, showed no antagonistic activity, however, the BEB-8 strain in the stationary phase reduced fungal growth by 25%. These results indicate that the highest biocontrol activity is in the stationary phase.

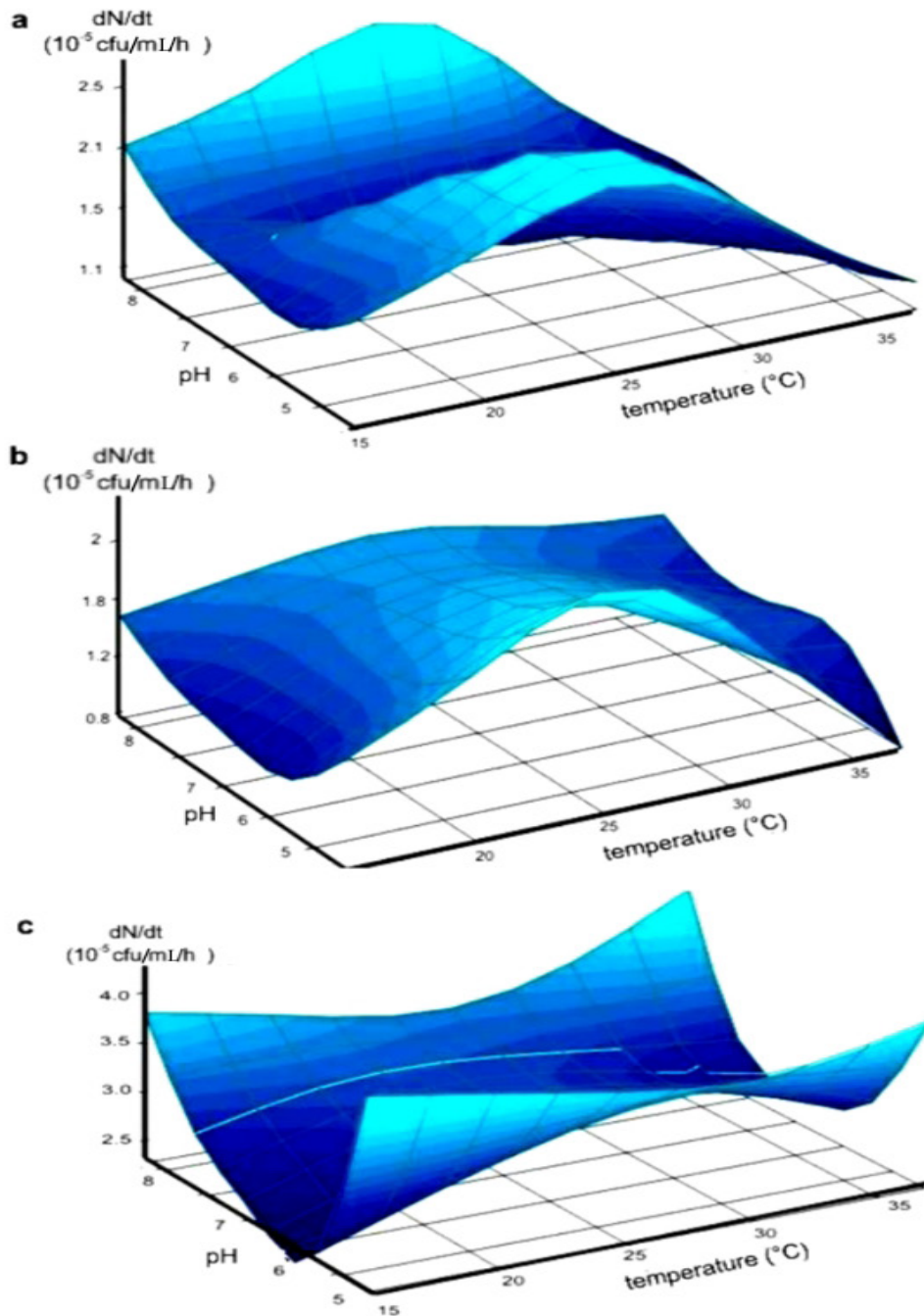


Figura 2. Efecto del pH y la temperatura en la tasa de crecimiento (dN/dt) de las cepas de *Bacillus subtilis* representado por la superficie, que es considerada una función del pH y la temperatura. Cepa PY-79 como control negativo de la actividad antagonista (a), cepa Kodiak; control positivo de la actividad antagonista (b), cepa BEB-8b (c).

Figure 2. Effect of pH and temperature on the rate of growth (dN/dt) of the *Bacillus subtilis* strains represented by the surface, which is considered a function of pH and temperature. PY-79 strain negative control of antagonistic activity (a), Kodiak strain; positive control of antagonistic activity (b), BEB-8bs strain (c).

Cuadro 1. Parámetros cinéticos del desarrollo de las cepas de *Bacillus subtilis*.**Table 1. Kinetic parameters of growth of *Bacillus subtilis* strains.**

A. Condiciones óptimas de desarrollo.						
Cepa de <i>Bacillus subtilis</i>	I. No	II. Condiciones óptimas de desarrollo	K	III. Parámetros cinéticos:		
				μ	dN/dt_{max}	$t_{dN/dt\ max}$
PY-79	2.8x10 ⁵	28°C/pH 5	1.97x10 ⁵	0.444	2.19x10 ⁵	4.90
		28°C/pH 8	1.88x10 ⁵	0.498	2.36x10 ⁵	12.21
Kodiak	1.2x10 ⁶	28°C/pH 5	0.804x10 ⁶	0.808	1.62x10 ⁶	6.32
		28°C/pH 6	0.806x10 ⁶	0.779	1.57x10 ⁶	6.08
		28°C/pH 7	0.752x10 ⁶	0.713	1.34x10 ⁶	5.65
		28°C/pH 8	0.816x10 ⁶	0.701	1.43x10 ⁶	6.65
BEB-8b	2.2x10 ⁸	15°C/pH 5	3.14x10 ⁸	0.535	4.20x10 ⁸	8.93
		15°C/pH 8	3.43x10 ⁸	0.439	3.77x10 ⁸	9.20
		28°C/pH5	2.35x10 ⁸	0.633	3.37x10 ⁸	6.36
		28°C/pH 8	1.16x10 ⁸	0.608	3.30x10 ⁸	6.02
		37°C/pH 5	2.43x10 ⁸	0.442	3.98x10 ⁸	5.66
		37°C/pH 8	2.62x10 ⁸	0.602	3.41x10 ⁸	5.95
B. Condiciones subóptimas de desarrollo.						
Cepa de <i>Bacillus subtilis</i>	I. No	II. Condiciones óptimas de desarrollo	K	III. Parámetros cinéticos:		
				μ	dN/dt_{min}	$t_{dN/dt\ min}$
PY-79	2.8x10 ⁵	37°C/pH 6	0.19x10 ⁵	0.156	0.77x10 ⁵	11.01
Kodiak	1.2x10 ⁶	37°C/pH 5	0.65x10 ⁶	0.459	0.74x10 ⁶	5-78
BEB-8b	2.2x10 ⁸	15°C/pH 6	2.48x10 ⁸	0.319	1.19x10 ⁸	8.71

No; inóculo inicial (cfu /mL), K; la capacidad de carga de los medios (10ⁿ cfu /mL), generalmente interpretada como la cantidad de recursos expresados en el número de organismos que estos recursos pueden mantener. μ velocidad específica de crecimiento / h, μ significativamente diferente de $\mu = 0$, a > 95% del nivel de confianza, dN/dt; tasa máxima de crecimiento (10ⁿ cfu /ml/ h), $t_{dN/dt}$; tiempo en que se alcanza la tasa máxima o mínima de crecimiento (h.min). El ajuste de r^2 al modelo logístico fue de > 95% del nivel de confianza / x

xNo; initial inoculum (cfu /mL), K; carrying capacity of media (10ⁿ cfu /mL), usually interpreted as the amount of resources expressed in the number of organisms that can be supported by these resources. μ specific speed of growth / h, μ significantly different from $\mu = 0$, to > 95% of confidence level, dN/dt; maximum rate of growth (10ⁿ cfu /ml/ h), $t_{dN/dt}$; time in which the maximum or minimal rate of growth is reached the (h.min). The adjustment of r^2 to the logistic model was > 95% of confidence level.

y condiciones subóptimas de desarrollo (Cuadro 1B). En condiciones subóptimas de desarrollo, se observó una reducción significativa en la tasa específica de crecimiento (μ) de cada cepa, lo cual contrasta con las condiciones que generaron la tasa máxima de dN/dt. En condiciones subóptimas, las tasas de crecimiento son más rápidas que en condiciones óptimas. Sin embargo, bajo esas condiciones no se detectó inhibición de *Rhizoctonia*, excepto en la cepa BeB 8 (Figura 3). Sin embargo, el tiempo requerido para alcanzar la fase estacionaria fue similar en las cepas Kodiak y BeB-8, en ambas condiciones, en tanto que PY-79 tardó casi 10 horas

DISCUSSION

The application of microbial inoculants as biocontrol agents has largely been unsuccessful (Compant *et al.*, 2005). This is due to plant protection being largely determined by an efficient colonization of the rhizosphere by inoculants and the competition with better adapted indigenous microflora (Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Conn y Franco 2004; Kozdrój y Van, 2000). These factors can greatly influence the establishment, proliferation, and activity of bacilli in a nutrient-limited environment. The utilization of a wide range

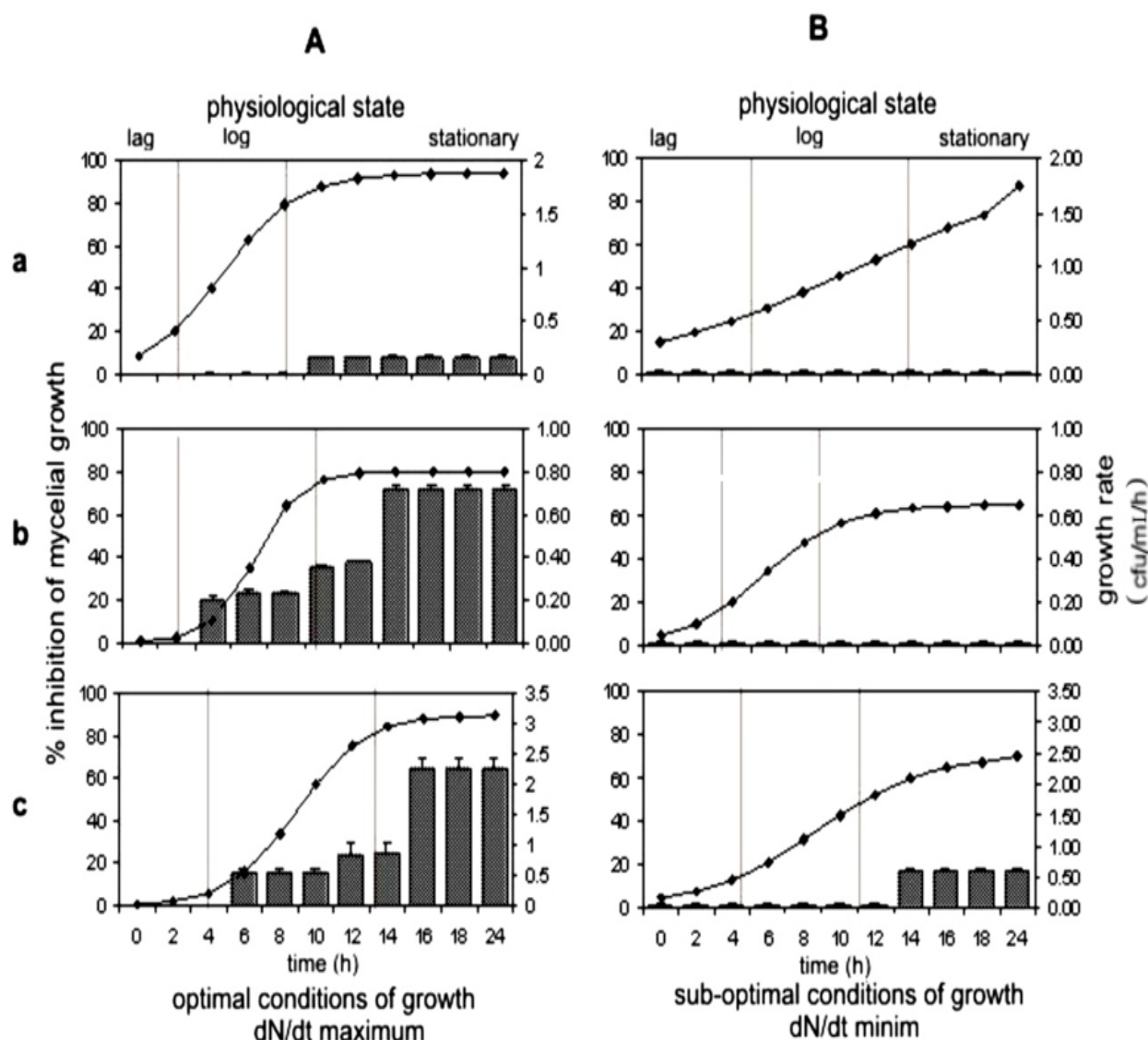


Figura 3. Efecto del estado fisiológico y condiciones de crecimiento de las cepas de *Bacillus subtilis* en la actividad antagonista contra *Rhizoctonia solani* AG-3. Crecimiento bacteriano en condiciones óptimas (A) y condiciones subóptimas (B) del aislado PY-79 de *B. subtilis* (a), Kodiak de *B. subtilis* (b), y BEB-8b de *B. subtilis* (c).

Figure 3. Effect of the physiological state and growth conditions of *Bacillus subtilis* strains on the antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani*. AG-3. Bacterial growth under optimal conditions (A), and under sub-optimal conditions (B) of *B. subtilis* PY-79 (a), *B. subtilis* Kodiak (b) and *B. subtilis* BEB-8bs (c).

más en condiciones subóptimas (Cuadros 1A-III y 1B-III). No obstante, el efecto más significativo se observó en la capacidad de carga del medio (K). En condiciones subóptimas de desarrollo se detec-

of root exudates is correlated with the bacterial competitive ability and constitutes the nutritional basis of rhizosphere colonization (Bais *et al.*, 2006; Haichar *et al.*, 2008). In this study, the BIOLOG

tó la reducción de una unidad logarítmica (1.97 a 0.19×10^5 cfu /mL/h) en la cepa PY-79; una ligera reducción de 0.804×10^6 a 0.65×10^6 cfu /mL/h correspondió a la cepa Kodiak, y se observó una reducción de 3.14×10^8 a 2.48×10^8 cfu /mL/h en la cepa BEB-8. En la Figura 3 se muestra el efecto de la etapa fisiológica de cada cepa en la actividad antagonista contra *Rhizoctonia solani* AG-3, bajo condiciones óptimas y subóptimas de crecimiento. En condiciones óptimas de crecimiento, la cepa BEB-8b mostró una actividad antagonista similar a la de la cepa Kodiak (control positivo). En la fase de crecimiento exponencial (log), ambas causaron una inhibición de 15 a 25% en el crecimiento fúngico, en tanto que, en la fase estacionaria, causaron una inhibición de 64 a 72%. Como se había previsto, la cepa PY-79 (control negativo) no mostró inhibición significativa del crecimiento fúngico (Figura 3a). Bajo condiciones de crecimiento mínimo, la cepa Kodiak (control positivo) no mostró actividad antagonista en las diferentes etapas de crecimiento; sin embargo, la cepa BEB-8 redujo en 25% el crecimiento fúngico en la fase estacionaria. Estos resultados indican que la mayor actividad de biocontrol ocurre en la fase estacionaria.

DISCUSIÓN

La aplicación de inoculantes microbianos como agentes de biocontrol no ha tenido mucho éxito (Compant *et al.*, 2005). Esto se debe a que la protección de las plantas es determinada en gran medida por la eficiente colonización de la rizosfera por los inoculantes y la competencia con la microflora nativa, que está mejor adaptada (Castro-Sowinski *et al.*, 2007; Conn y Franco 2004; Kozdrój y Van, 2000). Estos factores influyen mucho en el establecimiento, proliferación y actividad de los bacilos en un ambiente donde los nutrientes son limitados.

test indicated that the isolated BEB-8 was a strain of *B. subtilis* and confirmed the identities of PY-79 and Kodiak strains used as controls. Our results also confirmed the ability of the different strain of *Bacillus* to use a great variety of carbon sources. As indicated by Goddard *et al.* (2001) and Smalla *et al.* (1998) in yours studies, BIOLOG microtiter plates were originally developed for classification of bacterial isolates based on the ability of the isolates to oxidize 95 different carbon sources. However, this method has proved to be a useful tool for evaluating carbon source utilization patterns of microbial communities, potential metabolic differences between rhizosphere bacterial populations as well as for studying the effects of introduced inocula on soil microbial communities. In addition, although the metabolic profile of the three strains indicated that they were *Bacillus subtilis*, the AFLP analysis produced high-quality DNA fingerprints with detectable polymorphisms and revealed strain-level variations. This strain to strain variability confirms that they are different strains. Jones *et al.* (2005) described the individualization as the process by which morphological, biochemical or genetic characteristics are associated with a microorganism, such that a combination of characteristics is unique to that microorganism and exclude another microorganism. However, knowledge of the environmental niche where the biocontrol agent is able to grow is essential to establish the conditions for mass-production and also to become highly effective as a biocontrol agent. The most important environmental parameters are the water availability, temperature and pH of the rhizosphere (Costa *et al.*, 2002). The physiological study of the *Bacillus* strains carried out in this work confirmed that environmental factors, such as pH and temperature, directly influence the capacity of growth and biocontrol activity. The findings reported in the present study clearly demonstrate

La utilización de una amplia variedad de exudados de raíz está correlacionada con la capacidad competitiva de las bacterias y constituye la base nutricional de la colonización de la rizosfera (Bais *et al.*, 2006; Haichar *et al.*, 2008). En este estudio, la prueba BIOLOG indicó que el aislamiento BEB-8 es una cepa de *B. subtilis* y confirmó las identidades de las cepas PY-79 y Kodiak utilizadas como controles. Nuestros resultados también confirmaron la capacidad de las diferentes cepas de *Bacillus* de utilizar una gran variedad de fuentes de carbono. Como señalaron Goddard *et al.* (2001) y Smalla *et al.* (1998) en sus estudios, las placas microtituladoras BIOLOG originalmente fueron creadas para clasificar los aislamientos bacterianos con base en su capacidad de oxidar 95 distintas fuentes de carbono. Sin embargo, este método ha resultado ser útil para evaluar los patrones de utilización de las fuentes de carbono de las comunidades microbianas y las posibles diferencias metabólicas entre las poblaciones bacterianas de la rizosfera, así como estudiar los efectos de los inóculos introducidos en las comunidades microbianas del suelo. Además, aunque el perfil metabólico de las tres cepas mostró que se trataba de *Bacillus subtilis*, el análisis AFLP produjo huellas de ADN de alta calidad con polimorfismos detectables y reveló variaciones a nivel de cepa. La variabilidad entre estas cepas confirmó que son diferentes. Jones *et al.* (2005) describieron la individualización como el proceso mediante el cual las características morfológicas, bioquímicas o genéticas se asocian con un microorganismo, de manera tal que la combinación de características es únicamente de ese microorganismo y de ningún otro. Sin embargo, es fundamental conocer las condiciones ambientales en que el agente de biocontrol puede crecer, a fin de establecer las condiciones de producción en masa y también para que se convierta en un agente de biocontrol muy eficaz. Los parámetros ambientales más importantes son la

that the environmental niche for the optimal growth of BEB-8 strain is at a temperature range of 15-37 °C and a pH between 5 and 8. Interestingly pH but not temperature influences growth rate in the ranges of the present study. However, the favorable environmental conditions where the Kodiak commercial preparation is able to grow are 28 °C in a pH range of 5-8, as was indicated by the significance of the effect of interaction between temperature and pH on dN/dt. A microbial species usually has a fairly wide range of environmental conditions in which it will grow. However, the growth rate is the variable physiological microbial initially affected by changes in the environment. The lack of direct measurements of this factor has been a major drawback in understanding the rhizosphere effects in soil. Based on this, the biological and physiological characterization of *Bacillus subtilis* with antagonistic activity carried out in the present work is of great importance. In a recent report, Costa *et al.* (2002) defined the range of environmental conditions over which CPA-2 strain of *Pantoea agglomerans* may be developed for biological control. They determined the effect of water availability, temperature, pH, and their interactions on the growth of the bacteria under *in vitro* conditions. Nevertheless, in contrast to our results, Costa *et al.* (2000) did not correlate the growth conditions or physiological status of the bacteria with the antagonistic activity of *P. agglomerans*. The results shown in Table 1 and Figure 3 emphasize the effects of proliferation, kinetics parameters and physiological status for each strain on antagonistic activity. Under optimal growth conditions, the CFS obtained from the exponential growth phase of the Kodiak and BEB-8 strains showed mycelial growth inhibition of *R. solani*. However, a greater inhibitory activity was achieved using CFS obtained during the stationary phase of either strain. On the contrary, altering pH

disponibilidad de agua, la temperatura y el pH de la rizosfera (Costa *et al.*, 2002). El estudio fisiológico de las cepas de *Bacillus* que se realizó como parte de este trabajo confirmó que los factores ambientales, como el pH y la temperatura, influyen directamente en la capacidad de crecimiento y en la actividad de biocontrol. Los resultados que se presentan en este estudio demuestran claramente que las condiciones ambientales para el crecimiento óptimo de la cepa BEB-8 incluyen rangos de temperatura de 15 a 37 °C y de pH desde 5 hasta 8. Es interesante notar que fue el pH y no la temperatura lo que influyó en la tasa de crecimiento en los rangos del presente estudio. Sin embargo, las condiciones ambientales favorables en que la preparación comercial de Kodiak crece son de 28 °C en un rango de pH desde 5 hasta 8, como lo indica la importancia del efecto de la interacción entre la temperatura y el pH en dN/dt. Una especie microbiana suele tener una diversidad bastante amplia de condiciones ambientales en las que puede crecer. Sin embargo, la tasa de crecimiento es la variable fisiológica microbiana que es inicialmente afectada por los cambios en el medioambiente. La falta de mediciones directas de este factor ha sido un gran obstáculo para entender los efectos de la rizosfera en el suelo. Con base en lo anterior, la caracterización biológica y fisiológica de *Bacillus subtilis* con actividad antagonista realizada en el presente estudio es muy importante. En un reciente informe, Costa *et al.* (2002) definieron la serie de condiciones ambientales en las que sería posible desarrollar la cepa CPA-2 de *Pantoea agglomerans* para control biológico. Los autores señalaron el efecto de la disponibilidad de agua, la temperatura, el pH y sus interacciones en el crecimiento de las bacterias en condiciones *in vitro*. Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados, Costa *et al.* (2000) no correlacionaron las condiciones de crecimiento ni el estado fisiológico de las bacterias con la actividad antagonista de *P. agglomerans*.

and temperature to obtain a minimal growth rate caused the antagonistic capacity to be reduced or lost independently of the physiological state of the bacterium.

The relationship between bacterial growth rate and environmental conditions involves different response mechanisms. In this context, it has been reported that production of many secondary metabolites is regulated through a two-component system that is activated by an external or internal signal (Grahovac *et al.*, 2015). The signals that activate the system are pH, temperature, osmolarity, and bacterial density. This regulatory system has been identified in different bacteria and is involved in the regulation of many different bacterial traits such as motility, pili formation, pathogenicity, siderophores and secondary metabolites production. (Cosby *et al.*, 1998; Horswill, 2007). Ahlem *et al.* (2012) show that biosynthesis of the antagonistic factor, as well as the effectiveness of biological control strictly depend on the growth conditions (pH, temperature) this supports our results. Likewise, the physiological status should also be considered when thinking about the life of the bacteria when it is applied to the soil. This depends on the prevailing conditions in the soil, which represents a crucial factor in establishing and maintaining bacterial inocula in natural environments. This hypothesis is also supported by the results of Vandenhove *et al.* (1993), who demonstrated that exponentially growing *Azospirillum* cells inoculated into soil lead to a higher and more stabilized population than those inoculated during stationary phase. The authors concluded that the physiological state of an inoculum greatly influences its survival. In addition, Selim *et al.* (2005), reported that production of the antagonistic factor by B2 strain of *Paenibacillus sp* was detected in the middle of the exponential growth phase, but the maximum production was reached at the end of the stationary

Los resultados que se muestran el Cuadro 1 y la Figura 3 resaltan los efectos de la proliferación, los parámetros cinéticos y el estado fisiológico de cada cepa en la actividad antagonista. En condiciones óptimas de desarrollo, el CFS obtenido en la fase de crecimiento exponencial de las cepas Kodiak y BEB-8 mostró inhibición del crecimiento micelial de *R. solani*. Sin embargo, hubo mayor actividad inhibitoria cuando se utilizó el CFS obtenido durante la fase estacionaria de cada cepa. En cambio, al alterar el pH y la temperatura para obtener una tasa de crecimiento mínima, la capacidad antagonista se redujo o se perdió, independientemente del estado fisiológico de la bacteria.

La relación entre la tasa de crecimiento bacteriano y las condiciones ambientales involucra diferentes mecanismos de respuesta. En este contexto, se ha reportado que la producción de numerosos metabolitos secundarios es regulada mediante un sistema de dos componentes que es activado por una señal externa o interna (Grahovac *et al.*, 2015). Las señales que activan el sistema son el pH, la temperatura, la osmolaridad y la densidad bacteriana. Se ha identificado este sistema regulatorio en diferentes bacterias y se sabe que está relacionado en la regulación de numerosas y diferentes características bacterianas como la motilidad, la formación de pili, la patogenicidad, los sideróforos y la producción de metabolitos secundarios (Cosby *et al.*, 1998; Horswill, 2007). Ahlem *et al.* (2012) mostraron que la biosíntesis del factor antagónico, así como la eficacia del control biológico, dependen estrictamente de las condiciones de crecimiento (pH, temperatura), y esto respalda nuestros resultados. De igual manera, también se debe tener en cuenta el estado fisiológico al pensar en la vida de las bacterias cuando se aplican al suelo. Esto depende de las condiciones que prevalecen en el suelo, lo cual representa un factor clave en el establecimiento y mantenimiento de los inóculos

phase. These results are similar to those reported in the present work (Figure 3). These observations are particularly relevant since most of the literature describes the production of antagonistic metabolites by *B. subtilis* at the early stages of the stationary phase, which coincides with the beginning of the sporulation process. (Leclère *et al.*, 2005; Savluchinske *et al.*, 2004). The enzymes required for production of these metabolites begin in early stages of population growth, but it is not until the end of the exponential phase when the biofilm begins to form when its activity is greater as shown by the transcriptomic studies conducted by Kröber *et al.* (2016). The subsequent enzymatic activity can cease within a few hours. However, this is not a general rule, since according to the results shown in Figure 3, there is still antagonistic activity on *Rhizoctonia solani* by strains BEB-8 and Kodiak.

Finally, each metabolite may require a specific pH-range and temperature for its activity. This study reveals that all the examined factors influenced the antifungal activity against *Rhizoctonia solani* and that interactions between the factors were also important. In conclusion, studies focused on the physiological characteristics and kinetic parameters of growth of *Bacillus subtilis* strains that allow to better understand bacterial behavior in the biological control of *Rhizoctonia solani*.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Biol. Fernando Hernández Godínez for a technical assistance and Dra. June Simpson for a critical review of this manuscript. The research was carried out in the Department of Biotechnology and Biochemistry Cinvestav-Irapuato. This work received financial support from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; CONACyT, Mexico (Postdoctoral Research). Support for this research also came from CONACyT-SEP-106401 y 61238.

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

bacterianos en ambientes naturales. Esta hipótesis también es respaldada por los resultados obtenidos por Vandenhove *et al.* (1993), que demostraron que al inocular en el suelo células de *Azospirillum* con crecimiento exponencial, esto fomenta el establecimiento de una población más grande y estable que cuando se inoculan células durante la fase estacionaria. Los autores llegaron a la conclusión de que el estado fisiológico de un inóculo tiene gran influencia en su supervivencia. Además, Selim *et al.* (2005) reportaron que la producción del factor antagónico de la cepa B2 de *Paenibacillus* sp. fue detectada a mediados de la fase de crecimiento exponencial, pero la máxima producción ocurrió al final de la fase estacionaria. Estos resultados son similares a los que se presentan en este trabajo (Figura 3). Estas observaciones son particularmente relevantes, ya que la mayor parte de la literatura indica que *B. subtilis* produce metabolitos antagonistas en las primeras etapas de la fase estacionaria, que coincide con el comienzo del proceso de esporulación (Leclère *et al.*, 2005; Savluchinske *et al.*, 2004). Las enzimas requeridas para producir estos metabolitos empiezan a formarse en las primeras etapas del crecimiento de la población, pero no es sino hasta el final de la fase exponencial cuando se empieza a formar el biopelícula, es decir, cuando tiene mayor actividad, como lo muestran los estudios transcriptómicos realizados por Kröber *et al.* (2016). La actividad enzimática posterior puede terminar en pocas horas. Sin embargo, esta no es una regla general, ya que, de acuerdo con los resultados que se muestran en la Figura 3, aún hay actividad antagonista en *Rhizoctonia solani* impulsada por las cepas BEB-8 y Kodiak.

Por último, cada metabolito requiere un rango específico de pH y temperatura para su actividad. Este estudio revela que todos los factores evaluados influyeron en la actividad antifúngica contra *Rhizoctonia solani* y que las interacciones entre los

factores también fueron importantes. En conclusión, los estudios enfocados en las características fisiológicas y los parámetros cinéticos del crecimiento de las cepas de *Bacillus subtilis* nos permiten entender mejor el comportamiento bacteriano en el control biológico de *Rhizoctonia solani*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Biol. Fernando Hernández Godínez por la asistencia técnica que les proporcionó, y a la Dra. June Simpson por la revisión crítica de este manuscrito. La investigación se llevó a cabo en el Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Cinvestav-Irapuato. Para la realización de este trabajo se recibió apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología; CONACyT, México (investigación de posdoctorado). Agradecemos también el apoyo que nos proporcionaron CONACyT-SEP-106401 y 61238.

## LITERATURA CITADA

- Ahlem H, Mohammed E, Badoc A and Ahmed L. 2012. Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefaciens* isolates. *African Journal of Biotechnology* 11:2210-2217. Disponible en línea: <http://www.academicjournals.org/AJB> DOI: 10.5897/AJB11.645
- Ashlee M, Losick ER and Kolter R. 2008. Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* 16:269-275. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.03.004>
- Ashlee M, Losick ER and Kolter R. 2007. *Bacillus subtilis* Genome Diversity. *Journal. Bacteriology* 189:1163-1170. Disponible en línea: <http://jb.asm.org/content/189/3/1163.short>
- 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. <https://doi.org/10.1104/pp.103.028712>
- Bais HP, Weir TF, Perry LG, Gilroy S and Vivanco JM. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology* 57:233-266. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105159>
- Bapat S and Shah AK. 2000. Biological control of fusarial wilt of pigeon pea by *Bacillus brevis*. *Canadian Journal of Microbiology* 46:25-132. <https://doi.org/10.1139/w99-109>



- Bernal G, Illanes A and Ciampi L. 2002. Isolation and partial purification of a metabolite from a mutant strain of *Bacillus sp.* with antibiotic activity against plant pathogenic agents. *Electronic Journal of Biotechnology* 5:12-20. Disponible en línea: <http://www.scielo.cl/pdf/ejb/v5n1/04.pdf>
- Bloemberg G and Lugtenberg B. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Current Opinion Plant Biology* 4:343-350. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(00\)00183-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(00)00183-7)
- Castro SS, Herschkovitz Y, Okon Y and Jurkevitch E. 2007. Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *Microbiology Letters* 276:1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00878.x>
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C and Ait Barka E. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4951-4959. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.4951-4959.2005>
- Conn VM and Franco CMM. 2004. Effect of microbial inoculants on the indigenous actinobacterial endophyte population in the roots of wheat as determined by terminal restriction fragment length polymorphism. *Applied and Environmental Microbiology* 70:6407-6413. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.11.6407-6413.2004>
- Cosby WM, Vollenbroich D, Lee OH and Zuber P. 1998. Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0k oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular compounds. *Journal of Bacteriology* 180:1438-1445. Disponible en línea: <http://jb.asm.org/content/180/6/1438.short>
- Costa E, Usall J, Teixido N, Delgado J and Viñas I. 2002. Water activity, temperature and pH effects on growth of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2. *Canadian Journal of Microbiology* 48:1082-1088. <https://doi.org/10.1139/w03-001>
- Fujinami S and Fujisawa M. 2010. Industrial applications of alkaliphiles and their enzymes-past, present and future. *Environmental Technology* 31:845-856. <http://dx.doi.org/10.1080/09593331003762807>
- Goddard VJ, Bailey MJ, Darrah P, Lilley AK and Thompson IP. 2001. Monitoring temporal and spatial variation in rhizosphere bacterial population diversity: a community approach for the improved selection of rhizosphere competent bacteria. *Plant and Soil* 232:181-193. <https://doi.org/10.1023/A:1010302607616>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2006.00157.x>
- Grahovac JA, Rončević ZZ, Tadijan IŽ, Jokić AI and Dodić JM. 2015. Optimization of media for antimicrobial compounds production by *Bacillus subtilis*. *Acta Alimentaria* 44:427-435. DOI: 10.1556/066.2015.44.0014
- Haichar FZ, Marol C, Berge O, Rangel-Castro JI, Prosser JI, Balesdent J, Heulin T and Achouak W. 2008. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. *The ISME Journal* 2:1221-1230. <https://doi.org/10.1038/ismej.2008.80>
- Horswill AR, Stoodley P, Stewart PS and Parsek MR. 2007. The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387:371-380. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0720-y>
- Johnson LF and Curl EA. 1972. Culture media. In *Methods for research on the ecology of soil borne plant pathogens*. Burgess Publishing Company Auburn, Alabama 16:187-208. Disponible en línea: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19731903549>
- Jones SW, Dobson ME, Francesconi SC, Schoske R and Crawford R. 2005. DNA assays for detection, identification, and Individualization of select agent microorganisms. *Croatian Medical Journal* 46:522-529. Disponible en línea: <http://neuron.mefst.hr/docs/CMJ/issues/2005/46/4/16100754.pdf>
- Kamnev AA. 2008. FTIR spectroscopic studies of bacterial cellular responses to environmental factors, plant-bacterial interactions and signalling. *Journal of Spectroscopy* 22:83-95. <http://dx.doi.org/10.3233/SPE-2008-0329>
- Kim PLL, Ryu J, Kim YH and Chl YT. 2010. Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin, and surfactin a from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Journal Microbiology and Biotechnology* 20:138-145. <http://doi.org/10.4014/jmb.0905.05007>
- Kozdrój J and Van Elsas JD. 2000. Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry* 32:1405-1417. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00058-4](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00058-4)
- Kröber M, Verwaaijen B, Wibberg D, Winkler A, Pühler A and Schlüter A. 2016. Comparative transcriptome analysis of the biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 as response to biofilm formation analyzed by RNA sequencing. *Journal Biotechnology* 231:212-223. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.06.013
- Leclère V, Béchet M, Adam A, Guez JS, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet-Imbert M and Jacques P. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology* 71:4577-4584. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4577-4584.2005>
- Matarante A, Baruzzi F, Cocconcelli PS and Morea M. 2004. Genotyping and toxigenic potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* strains occurring in industrial and artisanal cured sausages. *Applied and Environmental Microbiology* 70:5168-5176. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5168-5176.2004>
- Nagórska K, Bikowski M and Obuchowski M. 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica* 54:495-508. Disponible en línea: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17882321>
- O'Callaghan M, Gerrard EM and Johnson VW. 2001. New Zealand Plant Protection 54:128-135. Disponible en línea: [https://nzpps.org/journal/54/nzpp\\_541280.pdf](https://nzpps.org/journal/54/nzpp_541280.pdf)

- Ongena M and Jacques P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. Trends Microbiology 16:116-125. DOI: 10.1016/j.tim.2007.12.009
- Pal KK and B. Mc Spadden Gardener. 2006. Biological Control of Plant Pathogens. The Plant Health Instructor. DOI: 10.1094/PHI-A-2006-1117-02
- Rey MW, Ramaiya P, Nelson BA, Brody-Karpin SD, Zaretsky EJ, Tang M, López de León A, Xiang H, Gusti V, Clausen IG, Olsen PB, Rasmussen MD, Andersen JT, Jørgensen L, Larsen TS, Sorokin A, Bolotin A, Lapidus A, Galleron N, Ehrlich SD and Berka RM. 2004. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. Genome Biology 5:r77. <https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-10-R77>
- Savluchinske FS, Barbosa A, Cabrita M, Nunes L, Esteves A, Roseiro JC and Curto MJ. 2004. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* 355 against wood-surface contaminant fungi. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 31:199-203. <https://doi.org/10.1007/s10295-004-0133-x>
- Schallmeyer M, Singh A and Ward OP. 2004. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. Canadian Journal of Microbiology 50:1-17. <https://doi.org/10.1139/w03-076>
- Selim S, Negrel J, Govaerts C, Gianinazzi S and Van Tuinen D. 2005 Isolation and partial characterization of antagonistic peptides produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 isolated from the sorghum mycorrhizosphere. Applied and Environmental Microbiology 71:6501-6507. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6501-6507.2005>
- Shelburne CE, An FY, Dholpe V, Ramamoorthy A, Lopatin DE and Lantz MS. 2007. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 59:297-300. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl495>
- Slater J. 1985. Microbial growth dynamics. In: Comprehensive biotechnology, Mac-Young, M. (eds). Oxford Pergamon, p. 184-213.
- Smalla K, Wachtendorf U, Hever H, Liu WT and Forney L. 1998. Analysis of BIOLOG GN substrate utilization patterns by microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 64:1220-1225. Disponible en línea: <http://aem.asm.org/content/64/4/1220.short>
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology 56:845-857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Tamehiro N, Okamoto-Hosoya Y, Okamoto S, Ubukata M, Hamada M, Naganawa H and Ochi K. 2002. Bacilysocin, a novel phospholipid antibiotic produced by *Bacillus subtilis* 168. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 46:315-320. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.315-320.2002>
- Vandenhove H, Merck R, Van Steenberghe M and Vlassak K. 1993. Microcalorimetric characterization, physiological stages and survival ability of *Azospirillum brasilense*. Soil Biology and Biochemistry 25:513-519. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90077-O](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90077-O)
- Veith B, Herzberg C, Steckel S, Feesche J, Maurer KH, Ehrenreich P, Bäumer S, Henne A, Liesegang H, Merkl R, Ehrenreich A and Gottschalk G. 2004. The complete genome sequence of *Bacillus licheniformis* DSM13, an organism with great industrial potential. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 7:204-211. <https://doi.org/10.1159/000079829>
- Vos P, Hoger R, Bleker M, Reijans M, Van de Lec T, Hones M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kaiper M and Zabeau M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research 23:4407-4414. <https://doi.org/10.1093/nar/23.21.4407>
- Zhang X, Zhanng B, Zhang Z, Shen W, Yang C, Yu J and Zhao Y. 2005. Survival of the biocontrol agents *Brevibacillus brevis* ZJY-1 and *Bacillus subtilis* ZJY-116 on the spikes of barley in the field. Journal Zhejiang University SCIENCE. B. 6:770-777. <https://doi.org/10.1631/jzus.2005.B0770>