

Capítulo IV

Beauveria bassiana, CMICB ↑

88

Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMICB)

Liz Alejandra Uribe-Gutiérrez
Jennifer Lorena García Riaño*
Carol Viviana Amaya Gómez**

Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA).

* Centro de Investigación Tibaitatá. Mosquera, Cundinamarca, Colombia. Autora de correspondencia: Liz Alejandra Uribe-Gutiérrez; correo electrónico: luribe@agrosavia.co

** Centro de Investigación La Libertad. Villavicencio, Meta, Colombia.

Los microorganismos benéficos juegan un papel fundamental en el desarrollo de los procesos de innovación de la industria médica y agrícola. Su origen taxonómico diverso y su procedencia de diferentes hábitats les han permitido desarrollar mecanismos que pueden ser explotados en el desarrollo de procesos biotecnológicos (Yadav et al., 2017). Uno de los objetivos de los últimos años de la CMICB y de las colecciones de microorganismos en el mundo ha sido aumentar tanto la biodiversidad de los bancos como el número de sus accesiones. Por ello, se ha realizado un exhaustivo trabajo para mejorar las técnicas de aislamiento y conservación de los recursos filogenéticos presentes en diferentes hábitats (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos [OCDE], 2007; World Federation for Culture Collections [WFCC], 2010). La CMICB, como su nombre lo indica, tiene un interés particular en los microorganismos que ofrecen protección contra enfermedades y plagas (Bach et al., 2016; El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006; Jaber & Alananbeh, 2018; Kumar et al., 2012; Liu et al., 2013). Una vez crecidos en medios de cultivo, la conservación y exploración de las características de dichos microorganismos permite direccionar su bioprospección y explotación industrial (Delgado-Baquerizo et al., 2016). Para garantizar la correcta preservación de sus características, es indispensable evaluar periódicamente su viabilidad, pureza y estabilidad (Calleza et al., 2017; Cruz-Cruz et al., 2013), y, de ser necesario, se debe replantear el método de conservación, ya que es de suma importancia que una colección se maneje con los más altos estándares de rigor y calidad.

La CMICB está conformada por 832 accesiones distribuidas en 3 grupos: 309 bacterias de los géneros *Bacillus* spp., *Lysinibacillus* spp., *Paenibacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. (figura 18a); 282 hongos fitopatógenos y biocontroladores, como *Alternaria* spp., *Aspergillus* spp., *Beauveria* spp., *Fusarium* spp., *Metarhizium* spp., *Mucor* spp., *Nomuraea* spp., *Paecilomyces* spp., *Penicillium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp. y *Verticillium* spp., entre otros (figuras 18b y 18c), y 241 levaduras de los géneros *Aureobasidium* spp., *Candida* spp., *Debaryomyces* spp., *Hanseniaspora* spp., *Issatchenkia* spp., *Kodamaea* spp., *Kurtzmaniella* spp., *Meyerozyma* spp., *Pichia* spp., *Rhodotorula* spp. y *Wickerhamomyces* spp. (figura 18d). Teniendo en cuenta el interés agrícola de esta colección, los géneros de los que el banco cuenta con mayor diversidad de especies son *Bacillus* spp. —bacterias— y *Trichoderma* spp. —hongos—, los cuales han sido reportados por varios autores como microorganismos con potencial de uso como agentes biocontroladores (Benítez et al., 2004; Fira et al., 2018; Guzmán-Guzmán et al., 2019; Liu et al., 2013; Paraszkiwicz et al., 2017; Villarreal-Delgado et al., 2018).

Todos los microorganismos que conforman la colección han sido aislados a partir de diversos tipos de muestras, como suelo, flósfera, rizosfera, frutos e

Capítulo IV. Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMICB)

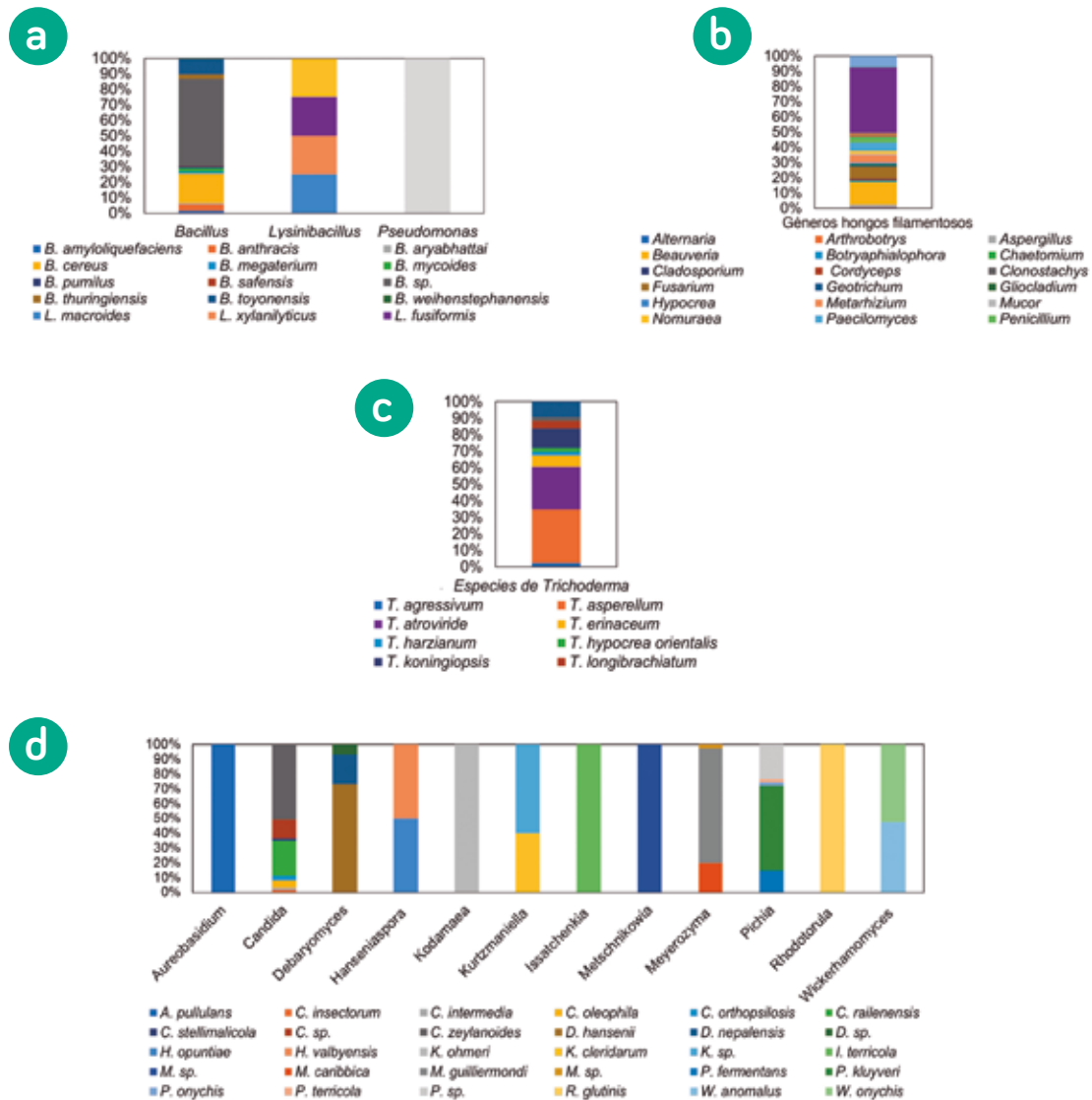


Figura 18. Géneros y especies de las accesiones que conforman la Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMICB). **a.** Accesiones bacterianas; **b.** Accesiones de hongos filamentosos; **c.** Especies de *Trichoderma* spp.; **d.** Accesiones de levaduras.

Fuente: AGROSAVIA, archivo CMICB, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. y CI La Libertad, Villavicencio, Meta

insectos. Estas muestras, a su vez, fueron colectadas en diferentes cultivos ubicados en 17 de los 32 departamentos de Colombia (figura 19). El aislamiento de los microorganismos se realizó seleccionando muestras de plantas sanas o que presentaban síntomas o signos de enfermedades, así como de insectos infectados con hongos o bacterias entomopatógenas.

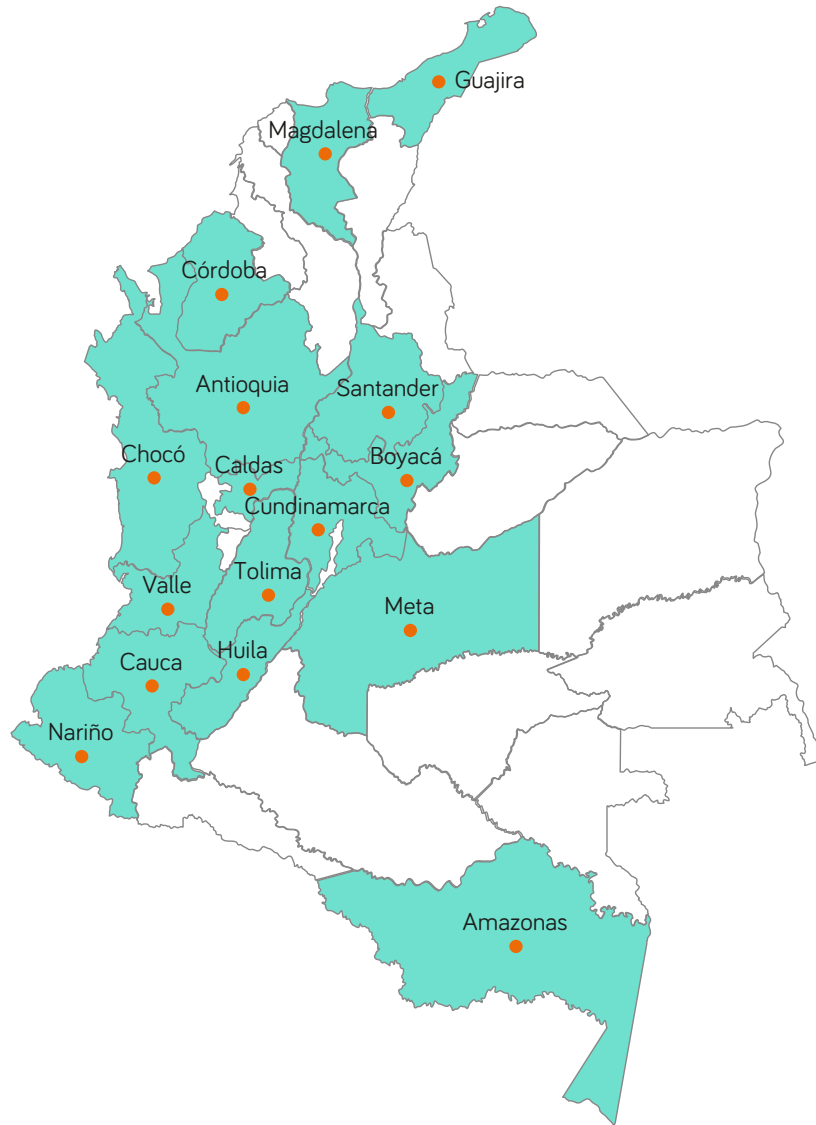


Figura 19. Departamentos de origen de las accesiones de la CMCB.

Fuente: AGROSAVIA, archivo CMCB, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca, y CI La Libertad, Villavicencio, Meta

A la fecha, se puede indicar que, del total de los microorganismos que conforman la colección, el 100 % de las accesiones bacterianas se ha caracterizado morfológicamente; el 4 % y el 1 % de las accesiones de bacterias y hongos filamentosos, respectivamente, han sido caracterizados bioquímicamente, y un 6 % de las accesiones de hongos filamentosos y un 64 % de las levaduras se han caracterizado fisiológicamente. Respecto a la identificación por amplificación de regiones altamente conservadas, en cuanto al gen 16S rARN, un 43 % de las accesiones bacterianas se ha identificado, y del gen 26S rARN —las regiones ITS1 e ITS2—, un 17 % y un 98 % de las accesiones de hongos filamentosos y levaduras, respectivamente; finalmente, un 3 % de las accesiones bacterianas, un 14 % de los hongos filamentosos y un 20 % de las levaduras han sido evaluados por la acción inhibitoria de crecimiento sobre fitopatógenos o insectos plaga.

Métodos de conservación empleados en la CMICB

Como parte de los métodos utilizados en la colección, se encuentra la conservación por congelación y liofilización, así como la metodología de recolectar, transportar y mantener la diversidad microbiana de muestras biológicas como suelo, hojas, entre otros.

Congelación de accesiones microbianas

Los microorganismos que conforman la colección se encuentran conservados bajo el método de congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, empleando glicerol como protectante. Las bacterias son sembradas por agotamiento y por siembra masiva en agar Luria-Bertani (LB) o en agar nutritivo (composición en g/L: triptona: 10; extracto de levadura: 5; cloruro de sodio: 10, y agar: 18) y se incuban durante 24 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir del crecimiento obtenido, se verifica la pureza de la cepa, tanto macroscópica como microscópicamente, observando, con el objetivo de 100x, las células bacterianas teñidas con la coloración de Gram. Una vez se verifica la pureza, se procede a la conservación bajo el método de congelación, cuyo proceso se describe en la figura 20. A partir de la caja con crecimiento masivo, se ajusta una suspensión concentrada (superior a 1×10^7 células/mL) en un tubo de ensayo que contiene 6 mL de solución estéril de glicerol al 10 % y peptona al 0,1 %; la suspensión se agita fuertemente hasta que esté completamente homogénea y sin grumos, con el fin de garantizar que cada una de las células quede recubierta por el crioprotectante. Ya con la suspensión celular, se adiciona 1 mL de esta en viales estériles de 2 mL de capacidad y se dejan en refrigeración durante 20 minutos, mientras el glicerol actúa con las membranas de las células (Kayingo et al., 2004). Finalmente, los viales se organizan en criocajas y se almacenan a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un ultracongelador.

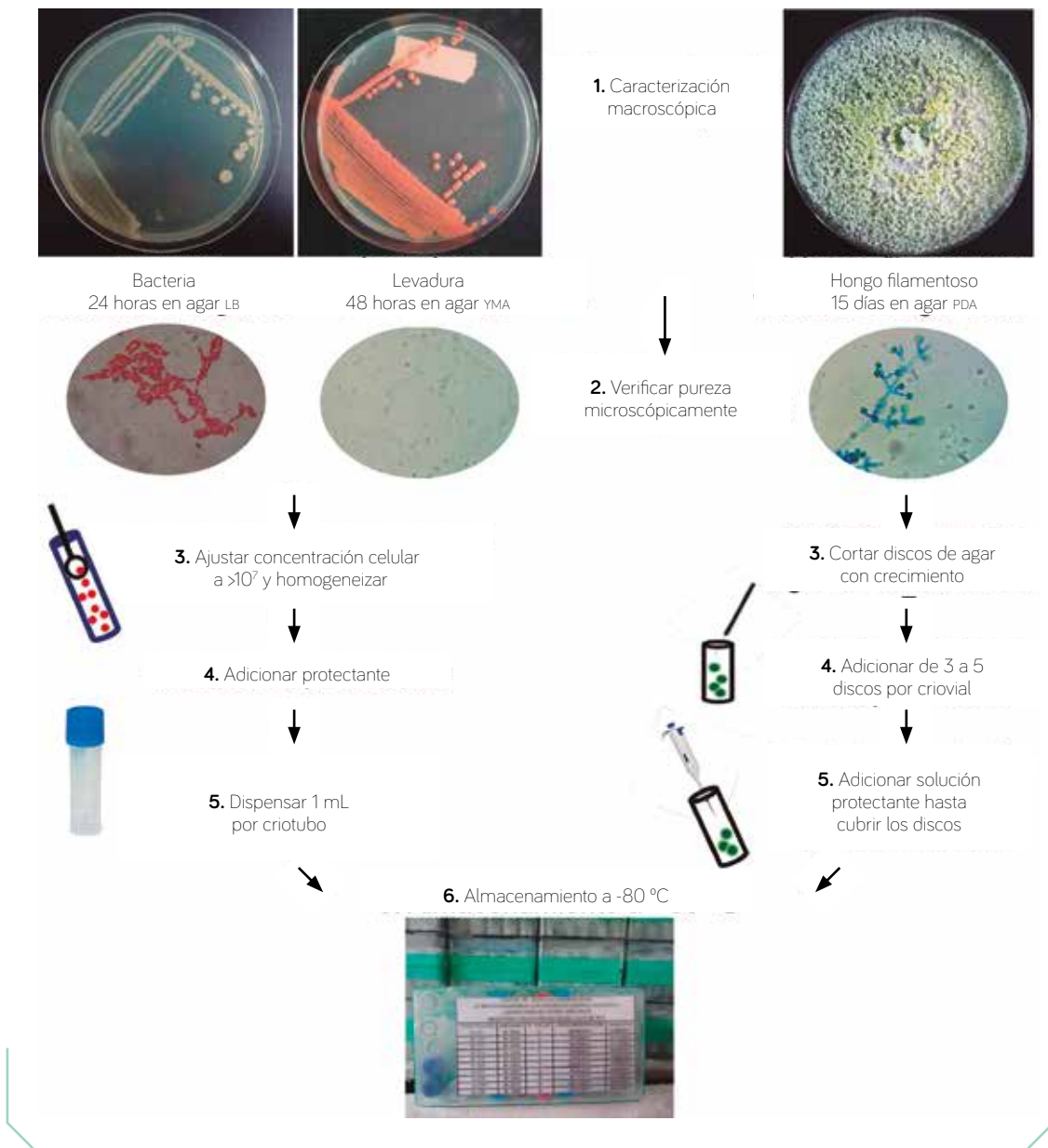


Figura 20. Procedimiento para la conservación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos con el método de congelación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Fuente: AGROSAVIA, archivo CMICB, CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca. y CI La Libertad, Villavicencio, Meta

Esta misma metodología es empleada para la conservación de levaduras, teniendo en cuenta que estas son sembradas en YMA (*yeast malt agar*, extracto de malta y extracto de levadura; composición en g/L: extracto de levadura: 3; extracto de malta: 3; sacarosa: 10; peptona: 5, y agar: 18) y se incuban durante 48 horas a 25 °C; en este caso también hay que verificar la pureza tanto macroscópica como microscópicamente, mediante observación de las células teñidas con azul de lactofenol, con el objetivo de 40x.

Para la conservación de hongos filamentosos, se inoculan cajas de Petri que contienen PDA (agar papa dextrosa; composición en g/L: sacarosa: 2, y agar PDA: 39), con discos de agar que evidencien crecimiento micelial o esporulación del hongo que se va a conservar. Los discos colonizados se ubican en el centro de la caja, teniendo en cuenta que el lado con crecimiento quede en contacto con el medio de cultivo. Las cajas se incuban a 25 o 28 °C durante 5-12 días, dependiendo del género microbiano. En las cajas con crecimiento se observan, en un microscopio, con el objetivo de 40x, las estructuras características de cada género teñidas con azul de lactofenol. Una vez se verifica la pureza y autenticidad de la cepa, se sacan de 3 a 5 discos de agar

con ayuda de un sacabocados estéril (de 5 mm, aproximadamente) y se introducen, con un asa recta, en viales de 2 mL previamente esterilizados. A cada vial se le adiciona la solución protectante de glicerol (10 %) y peptona (0,1 %) hasta cubrir la totalidad de los discos (Kitamoto et al., 2002). Los viales se dejan en refrigeración durante 20 minutos, mientras el glicerol actúa con las membranas de las células, y se ubican dentro de criocajas que se almacenan a -80 °C (figura 20) (Kayningo et al., 2004).

Con el fin de obtener una mayor biomasa fúngica para la conservación, principalmente para los hongos que evidencian colonias pequeñas, como *Metarhizium* spp., *Beauveria* spp. y *Lecanicillium* spp., entre otros, se



↑ Esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, parasitados por *T. koningiopsis*, CMCB

ajusta la concentración adicionando discos de agar en un tubo que contiene de 1 a 3 mL de polisorbato (0,1 %). A partir de dicha suspensión y como control de calidad, se toma una muestra con un asa redonda y se siembra masivamente sobre la superficie del medio a emplear, que en este caso puede ser PDA o YMA. Finalizado el periodo de incubación, se observan crecimientos como los que se muestran en la figura 21.

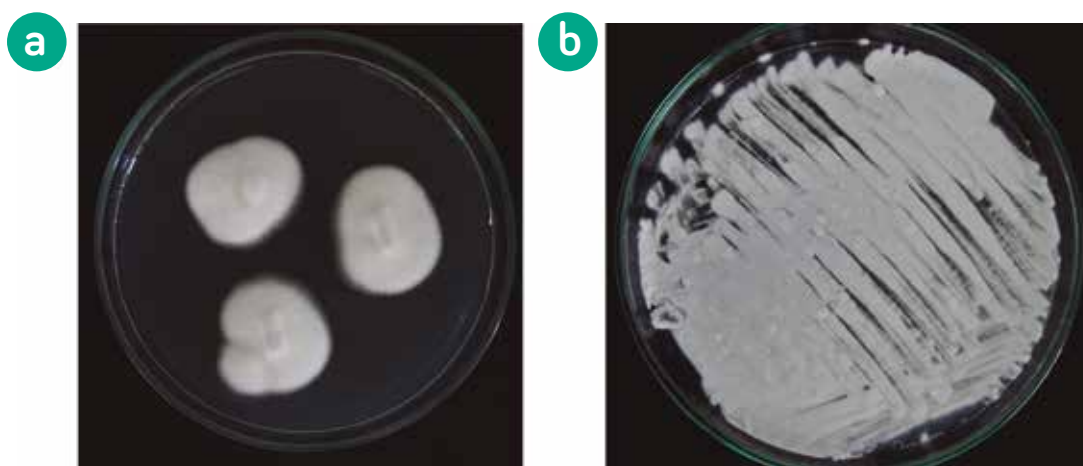


Figura 21. Crecimiento de *Lecanicillium* spp. **a.** Inoculación de discos de agar; **b.** Inoculación distribuyendo una suspensión sobre el medio de cultivo PDA.

Fotos: AGROSAVIA, Archivo CMICB. © Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

La CMICB ha garantizado la viabilidad del 96 % de los microorganismos conservados con el método de congelación, pertenecientes a diferentes géneros microbianos, por un periodo de cerca de 20 años, teniendo en cuenta que los hongos de los géneros *Metarhizium* sp. y *Rhizoctonia* sp. son los que han evidenciado una mayor pérdida de viabilidad en el tiempo en comparación con otros géneros de hongos filamentosos (Rico et al., 2005). Para este tipo de microorganismos y otros que también han evidenciado pérdida de viabilidad, se llevan a cabo procesos de investigación en los que se evalúa la conservación mediante métodos alternativos, como conservación en papel filtro a -20 °C; conservación como suspensión en solución de peptona-sacarosa en papel filtro a -20 °C; gel sílice; agua desionizada estéril; conservación de esclerocios a -20 °C, y conservación en granos de arroz parbolizado, entre otros (Bahamón et al., 2001; Gaino et al., 2010; Humber, 2012; López Lastra et al., 2002; Obando Castellanos et al., 2010).



Beauveria bassiana, CMICB ↑

A pesar de los beneficios del glicerol como protectante, en el proceso de aprendizaje sobre las metodologías para la conservación de los microorganismos se ha encontrado que la mezcla de glicerol con peptona prolonga la viabilidad de la mayoría de los microorganismos mencionados anteriormente (figura 18). Por ello, en el protocolo de conservación a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, se utiliza una solución de peptona ajustada al 0,1 % y de glicerol al 10 %. Es importante tener en cuenta que la concentración de glicerol debe variar según la temperatura de almacenamiento, por lo que se recomienda que, a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, la concentración de glicerol sea del 50 % (Colección Española de Cultivos Tipo [CECT], 2016).

En cuanto a la edad de las células por conservar, se ha descrito que, al tomar cultivos bacterianos después de 24 horas y de levaduras después de 48, se ha logrado obtener una alta recuperación celular. Morgan et al. (2006) indican que durante la fase estacionaria se inducen diferentes estados fisiológicos que desencadenan respuestas al estrés, lo que favorece la supervivencia de las células (mayor tolerancia) y, por tanto, garantiza una mayor recuperación de células microbianas.

Para la reactivación de los diferentes microorganismos, se retira un criovial y se descongela a una temperatura promedio de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$; posteriormente, el trabajo se realiza a temperatura ambiente. A partir de los viales que contienen la suspensión celular, se siembra por el método de aislamiento, con un asa redonda, una muestra de la suspensión sobre el medio de cultivo agar LB o nutritivo, para bacterias, y YMA, para levaduras. Las cajas con muestra bacteriana se incuban durante 24 horas a $28\text{ o }30\text{ }^{\circ}\text{C}$, y las cajas con muestras de levadura se incuban durante 48 horas a $25\text{ o }28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalizado el periodo

de incubación, se realiza el proceso correspondiente de verificación de pureza observando las características macroscópicas y microscópicas típicas de cada género microbiano. Para el caso de hongos filamentosos, una vez se descongela el vial, se toma, con ayuda de un asa recta, un disco de agar y se ubica en el centro de una caja de Petri que contiene PDA. Como se mencionó anteriormente, una vez se evidencia el crecimiento del hongo, se verifica la pureza y autenticidad observando las características macroscópicas y microscópicas características del microorganismo reactivado.

Liofilización de accesiones microbianas

Para la liofilización de los microorganismos, primero se realiza una suspensión de células (bacterias y levaduras) o conidios (hongos filamentosos) en la solución protectante seleccionada para tal fin (figura 22). Teniendo en cuenta que la CMICB se compone de diversos géneros bacterianos y de hongos, se evalúa el uso de diferentes protectantes, como la solución de leche descremada al 10 % más glutamato sódico al 1 % o una solución de glucosa al 10 % y gelatina al 1 %. Para llevar a cabo el proceso de liofilización, así como para el de congelación, se preparan las cepas que se van a liofilizar como se describe en el proceso de congelación, tomando las células, preferiblemente, del inicio de la fase estacionaria.

Para la conservación de los diferentes microorganismos bajo este método, se ajustan suspensiones en la solución protectante a entre 1×10^8 y 1×10^9 células/mL, para bacterias, y a cerca de 1×10^7 , para levaduras y hongos filamentosos. Estas concentraciones son recomendadas teniendo en cuenta el tamaño de las células y los conidios (CECT, 2016). A partir de la suspensión homogeneizada, se distribuyen 0,5 mL de la muestra en viales estériles de 10 mL de capacidad, y a cada vial se le pone un tapón de caucho tipo T, dejando un espacio disponible para que se pueda llevar a cabo el proceso de sublimación.

Las muestras son congeladas por dos horas a -80 °C y posteriormente son introducidas en el liofilizador. La programación del equipo se realiza de la siguiente manera: 24 horas de secado a -45 °C y con una presión de vacío no

Aureobasidium sp., CMICB →



superior a 1 hPa. Cada una de las bandejas del liofilizador se programa para un aumento progresivo de la temperatura: 5 horas a $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 horas a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 horas a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 horas a $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ y, finalmente, 4 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Al terminar el proceso de liofilización, se realiza el sellado de los viales al vacío empleando un compresor de 10 caballos de fuerza. Por último, los viales son retirados, sellados con un agrafe metálico y conservados en refrigeración a entre $4\text{ y }8\text{ }^{\circ}\text{C}$.

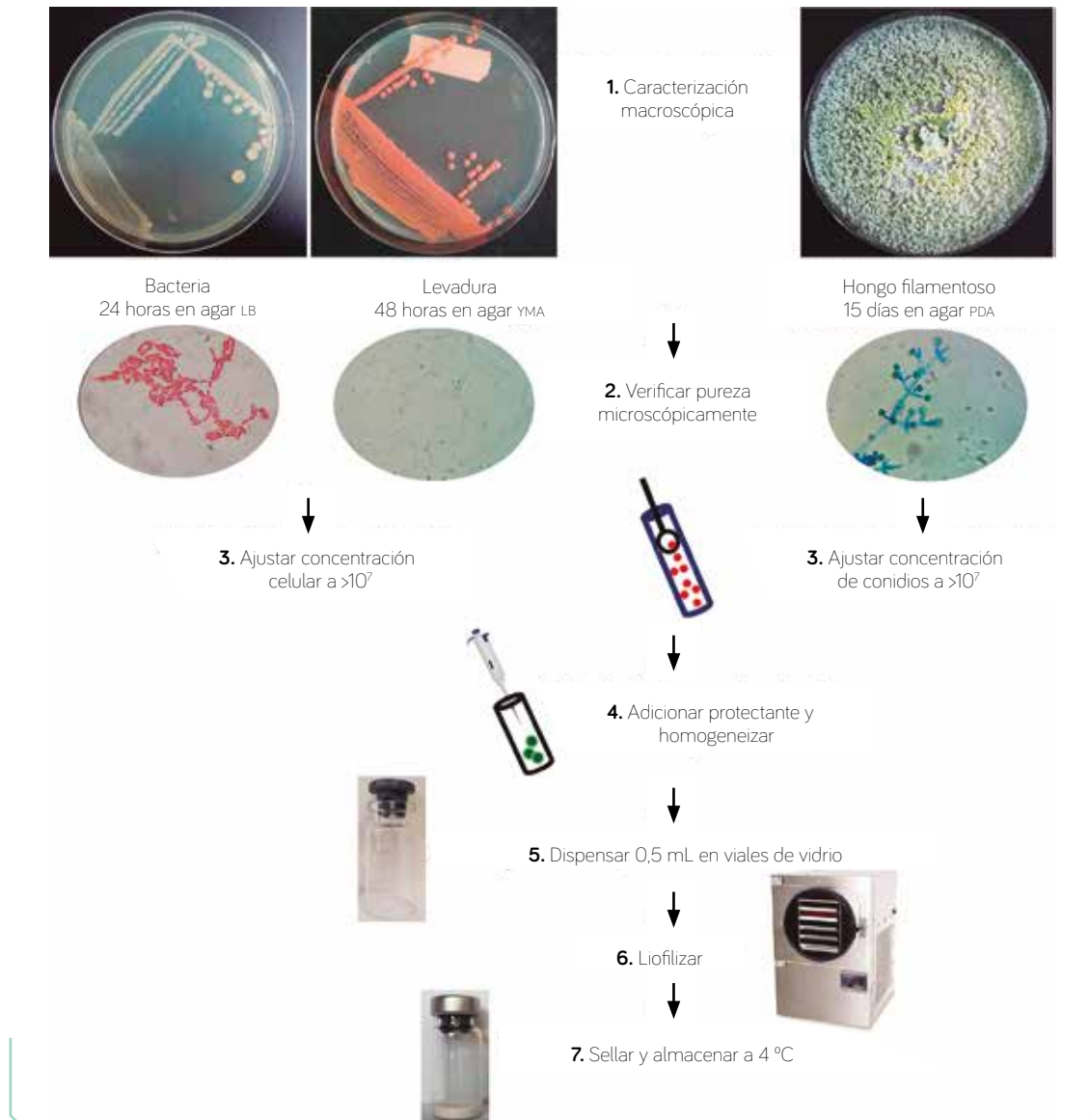


Figura 22. Procedimiento para la conservación de bacterias, levaduras y hongos filamentosos con el método de liofilización.

Fuente: Archivo CMICB, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca, y CI La Libertad, Villavicencio, Meta

La reconstitución de los liófilos se realiza con una solución salina o con un medio de cultivo alto en nutrientes en una relación 1:1 (Costa et al., 2002). Las células se dejan rehidratar por un periodo de 20 minutos, con el fin de garantizar una mayor recuperación celular (Morgan et al., 2006). Luego, sobre el medio correspondiente, se siembra la suspensión obtenida en la caja de Petri, y una vez se evidencie crecimiento microbiano, se realiza la verificación de la pureza y autenticidad de la cepa.

Recolección, transporte y mantenimiento de muestras biológicas

Con el propósito de aislar nuevos microorganismos y ampliar la biodiversidad de la CMICB a partir de muestras de suelo y hojas, entre otras, se ha empleado el *buffer* salino (pH: 7; KH_2PO_4 : 44 μM ; NaCl : 1,55 mM; Na_2HPO_4 : 27,09 μM) descrito por Liao y Shollenberger (2003). De acuerdo con los resultados obtenidos por estos autores, este *buffer* permite la conservación a largo plazo de los microorganismos presentes en las diversas muestras recolectadas; es decir, esta metodología ofrece la posibilidad de replantear las estrategias de aislamiento, como los componentes de los medios de cultivo utilizados, y, dependiendo de los resultados obtenidos, existe la posibilidad de procesar nuevamente las muestras utilizando un enfoque diferente. Posteriormente, una vez la muestra se encuentre en el laboratorio, es necesario adicionar dimetilsulfóxido (DMSO) estéril con una concentración de entre el 0,5 y el 10 % del volumen final. Inmediatamente después de adicionar el DMSO, la muestra debe ser congelada a -80°C .

Es importante resaltar que, dependiendo de los microorganismos que se desee aislar, se pueden emplear diferentes medios de cultivo. Por ejemplo, el uso de medios de cultivo mínimos permitirá el aislamiento de microorganismos oligotróficos. Otras condiciones que pueden incrementar el número de aislamientos por muestra y el aislamiento de microorganismos aún no cultivados son la sonicación de las muestras, la siembra de diluciones altas, el aumento en el tiempo de incubación, la reproducción de las condiciones ambientales del sitio de muestreo (temperatura, pH, condiciones osmóticas, superficie, etc.), el cocultivo, el tipo de agar (sólido o semisólido) y el uso de suplementos como aminoácidos y vitaminas (Kato et al., 2018; Overmann et al., 2017; Stewart, 2012).

Si el propósito del muestreo es la recolección y conservación de los ácidos nucleicos, se aconseja el uso de N_2 líquido, de soluciones como la ofrecida por Qiagen, conocida como LifeGuard Soil Preservation Solution, o de *buffers* como el NAP *buffer* ($\text{EDTA Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,019 M; $\text{C}_6\text{H}_9\text{Na}_3\text{O}_9 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,018 M; NH_4SO_4 : 3,8 M; pH: 5,2) (Camacho-Sanchez et al., 2013).

Autenticación de cepas

Entre las metodologías y características evaluadas para determinar la pureza y la autenticidad de las diferentes accesiones de la colección, empleamos las descritas en las tablas 1-3. Dichas metodologías se aplican según el microorganismo a evaluar (CECT, 2016; MacWilliams, 2009; Orberá Ratón, 2004; Papavizas, 1985; Pérez & Mota, 2006; Public Health England [PHE] & National Health Service [NHS], 2019; Realpe et al., 2002; Rodicio & Mendoza, 2004; Seifert, 1996; Sosa López et al., 2011; Sukarno et al., 2009; Wang & Zheng, 2012; Zare & Gams, 2008).

Tabla 1. Caracterización de bacterias de la Colección de Microorganismos con Interés en Control Biológico (CMICB)

Tinción	Características morfológicas (macro y microscópicas)	Características fisicoquímicas	Identificación molecular
Tinción de Gram	Margen de la colonia: entero, irregular y sin determinar	Asimilación o capacidad de utilizar diversos compuestos como fuente única de carbono o nitrógeno	Secuenciación de regiones del gen 16S rARN
	Forma de la colonia: circular, ondulada, lobulada, filiforme, rizoide, surcada y sin determinar	Fermentación de diferentes azúcares: glucosa, sacarosa, manitol	
	Características ópticas: opaca, translúcida, transparente, iridiscente, brillante y sin determinar	Motilidad	
	Elevación de la colonia: plana, elevada, crateriforme, puntiaguda, convexa y sin determinar	β-hemólisis (<i>Bacillus</i> spp.); catalasa	
	Apariencia de la colonia: aracnoide, harinosa, lisa, venosa, rugosa y sin determinar		
	Textura de la colonia: fluida, mucoide, cremosa, membranosa y sin determinar		
	Color: difusión de pigmento, coloración de Gram, producción de filamentos y esporulación		

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

Tabla 2. Caracterización de levaduras de la CMICB

Tinción	Características morfológicas (macro y microscópicas)	Características fisicoquímicas	Identificación molecular
Tinción azul de lactofenol	Difusión del pigmento	Asimilación o capacidad de utilizar diversos compuestos como fuente única de carbono o nitrógeno	Secuenciación de regiones del gen 26S rARN
	Color del pigmento	Fermentación de diferentes azúcares	
	Margen de la colonia: entero, irregular y sin determinar	Crecimiento en diferentes temperaturas	
	Forma de la colonia: rizoide, surcada y sin determinar	Crecimiento con diferentes pH	
	Color de la colonia	Adherencia	
	Características ópticas: opaca, translúcida, transparente, iridiscente, brillante y sin determinar	Tolerancia a radiación uv	
	Elevación de la colonia: plana, elevada, crateriforme, puntiaguda, convexa y sin determinar		
	Apariencia de la colonia: aracnoide, harinosa, lisa, venosa, rugosa y sin determinar		
	Textura de la colonia: fluida, mucoide, cremosa, membranosa y sin determinar		
	Forma de la célula		

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca



Rhodotorula mucilaginosa en microscopía de contraste, accesión CMICB. ↑

Tabla 3. Caracterización de hongos filamentosos de la CMICB

Tinción	Características morfológicas (macro y microscópicas)	Características fisicoquímicas	Identificación molecular
Tinción azul de lactófenol	Características del micelio: tipo de talo, tamaño, pared, color y formación de clamidosporas	Crecimiento en diferentes temperaturas	Secuenciación de regiones del gen ITS1 e ITS2
	Características de los conidióforos: forma, color, tamaño (μm), ramificación, métula, fálide, estípite, collarete, conidiogénesis y cadenas de conidios	Crecimiento con diferentes pH	
	Presencia de ascomas y presencia de células móviles	Adherencia	
	Forma de las células	Tolerancia a radiación UV	
	Fase dicariota		
	Tipo de esporangio		
	Reproducción sexual		
	Difusión y color del pigmento		
	Margen de la colonia: regular e irregular		
	Forma de la colonia: surcada		
	Apariencia de la colonia: filamentosa, seca y húmeda		
	Textura de la colonia: lanosa, algodonosa, pulverulenta, granulosa, lisa y aterciopelada		
	Diámetro de la colonia en días		
	Temperatura de crecimiento en grados centígrados		
	Medio de crecimiento y esporulación		
	Color de la superficie de la colonia		
Color del reverso de la colonia (código)			

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

Caracterización fisiológica

Para la CMICB es importante realizar la caracterización fisiológica de cada accesión para determinar su capacidad de crecer en diferentes rangos de temperatura, pH y actividad de agua (a_w). Si el objetivo es seleccionar un agente con actividad biológica para el control del crecimiento de otros microorganismos, algunos de los criterios de selección son que demuestren tolerancia a factores de estrés abiótico, como radiación UV; que tengan capacidad de sobrevivir en condiciones ambientales adversas; que no sean exigentes nutricionalmente,

y que se puedan producir en medios de cultivo económicos. Las cepas élite seleccionadas, además, deben demostrar estabilidad genética (Wilson y Wisniewski, citados por Liu et al., 2013).

Actualmente, en la CMCB, se lleva a cabo la caracterización fisiológica de las levaduras, que fueron aisladas principalmente de filósfera de frutos y hojas, y son expuestas constantemente a condiciones ambientales adversas (Martirosyan & Steinberger, 2014; Mercier & Lindow, 2000; Thapa et al., 2017). Con este objetivo, los curadores de la colección seleccionan un grupo de levaduras a evaluar, teniendo en cuenta el lugar de origen y el sustrato del cual fueron aisladas. Una vez seleccionados los aislamientos, se reactivan en medio de cultivo YMA, se incuban durante 48 horas a 25 o 28 °C y, finalizado el periodo de incubación, se verifica su pureza.



Verticillium sp., CMCB ↑

La caracterización fisiológica de levaduras se lleva a cabo en microplacas de 96 pozos (figura 23). En cada pozo se adicionan 180 μ L de medio y se inoculan con 20 μ L de cada levadura ajustada a una concentración de 1×10^6 células/mL. Una vez se realiza la inoculación, se toma la lectura de absorbancia del tiempo 0 y esto se realiza, nuevamente, después de 48 horas de incubación, empleando un lector de placas ajustado a una longitud de onda de 405 nm.

La evaluación del crecimiento a diferentes pH se realiza en el caldo Sabouraud y se ajusta a pH de 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, con HCl y NaOH. Para la evaluación del crecimiento a diferentes temperaturas, se emplea el caldo Sabouraud, y las microplacas se incuban a 4, 25, 30, 35 y 40 °C durante 48 horas. Adicionalmente, se evalúa el crecimiento en un medio de cultivo con baja disponibilidad de agua (a_w), para lo cual se prepara el medio Sabouraud suplementado con glucosa a una concentración final del 50 % y el 60 %. Las microplacas empleadas para la evaluación a diferentes concentraciones de glucosa se incuban a 28 °C, durante 48 horas, con agitación constante a 125 rpm. Teniendo en cuenta la diferencia entre la absorbancia final (48 horas) y la inicial (tiempo 0), se determina cualitativamente el crecimiento de cada levadura como se describe en la tabla 4 (Kurtzman et al., 2010). Finalmente, todos los

Tabla 4. Evaluación cualitativa del crecimiento

Absorbancia obtenida	Crecimiento cualitativo
0,0 a 0,09	-
0,1 a 0,250	+
0,251 a 0,500	++
0,501 a 0,750	+++
0,751 a 1	++++

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

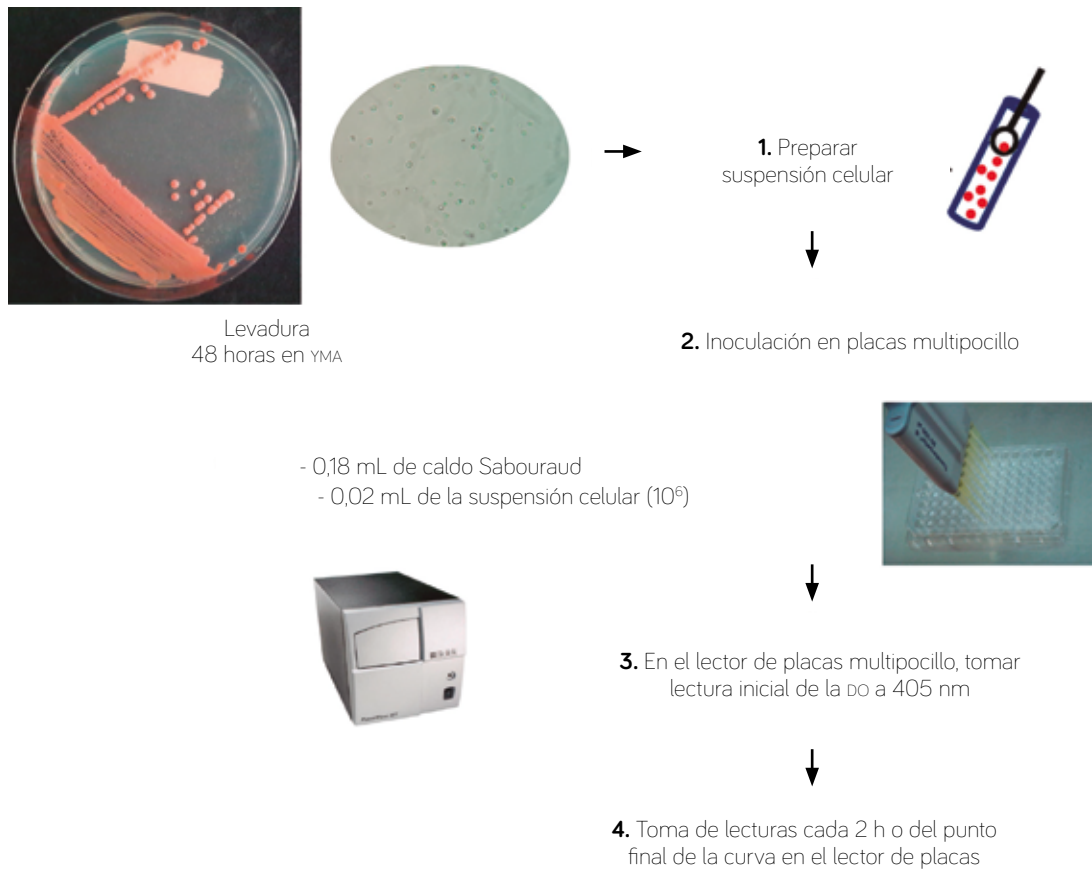


Figura 23. Metodología para la caracterización fisiológica de levaduras.

Fuente: Archivo CMCB, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca, y CI La Libertad, Villavicencio, Meta

datos son reportados en la base de datos del Banco de Germoplasma de Microorganismos y quedan a disposición de las personas interesadas.

La CMICB cuenta con alrededor de 300 accesiones bacterianas pertenecientes al género *Bacillus* spp. Este género comprende cerca de 268 especies y 7 subespecies (PHE & NHS, 2015). Teniendo en cuenta tanto la estrecha relación entre las diferentes especies como su insuficiente divergencia en el gen 16S rARN, es necesario el uso de otras herramientas, como la evaluación de sus características bioquímicas, para su clasificación taxonómica. Esta caracterización permite identificar y seleccionar aquellas especies que no causen infecciones en humanos y puedan ser empleadas en procesos de bioprospección, con el fin de determinar su potencial uso para el control de patógenos como, por ejemplo, *Aspergillus flavus*, *Rhizoctonia solani* y *Glomerella cingulata* var. *orbiculare*, entre otros (Kong et al., 2010; Neher et al., 2009; Yang & Sung, 2011), así como para la producción y obtención de compuestos antimicrobiales con diferentes estructuras, la producción de agentes surfactantes y probióticos, entre otros usos (Fira et al., 2018; Paraszkievicz et al., 2017).

Prueba de hemólisis

Diferentes especies del género *Bacillus* spp. tienen la habilidad de inducir hemólisis cuando crecen en el medio de cultivo agar sangre (tabla 5) (PHE & NHS, 2019; Realpe et al., 2002). Con el fin de elucidar, entre las diferentes cepas bacterianas, cuáles tienen la capacidad de producir hemólisis, se realiza el siguiente procedimiento: a partir de un cultivo de 24 horas en el medio de cultivo agar LB, se toma una muestra de la bacteria con ayuda de un asa estéril y se inocula una estría sobre el medio de cultivo. Las cajas se incuban a 30 °C durante 48 horas y posteriormente se observan las características de

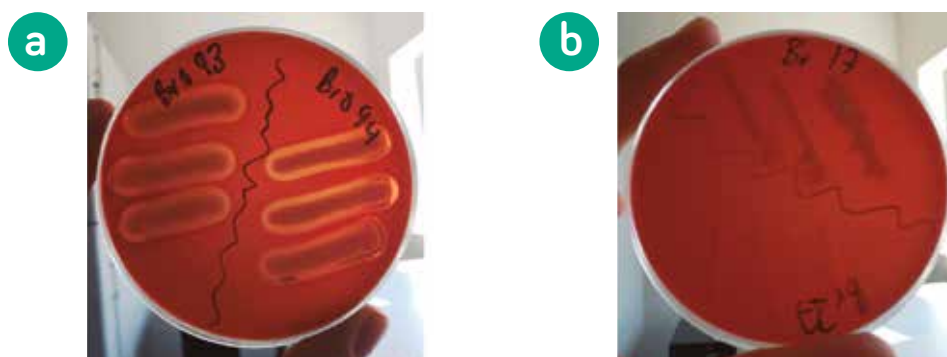


Figura 24. Prueba de hemólisis. **a.** Resultado positivo; **b.** Resultado negativo para diferentes accesiones del género *Bacillus* de la CMICB.

Fuente: Archivo CMICB, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

Tabla 5. Especies del género *Bacillus* con capacidad hemolítica

Microorganismo/grupo	Resultado
<i>B. anthracis</i>	No hemolítico (ocasionalmente puede producir una hemólisis débil)
Especies incluidas dentro del grupo de <i>B. cereus</i> (<i>B. cereus</i> , <i>B. mycoides</i> , <i>B. pseudomycooides</i> , <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. weihenstephanensis</i>)	β-hemolíticos
Especies incluidas dentro del grupo de <i>B. subtilis</i>	β-hemolíticos

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca, con base en PHE y NHS (2019)

la colonia para determinar si corresponden a cepas no hemolíticas, β-hemolíticas o α-hemolíticas. Los ensayos se deben realizar por triplicado y deben contar con un control positivo y negativo (figura 24) (Realpe et al., 2002).

Catalasa

La producción de peróxido se debe a la presencia de las peroxidasa. Estas enzimas son de interés por su potencial redox y su capacidad de oxidar compuestos resistentes a la degradación. En consecuencia, la evaluación de esta característica en diferentes microorganismos ha aumentado por su posible aplicación y uso en varios sectores de la industria (Falade et al., 2019). Entre las pocas especies de *Bacillus* reportadas por la producción de peroxidasa, se encuentran *B. megaterium* (Patil, 2014) y *B. subtilis* (Rao & Kavya, 2014), dado que esta capacidad se le atribuye principalmente a las actinobacterias (Falade et al., 2019).

La metodología que se utiliza para realizar esta prueba es la descrita por The American Society for Microbiology (ASM), en la que, a partir de una caja con entre 18 y 24 horas de incubación, se toma una colonia pura con ayuda de un asa estéril y se extiende sobre una lámina portaobjetos teniendo cuidado de no llevar pedazos de agar. Empleando una pipeta de Pasteur, se adiciona sobre la muestra una gota de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3 %. La muestra con peróxido no se mezcla, y, una vez se adicione, se debe observar la formación de burbujas, que indica reacción positiva para catalasa. Como control positivo, se sugiere emplear una cepa de *Staphylococcus aureus* (López-Prieto et al., 2019).

Actividad biológica

La CMICB tiene un interés particular en la búsqueda de microorganismos que demuestren un potencial biotecnológico para el sector agropecuario, especialmente en aquellos que tengan capacidad biocontroladora sobre fitopatógenos y plagas de interés agrícola.

La exploración de las características y los atributos biológicos de las cepas que conforman la colección se realiza para nutrir la base de datos, que sirve de insumo para procesos de bioprospección. Por ello, es indispensable llevar a cabo no solo la evaluación de la caracterización fisiológica, sino también el estudio de la actividad antimicrobiana o antagónica, para determinar, así, los efectos benéficos o adversos de un microorganismo sobre un organismo objetivo. El grupo de investigación de Control Biológico de Plagas Agrícolas de AGROSAVIA, que inició la CMICB, ha desarrollado, estandarizado y validado metodologías que permiten evaluar la actividad antagónica de diferentes géneros microbianos con interés biotecnológico, con el fin de seleccionar aquellos que evidencien un potencial de uso para el desarrollo de bioinsumos de uso agrícola.

Teniendo en cuenta que la CMICB ha aislado y actualmente conserva varias cepas de hongos entomopatógenos, a continuación se describe la ruta que varios investigadores han seguido para realizar el estudio de la actividad insecticida de hongos como *Metarhizium* spp., *Nomuraea* spp. y *Paecilomyces* spp., entre otros. En primer lugar, se desarrollan metodologías que permiten determinar las condiciones nutricionales o fisicoquímicas requeridas por el microorganismo para su óptimo crecimiento y, por tanto, alcanzar una alta producción masiva de conidios o estructuras de infección (Aguirre et al., 2009; Cruz Barrera et al., 2019). Simultáneamente, se determina la concentración, frecuencia y método de inoculación efectiva del agente de control biológico sobre los insectos objetivo. A modo de ejemplo, para el caso de larvas de plagas como

Bacillus sp., CMICB →



Spodoptera frugiperda (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Crambidae), entre otras, se han seleccionado métodos de inoculación como, por ejemplo, la infección tópica o la sumersión de las larvas en una suspensión conocida de conidios del hongo entomopatógeno evaluado (figura 23).

Para determinar la actividad biocontroladora de microorganismos sobre hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* y *Fusarium oxysporum*, se han descrito metodologías que permiten determinar el tipo de efecto antagónico, directo o indirecto, así como el modo de acción: parasitismo, inhibición o competencia (figura 25).

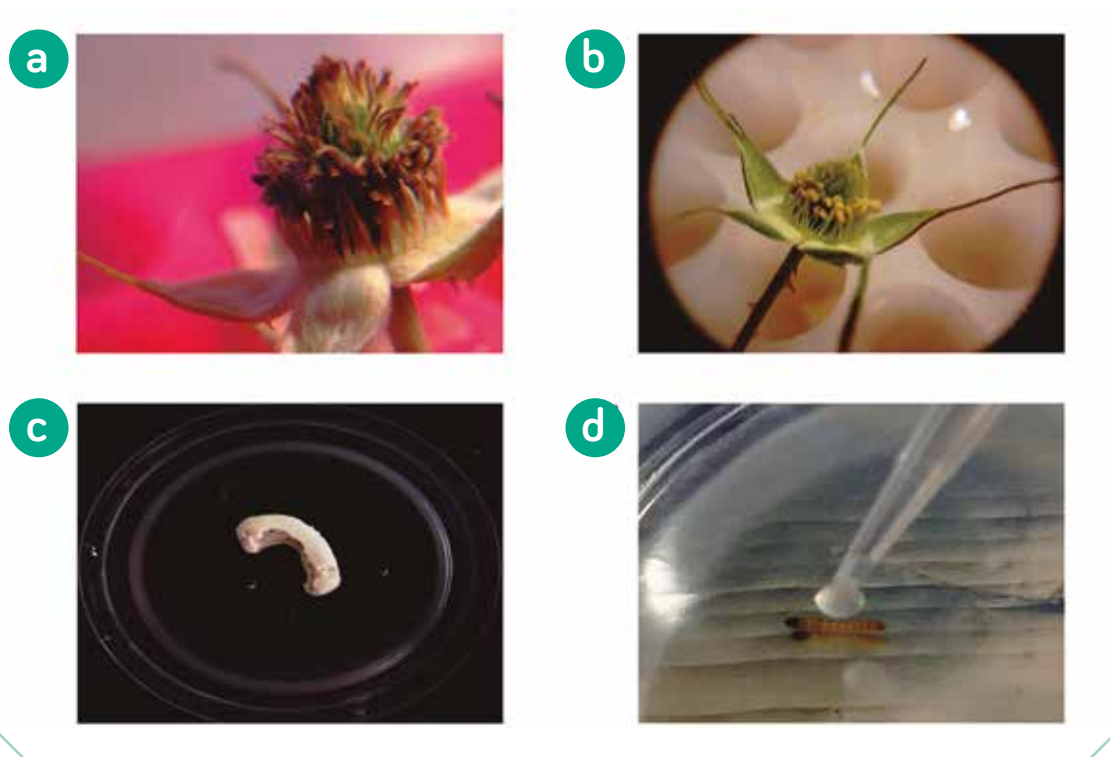


Figura 25. Patisistemas empleados para la evaluación de la actividad biológica de *Rhodotorula mucilaginosa* para el control de *Botrytis cinerea* en flor. **a.** Flor con signos de *B. cinerea* (control); **b.** Flor inoculada con *R. mucilaginosa* y el patógeno (inoculación de larvas *Diatraea saccharalis* con *Beauveria bassiana*); **c.** Larva infectada; **d.** Inoculación tópica por gota.

Fuente: Archivo CMICB, AGROSAVIA. CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca.

A continuación, en la tabla 6, se listan las referencias que detallan las metodologías que se han desarrollado para evaluar la actividad antagonista de accesiones que conforman la CMICB.

Tabla 6. Referencias para metodologías de autenticación de cepas de la CMICB.

Referencia	Microorganismos/organismos	Actividad biológica
Beltrán Acosta et al. (2012)	<i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Trichoderma koningiopsis</i> Th003, <i>Trichoderma asperellum</i> Th034 y <i>Solanum tuberosum</i>	Control biológico y promoción de crecimiento
Bosa y Cotes (1997)	<i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Spodoptera frugiperda</i>	Control biológico
Bosa O. et al. (2004)	<i>Nomuraea rileyi</i> y <i>Spodoptera frugiperda</i>	Control biológico
Cotes et al. (2011)	Levaduras filamentosas y <i>Botrytis cinerea</i>	Control biológico
Espinel et al. (1998)	<i>Metarhizium anisopliae</i> y <i>Rhammatocerus schistocercoides</i> (Orthoptera: Acrididae)	Control biológico
García et al. (2018)	<i>Beauveria bassiana</i> (Bals.) Vuill. y <i>Diatraea</i> sp.	Control biológico
González-García (1997)	<i>Verticillium lecanii</i> (Zimm.) Viegas (Deuteromycete: Moniliales) y <i>Trialeurodes vaporariorum</i> (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae)	Control biológico
Ochoa y Cotes (1998)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Streptomyces coelicolor</i> y <i>Trichoderma hamatum</i>	Control biológico
Pérez et al. (1997)	<i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Tecia solanivora</i> (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae)	Control biológico y actividad insecticida
Raymond C. et al. (2004)	Hongos entomopatógenos: <i>Metarhizium anisopliae</i> (Mt019 y Mt020), y garrapata: <i>Boophilus microplus</i>	Control biológico
Rubio C. et al. (2004)	<i>Trichogramma lopezandinensis</i> (Hymenoptera: Trichogrammatidae) y <i>Tecia solanivora</i> (Lepidoptera: Gelechiidae)	Control biológico
Torres y López (1997)	<i>Premnotrypes vorax</i> (Coleoptera: Curculionidae), <i>Beauveria</i> sp. y <i>Metarhizium</i> sp.	Control biológico
Torres-Torres y Cotes (1999)	Hongos entomopatógenos y <i>Premnotrypes vorax</i> (Coleoptera: Curculionidae)	Control biológico

Fuente: AGROSAVIA, equipo del CI Tibaitatá, Mosquera, Cundinamarca

Caracterización de fenotipos microbianos

Para la determinación de los fenotipos de la colección se han establecido las metodologías de placas multipozo y la utilización de varios medios de cultivo, los cuales se describen a continuación.

Placas multipozo

El empleo de placas multipozo permite la caracterización de numerosos fenotipos en bacterias, levaduras y hongos filamentosos. Entre las ventajas y desventajas de este método, se encuentran las siguientes (Corral-Lugo et al., 2012):

Ventajas:

- Evaluación rápida del crecimiento microbiano bajo diferentes condiciones nutricionales y abióticas, como diferentes medios de cultivo o diferentes temperaturas de crecimiento.
- Estudio de la producción de metabolitos, como sideróforos o antimicrobianos.
- Evaluación de fenotipos microbianos, como la formación de biopelículas.
- Evaluación simultánea de varias accesiones en la misma placa.
- Alta reproducibilidad de los datos.
- Obtención rápida de resultados.

Desventajas:

- La densidad óptica no está únicamente relacionada con el crecimiento microbiano.
- Menor crecimiento microbiano ocasionado por una menor ratio entre el volumen del medio de cultivo líquido y el de oxígeno.
- El poliestireno no es necesariamente la superficie usada por bacterias en condiciones naturales para formar biopelículas.

Medios de cultivo para diferenciación de fenotipos

Al igual que para el aislamiento de los distintos microorganismos, el medio de cultivo y las características ambientales que se proporciona para su crecimiento son cruciales para lograr que un fenotipo sea expresado en condiciones de laboratorio. Factores como la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno y su

concentración en el medio de cultivo permitirán la visualización o no del fenotipo microbiano de interés. En un estudio reciente en el que se evaluó la capacidad de tres cepas de *Rhizobium* sp. de solubilizar roca fosfórica, se observó que el cambio de extracto de levadura (0,5 g/L) por NH_4SO_4 (0,5 g/L) fue suficiente para evidenciar un incremento de entre el 40 y el 60 % en la capacidad de estos microorganismos de solubilizar fosfato (Amaya-Gómez et al., 2020). Adicionalmente, se evidenció que la sustitución del manitol por fructuosa como fuente de carbono llevó a una reducción en esta actividad microbiana.

Ya que el carbono es uno de los nutrientes más relevantes para la caracterización fisiológica de las accesiones, la CMICB profundiza en su diversidad metabólica haciendo uso de placas multipozo. Con estas placas es posible evidenciar rápidamente la capacidad de cada microorganismo de usar diferentes fuentes de carbono, y con esta información se procede a caracterizar diferentes fenotipos, teniendo en cuenta la diversidad metabólica de cada accesión.

Debido a que la motilidad microbiana es uno de los fenotipos de competencia que les permite a las bacterias colonizar huéspedes eucariotas, la evaluación de este fenotipo también se encuentra entre las caracterizaciones fisiológicas que se realizan para la caracterización de los microorganismos que hacen parte la colección. En primer lugar, se evalúa la motilidad tipo *swimming* (Kearns, 2010) en el medio Bromfield preparado con una concentración de agar del 0,3 %; en este, la alta cantidad de agua presente permite que las bacterias motiles se desplacen dentro de los poros de agar. Dado que este tipo de motilidad es dependiente de flagelos, este ensayo permite evidenciar de manera indirecta la presencia de estos organelos en las accesiones, aunque esto debe ser corroborado por tinción y microscopía.

El otro tipo de motilidad que se caracteriza es la motilidad en superficie. De acuerdo con Kearns (2010), las bacterias pueden moverse sobre superficies empleando motilidad tipo *swarming*, *twitching*, *sliding* o *gliding*. El tipo de motilidad empleado depende de si el movimiento entre la población del organelo utilizado como motor de movimiento

Rhodotorula mucilaginosa, CMICB →



y las señales ambientales detectadas es coordinado o no. En concordancia con este último factor, es necesaria la evaluación de este fenotipo bajo distintas condiciones nutricionales y abióticas.

En la figura 26 se puede observar un ejemplo de motilidad en superficie de dos cepas de *Burkholderia* sp., la M15 y la M18, con capacidad de solubilizar fósforo. Si bien M15 fue incapaz de moverse en medio mínimo (MM) (Robertsen et al., 1981) con una concentración de agar del 0,6 %, al adicionar extracto de suelo al 0,1 % y al 1 % (MM + ES) a este medio, se observó la expansión de la colonia. En el caso de M18, se puede observar que esta cepa presentó este fenotipo bajo todas las condiciones evaluadas. En ambos casos se puede observar que la forma de la colonia es diferente bajo cada condición de estudio, lo que puede deberse a los tipos de motilidad en superficie que se están evidenciado en cada medio de cultivo. Si el propósito fuera comprobar qué tipo de motilidad en superficie se presenta en cada caso, sería necesaria la caracterización de este fenotipo en mutantes de cada cepa u otros determinantes implicados en cada tipo de motilidad (Amaya-Gómez et al., 2020).

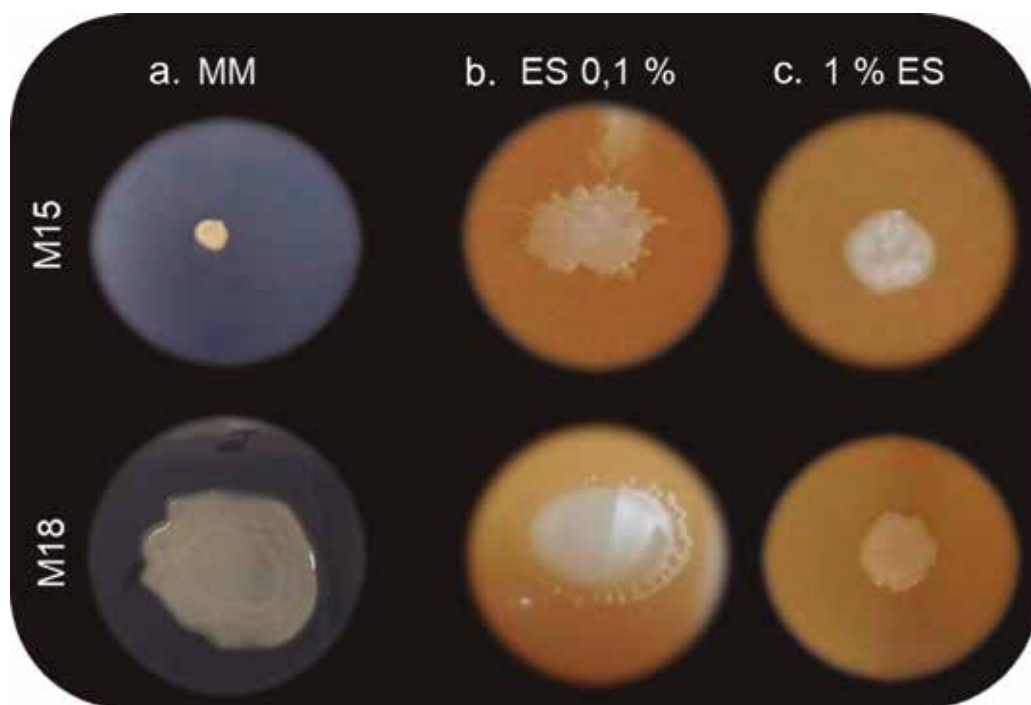


Figura 26. Motilidad de *Burkholderia* sp. M15 y M18 en superficie. **a.** Medio mínimo (MM) (Robertsen et al., 1981); **b.** MM suplementado con 0,1 % de extracto de suelo; **c.** MM suplementado con 1 % de extracto de suelo.

Fuente: Archivo CMICB, AGROSAVIA. CI La Libertad, Villavicencio, Meta

Para identificar los nutrientes requeridos para la inducción de un fenotipo microbiano, se puede emplear el método descrito por Rajeswari et al. (2015). Con el diseño estadístico Plackett-Burman es posible identificar los nutrientes y la concentración requerida para la inducción de un fenotipo microbiano. En su estudio se describe el uso de este método para inducir la producción de un antimicrobiano en una cepa de *Streptomyces* sp. Al igual que las condiciones nutricionales del medio de cultivo, los factores ambientales, como el pH del cultivo, la temperatura y el tiempo de incubación, entre otros, son esenciales para la manifestación de los fenotipos bajo estudio. El diseño Plackett-Burman puede ser también empleado para la identificación de los factores abióticos más relevantes.

Caracterización bioquímica de bacterias

Para la caracterización del recurso biológico con que cuenta la colección, se realiza la evaluación de las propiedades bioquímicas de los microorganismos que la conforman. La determinación de estas características permite identificar el potencial que tiene cada accesión, y los resultados obtenidos brindan información base para el diseño apropiado de procesos de producción, formulación y obtención de la molécula de interés y para continuar con proyectos de investigación más específicos (Fira et al., 2018).

Por otra parte, en el caso de la identificación de las diferentes especies del género *Bacillus* spp., es necesario llevar a cabo la elaboración de pruebas bioquímicas que permitan determinar si un aislamiento corresponde a determinada especie o no. Esta actividad es de suma importancia, dado que el género *Bacillus* spp. comprende más de 268 especies y 7 subespecies con características morfológicas y moleculares muy similares, que pueden llevar a una clasificación incorrecta (tabla 7) (PHE & NHS, 2019). También se aconseja realizar pruebas de asimilación o de fermentación de determinados sustratos (fuentes de carbono y nitrógeno) y determinar tanto las características de las colonias en diferentes medios de cultivo como el crecimiento bajo condiciones aerobias o anaerobias y en diferentes temperaturas y concentraciones de sal (Alippi, 2019).

Actividad de proteasa

Las proteasas son uno de los grupos más importantes de enzimas comerciales e industriales que catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos en proteínas

Tabla 7. Clasificación taxonómica de especies del género *Bacillus* spp. según las características fisicoquímicas evaluadas

Especie	Lecitinasa	Motilidad	Sensibilidad a la penicilina	Formación de cristal
<i>B. anthracis</i>	+*	-	S ^{**}	-
<i>B. cereus</i>	+	+	R	-
<i>B. megaterium</i>	-	+	R	-
<i>B. mycoides</i>	+	-	R	-
<i>B. thuringiensis</i>	+	+	R	+
<i>B. circulans</i>	-	+	R	-
<i>B. coagulans</i>	-	+	R	-
<i>B. licheniformis</i>	-	+	R	-
<i>B. pumilus</i>	-	+	R	-
<i>B. subtilis</i>	-	+	R	-
<i>B. sphaericus</i>	-	+	R	-

* *B. anthracis* puede producir zonas delgadas alrededor de la colonia, por lo que se recomienda reconfirmar la reacción.

** S: sensible; R: resistente.

Fuente: PHE & NHS (2019)

Trichoderma koningiopsis, CMICB ↓



y péptidos (Bach et al., 2012). Los microorganismos representan una excelente fuente de estas enzimas, debido a las ventajas económicas en la producción, la diversidad bioquímica y la posibilidad de manipulación genética (Aguilar & Sato, 2018). Para la evaluación de esta característica, empleamos la metodología descrita a continuación: se emplea agar *skim milk* (1 %) con 0,5 g/L de NaCl y un pH de 7 (Hernández Guzmán, 2014). A partir de cultivos con 24 horas en agar LB, se inocula una suspensión de 1×10^6 células/mL en 50 mL de caldo LB (relación de 1:5). Los erlenmeyer se incuban a 30 °C durante 60 horas a 130 rpm. Finalizado el tiempo de incubación, el medio se centrifuga a 10.000 rpm durante 15 minutos con el fin de precipitar las células vegetativas. Del sobrenadante libre de células se toman 5 mL y se pasan a través de un filtro de 0,2 μ m. A partir del extracto libre de células, se inoculan 3 gotas de 20 μ L sobre discos de papel filtro ubicados sobre el medio *skim milk*. Como testigo relativo, se emplea el caldo fermentado con células, y como testigo negativo, el papel filtro inoculado con agua destilada estéril. Las cajas se incuban a 30 °C durante 24 horas y se mide el halo de inhibición evidenciado alrededor de la colonia debido a la degradación del medio *skim milk* por acción de las proteasas presentes en la muestra.

Actividad de lecitinasa

Esta característica se evalúa porque permite identificar las cepas de *Bacillus* spp. que son potencialmente patógenas (Sharaf et al., 2014). De cajas con 24 horas en medio LB, y con ayuda de un asa estéril, se toma biomasa celular y se inocula por estría sobre el medio agar nutritivo suplementado con emulsión de yema de huevo (8 %); las cajas se incuban a 30 °C durante 48 horas. La prueba se considera positiva por la aparición de una zona opaca alrededor del crecimiento microbiano como resultado de la hidrólisis de la lecitina de la yema de huevo (Bhat et al., 2013).

Test de indol

La evaluación de esta característica es importante, ya que el indol es una molécula de señalización intracelular en bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Esta molécula controla diversos procesos, como la comunicación celular (*quorum-sensing*), la formación de esporas, la resistencia a drogas, la formación de *biofilm* y la virulencia, entre otros (Smith et al., 2014). Su evaluación ha sido reportada para la identificación de especies de *Bacillus* spp., junto con las pruebas de reacción catalasa, reducción de nitrato y ureasa, entre otras (Alippi, 2019).

Para determinar la capacidad de las bacterias para producir indol a partir de la hidrólisis del aminoácido triptófano por la enzima triptofanasa, se emplea la siguiente metodología (Public Health Wales et al., 2010): cada una de las accesiones se reactivan en el medio agar LB por agotamiento, y las cajas se incuban durante 24 horas a 28 °C. Finalizado el periodo de incubación, se toma una colonia del bacilo crecido sobre el medio de cultivo con ayuda de un asa recta y se siembra por punción en el medio de cultivo SIM (*sulfide indole motility*). Se debe contar con un control, que corresponde a un tubo con el medio sin inocular y tres réplicas por microorganismo (tres tubos). Los tubos que contienen el medio SIM inoculado se incuban a 28 °C por 48 horas. Una vez finalizado el periodo de incubación, se adiciona una gota del reactivo de Kovac al tubo inoculado y al tubo control, con el fin de observar un cambio de color del medio inoculado con el bacilo con respecto al tubo control.

Identificación molecular

La identificación molecular de las accesiones bacterianas se realiza mediante la secuenciación del gen 16S rARN, empleando los *primers* universales 27f (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTAC-GACTT-3') (Alippi, 2019). La identificación de levaduras se realiza mediante la amplificación correspondiente al dominio D1/D2 de la subunidad mayor (LSU) del rARN (26S rARN), con los *primers* NL1F (5'-GCATATCAATAAGCG-GAGGAAAAG-3') y LR6R (5'-GGTAAGCAGAACTGGCG-3') (Orberá Ratón, 2004). Para la identificación de hongos filamentosos, se realiza la amplificación de un fragmento de los genes que codifican para la región intergénica (ITS), el factor de elongación 1- α (EF-1 α) y el de ergosterol (ERG-1). Los *primers* empleados son: ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3'), EF1-728F (5'-CATCGAGAAGTTCGAGAAGG-3'), EF1-986R (5'-TACTTGAAGGAACCCTTACC-3'), RG1F (5'-CGCTCCGT-GCTTCTTCTTCTC-3') y ERG1R (5'-CTTCTTCTCTCCCGTCTCC-3') (Samuels et al., 2006).

Referencias

- Aguilar, J. G. dos S., & Sato, H. H. (2018). Microbial proteases: Production and application in obtaining protein hydrolysates. *Food Research International*, 103, 253-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.10.044>
- Aguirre, N., Villamizar R., L., Espinel C., C., & Cotes P., A. M. (2009). Efecto del pH y de la actividad de agua sobre el desarrollo de *Nomuraea rileyi* (Hyphomycetes). *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2), 138-144. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882009000200005
- Alippi, A. M. (2019). Data associated with the characterization and presumptive identification of *Bacillus* and related species isolated from honey samples by using HiCrome *Bacillus* agar. *Data in Brief*, 25, artículo 104206. <https://doi.org/10.1016/j.dib.2019.104206>
- Amaya-Gómez, C. V., Porcel, M., Mesa-Garriga, L., & Gómez-Álvarez, M. I. (2020). A framework for the selection of plant growth-promoting rhizobacteria based on bacterial competence mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 86, artículo e00760-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00760-20>
- Bach, E., Sant'Anna, V., Daroit, D. J., Corrêa, A. P. F., Segalin, J., & Brandelli, A. (2012). Production, one-step purification, and characterization of a keratinolytic protease from *Serratia marcescens* P3. *Process Biochemistry*, 47(12), 2.455-2.462. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.10.007>
- Bach, E., Seger, G. D. dos S., Fernandes, G. de C., Lisboa, B. B., & Pereira Passaglia, L. M. (2016). Evaluation of biological control and rhizosphere competence of plant growth promoting bacteria. *Applied Soil Ecology*, 99, 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2015.11.002>
- Bahamón, T., Aycardi, E., Orozco, J., Marín, P., & Bustilo, A. (2001). Preservación de la patogenicidad de *Beauveria bassiana* (Bálsamo) *Vuillemin* (Moniliales: Moniliaceae) contra la broca del café en diferentes sistemas. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 3(1), 80-90. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/30066>
- Beltrán Acosta, C., Moreno, C. A., Blanco, P., Villamizar, L., & Cotes, A. M. (2012). Biological control of *Rhizoctonia solani* and growth promotion activity of *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034 formulations in potato (*Solanum tuberosum*). *IOBC-WPRS*, 78, 223-227. https://www.iobc-wprs.org/members/shop_en.cfm?mod_Shop_detail_produkte=33#toggle71
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249-260. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15666245/>
- Bhat, A. R., Irorere, V. U., Bartlett, T., Hill, D., Kedia, G., Morris, M. R., Charalampopoulos, D., & Radecka, I. (2013). *Bacillus subtilis* natto: A non-toxic source of poly- γ -glutamic acid that could be used as a cryoprotectant for probiotic bacteria. *AMB Express*, 3, artículo 36. <https://doi.org/10.1186/2191-0855-3-36>

- Bosa, C. F., & Cotes, A. M. (1997). Evaluación de la actividad insecticida de aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* (Smith). *Revista Colombiana de Entomología*, 23(3-4), 107-112.
- Bosa O., C. F., Chávez, D., Torres, L., París, A., Villamizar, L., & Cotes, A. M. (2004). Evaluación de aislamientos nativos de *Nomuraea rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 30(1), 93-97. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882004000100014
- Caleza, V., Castillo, S., Gomis, M. D., Kamah, S., López, R., Garcia-Seco, D., Varma, A., & Akdi, K. (2017). Conservation strategies of new fungi samples in culture collections: *Piriformospora indica* case. En A. Varma, & A. Kumar Sharma (eds.), *Modern tools and techniques to understand microbes* (pp. 431-447). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-49197-4>
- Camacho-Sanchez, M., Burraco, P., Gomez-Mestre, I., & Leonard, J. A. (2013). Preservation of RNA and DNA from mammal samples under field conditions. *Molecular Ecology Resources*, 13(4), 663-673. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12108>
- Colección Española de Cultivos Tipo (CECT). (2016). *Memorias: III Certificado de Especialización en Conservación y Control de Cepas Microbianas* [manuscrito inédito].
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de "Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo". *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 147-156. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=77625401016>
- Costa, E., Usall, J., Teixidó, N., Torres, R., & Viñas, I. (2002). Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal of Applied Microbiology*, 92(5), 873-878. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01596.x>
- Cotes, A. M., Zapata, J., Díaz, A., García, M., Medina, C., Cristancho, D., Rodríguez, S., Rodríguez, F., & Uribe, D. (2011). Selección de levaduras filoféricas con potencial para el control biológico de *Botrytis cinerea*. *Fitopatología Colombiana*, 35(2), 51-56. <https://agripfiles.agri-d.net/display/AS-pub-DC23497F01B5DF9912776B163406DE05>
- Cruz Barrera, M., Gómez, M. I., & Serrato Bermúdez, J. C. (2019). Towards the production of fungal biocontrol candidates using inert supports: A case of study of *Trichoderma asperellum* in a pilot fixed bed fermenter. *Biocontrol Science and Technology*, 29(2), 162-184. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1542486>
- Cruz-Cruz, C. A., González-Arno, M. T., & Engelmann, F. (2013). Biotechnology and conservation of plant biodiversity. *Resources*, 2(2), 73-95. <https://doi.org/10.3390/resources2020073>
- Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F. T., Reich, P. B., Jeffries, T. C., Gaitan, J. J., Encinar, D., Berdugo, M., Campbell, C. D., & Singh, B. K. (2016). Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications*, 7, artículo 10541. <https://doi.org/10.1038/ncomms10541>

- El-Tarabily, K. A., & Sivasithamparam, K. (2006). Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Mycoscience*, 47(1), 25-35. <https://doi.org/10.1007/s10267-005-0268-2>
- Espinel, C., Ebratt, E., & Cotes, A. M. (1998). Evaluación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de *Rhammatocerus schistosceroides* (Orthoptera: Acrididae). *Revista Colombiana de Entomología*, 24(1-2), 1-5.
- Falade, A. O., Mabinya, L. V., Okoh, A. I., & Nwodo, U. U. (2019). Studies on peroxidase production and detection of *Sporotrichum thermophile*-like catalase-peroxidase gene in a *Bacillus* species isolated from Hogsback forest reserve, South Africa. *Heliyon*, 5(12), artículo e03012. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03012>
- Fira, D., Dimkić, I., Berić, T., Lozo, J., & Stanković, S. (2018). Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species. *Journal of Biotechnology*, 285, 44-55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.07.044>
- Gaino, A. P. da S. de C., Basseto, M. A., Gasparotto, L., Poltronieri, L. S., & Ceresini, P. C. (2010). Inferência filogenética revela a complexa etiologia das manchas areolada e foliar em seringueira e em outras espécies cultivadas na Amazônia. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 32(3), 385-395. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v32i3.4856>
- García, J. L., Sotelo, P., Monroy, D. M., Barrera, G., Gómez-Valderrama, J., Espinel, C., Barreto, E., & Villamizar, L. F. (2018). Identification and characterization of a *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. isolate having a high potential for the control of the *Diatraea* sp. sugarcane stem borer. *Biología Aplicada*, 35(1), 1.201-1.207. <https://www.medigraphic.com/pdfs/biotecapl/ba-2018/ba181a.pdf>
- González-García, J. (1997). Evaluación de cepas nativas de *Verticillium lecanii* (Zimm) Viegas (Deuteromycete: Moniliales) en el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Homoptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 23(1-2), 25-30.
- Guzmán-Guzmán, P., Porras-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., & Herrera-Estrella, A. (2019). *Trichoderma* species: Versatile plant symbionts. *Phytopathology*, 109(1). <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>
- Hernández Guzmán, C. (2014). *Optimización de las condiciones de cultivo para mejorar el rendimiento de producción y purificación de las proteínas Cry en Bacillus thuringiensis* [tesis de maestría, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (Cicese)]. Cicese Repositorio. <http://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1007/622>
- Humber, R. A. (2012). Preservation of entomopathogenic fungal cultures. En L. A. Lacey (ed.), *Manual of techniques in invertebrate pathology* (2.ª ed., pp. 317-328). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386899-2.00010-5>
- Jaber, L. R., & Alananbeh, K. M. (2018). Fungal entomopathogens as endophytes reduce several species of *Fusarium* causing crown and root rot in sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). *Biological Control*, 126, 117-126. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.08.007>

- Kato, S., Yamagishi, A., Daimon, S., Kawasaki, K., Tamaki, H., Kitagawa, W., Abe, A., Tanaka, M., Sone, T., Asano, K., & Kamagata, Y. (2018). Isolation of previously uncultured slow-growing bacteria by using a simple modification in the preparation of agar media. *Applied and Environmental Microbiology*, 84(19), artículo e00807-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.00807-18>
- Kayingo, G., Sirotkin, V., Hohmann, S., & Prior, B. A. (2004). Accumulation and release of the osmolyte glycerol is independent of the putative MIP channel Spac977.17p in *Schizosaccharomyces pombe*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85(2), 85-92. <https://doi.org/10.1023/B:ANTO.0000020273.64829.9a>
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 634-644. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2405>
- Kitamoto, Y., Suzuki, A., Shimada, S., & Yamanaka, K. (2002). A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*, 43(2), 143-149. <https://doi.org/10.1007/S102670200021>
- Kong, Q., Shan, S., Liu, Q., Wang, X., & Yu, F. (2010). Biocontrol of *Aspergillus flavus* on peanut kernels by use of a strain of marine *Bacillus megaterium*. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1-2), 31-35 <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.036>
- Kumar, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2012). *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 167(8), 493-499. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.05.002>
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (eds.). (2010). *The yeast: A taxonomic study* (5.^a ed). Elsevier Science & Technology. <https://www.sciencedirect.com/book/9780444521491/the-yeasts#book-info>
- Liao, C.-H., & Shollenberger, L. M. (2003). Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiology*, 37(1), 45-50. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01345.x>
- Liu, J., Sui, Y., Wisniewski, M., Droby, S., & Liu, Y. (2013). Review: Utilization of antagonistic yeasts to manage postharvest fungal diseases of fruit. *International Journal of Food Microbiology*, 167(2), 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.09.004>
- López Lastra, C. C., Hajek, A. E., & Humber, R. A. (2002). Comparing methods of preservation for cultures of entomopathogenic fungi. *Canadian Journal of Botany*, 80(10), 1126-1130. <https://doi.org/10.1139/b02-090>
- López-Prieto, A., Martínez-Padrón, H., Rodríguez-López, L., Moldes, A. B., & Cruz, J. M. (2019). Isolation and characterization of a microorganism that produces biosurfactants in corn steep water. *CyTA - Journal of Food*, 17(1), 509-516. <https://doi.org/10.1080/19476337.2019.1607909>
- MacWilliams, M. P. (2009). *Indole test protocol*. American Society for Microbiology. <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol.3202>

- Martirosyan, V., & Steinberger, Y. (2014). Microbial functional diversity in the phyllosphere and lamosphere of different desert plants. *Journal of Arid Environments*, 107, 26-33. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2014.04.002>
- Mercier, J., & Lindow, S. E. (2000). Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1), 369-374. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.1.369-374.2000>
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; a review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183-193. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>
- Neher, O. T., Johnston, M. R., Zidack, N. K., & Jacobsen, B. J. (2009). Evaluation of *Bacillus mycoides* isolate BmJ and *B. mojavensis* isolate 203-7 for the control of anthracnose of cucurbits caused by *Glomerella cingulata* var. *orbiculare*. *Biological Control*, 48(2), 140-146. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.08.012>
- Obando Castellanos, D. M., Burgos Zabala, L. B., Rivera Botía, D. M., Rubiano Garrido, M. F., Bonilla Buitrago, R. R., & Divan Baldani, V. L. (2010). Caracterización de bacterias diazotróficas asimbióticas asociadas al eucalipto (*Eucalyptus* sp.) en Codazzi, Cesar (Colombia). *Acta Biológica Colombiana*, 15(3), 107-120. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/13529>
- Ochoa, J., & Cotes, A. (1998). Evaluación de la actividad biocontroladora de *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces coelicolor* y *Trichoderma hamatum* mediante su uso individual y/o combinada para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Revista de la Asociación Colombiana de Fitopatología y Ciencias Afines*, 22(1-2), 88-93.
- Orberá Ratón, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21, 15-19. <http://www.reviberoammicol.com/2004-21/015019.pdf>
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). (2007). OECD best practice guidelines for biological resource centres. <http://www.oecd.org/sti/emerging-tech/oecdbestpractice-guidelinesforbiologicalresourcecentres.htm>
- Overmann, J., Abt, B., & Sikorski, J. (2017). Present and future of culturing bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 71(1), 711-730. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090816-093449>
- Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 23(1), 23-54. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000323>
- Paraszkiewicz, K., Bernat, P., Siewiera, P., Moryl, M., Paszt, L. S., Trzciński, P., Jałowiecki, Ł., & Płaza, G. (2017). Agricultural potential of rhizospheric *Bacillus subtilis* strains exhibiting varied efficiency of surfactin production. *Scientia Horticulturae*, 225, 802-809. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.034>
- Patil, S. R. (2014). Production and purification of lignin peroxidase from *Bacillus megaterium* and its application in bioremediation. *CIBTech Journal of Microbiology*, 3(1), 22-28. <https://www.cibtech>.

org/J-Microbiology/PUBLICATIONS/2014/Vol-3-No-1/CJM-06-006-SARVAMANGALA-PRODUCTION-BIOREMEDIATION.pdf

Pérez, O., Rodríguez, A., & Cotes, A. (1997). Método rápido y confiable para evaluar la actividad insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 23, 113-118. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000098&pid=S0123-3475200800020001000026&lng=en

Pérez, M., & Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. En Facultad de Medicina de la Universidad de la República, *Temas de bacteriología y virología médica* (2.ª ed., pp. 23-42). <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiyEstructuraBacteriana.pdf>

Public Health England (PHE), & National Health Service (NHS). (2015). UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of *Bacillus* species. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/697260/ID_9i3.1.pdf

Public Health England (PHE), & National Health Service (NHS). (2019). UK Standards for Microbiology Investigations (UK SMI): General information. *Gov.uk*. <https://www.gov.uk/guidance/uk-standards-for-microbiology-investigations-smi-quality-and-consistency-in-clinical-laboratories>

Public Health Wales, National Health Service (NHS), & Health Protection Agency. (2010). Indole test. <http://hemltd.ru/publications/sections/Normativ/foreign/samples/medicine/NHS019/article.pdf>

Rajeswari, P., Jose, P. A., Amiya, R., & Jebakumar, S. R. D. (2015). Characterization of saltern based *Streptomyces* sp. and statistical media optimization for its improved antibacterial activity. *Frontiers in Microbiology*, 5, artículo 753. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00753>

Rao, P. R., & Kavya, P. (2014). Production, isolation and purification of peroxidase using *Bacillus subtilis*. En *2014 1st International Congress on Environmental, Biotechnology, and Chemistry Engineering* (IPCBE, vol. 64, pp. 21-27). <https://doi.org/10.7763/IPCBE>

Raymond C., K., Rojas B., F., Benavides O., E., Cotes, A. M., Villamizar, L., Ronderos J., V., & García M., P. (2004). Efecto de hongos entomopatógenos sobre la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida): uso de activadores de patogenicidad. *Revista Colombiana de Entomología*, 30(1). http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882004000100001

Realpe, M. E., Hernández, C. A., & Agudelo, C. I. (2002). Especies del género *Bacillus*: morfología macroscópica y microscópica. *Biomédica: Revista del Instituto Nacional de Salud*, 22(2), 106-109. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1148>

Rico, M., Piattoni, C. V., González, C., Monela, R., Latorre, M. G., & Lurá, M. C. (2005). Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos. *Fabricib*, 8, 163-172. <https://doi.org/10.14409/fabricib.v8i1.744>

Robertsen, B. K., Åman, P., Darvill, A. G., McNeil, M., & Albersheim, P. (1981). Host-symbiont interactions. *Plant Physiology*, 67(3), 389-400. <https://doi.org/10.1104/pp.67.3.389>

Rodicio, M. del R., & Mendoza, M. del C. (2004). Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica.

Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 22(4), 238-245. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73073-6](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73073-6)

Rubio C., S. A., Vargas A., B. I., & López-Ávila, A. (2004). Evaluación de la eficiencia de *Trichogramma lopezandinensis* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) para el control de *Teda solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en papa almacenada. *Revista Colombiana de Entomología*, 30(1), 107-114. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882004000100016&lng=es&nrm=is&tlng=es

Samuels, G. J., Dodd, S. L., Lu, B.-S., Petrini, O., Schroers, H.-J., & Druzhinina, I. S. (2006). The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Studies in Mycology*, 56, 67-133. <https://doi.org/10.3114/sim.2006.56.03>

Seifert, K. (1996). *Fuskey-Fusarium interactive key*. Agriculture and Agri-Food Canada.

Sharaf, E. F., El-Sayed, W. S., & Abosaif, R. M. (2014). Lecithinase-producing bacteria in commercial and home-made foods: Evaluation of toxic properties and identification of potent producers. *Journal of Taibah University for Science*, 8(3), 207-215. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.03.006>

Smith, J. L., Fratamico, P. M., & Gunther IV, N. W. (2014). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. En S. Sariaslani, & G. M. Gadd (eds.), *Advances in applied microbiology* (vol. 86, pp. 145-197). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00003-2>

Sosa López, A. I., Pazos Álvarez-Rivera, V., Torres Campos, D., & Casadesús Romero, L. (2011). Identificación y caracterización de seis aislados pertenecientes al género *Bacillus* promisorios para el control de *Rhizoctonia solani* Kühn y *Sclerotium rolfsii* Sacc. *Fitosanidad*, 15(1), 39-44. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1562-30092011000100006&lng=es&tlng=es

Stewart, E. J. (2012). Growing unculturable bacteria. *Journal of Bacteriology*, 194(16), 4151-4160. <https://doi.org/10.1128/JB.00345-12>

Sukarno, N., Kurihara, Y., Park, J.-Y., Inaba, S., Ando, K., Harayama, S., Ilyas, M., Mangunwardoyo, W., Sjamsuridzal, W., Yuniarti, E., Saraswati, R., & Widyastuti, Y. (2009). *Lecanicillium* and *Verticillium* species from Indonesia and Japan including three new species. *Mycoscience*, 50(5), 369-379. <https://doi.org/10.1007/s10267-009-0493-1>

Thapa, S., Prasanna, R., Ranjan, K., Velmourougane, K., & Ramakrishnan, B. (2017). Nutrients and host attributes modulate the abundance and functional traits of phyllosphere microbiome in rice. *Microbiological Research*, 204, 55-64. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.07.007>

Torres, R., & López, A. (1997). Estudios básicos para el control microbiológico del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae) con *Beauveria* sp. y *Metarhizium* sp. *Revista Colombiana de Entomología*, 23(1-2), 83-88.

Torres-Torres, L., & Cotes, A. M. (1999). Actividad biocontroladora de hongos entomopatógenos contra *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae) mediante su utilización individual y combinada.

Revista Sociedad Colombiana de Entomología, 25(3-4), 121-129. <http://noesis.uis.edu.co/bitstream/123456789/30354/1/120982.pdf>

Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 36(1), 95-130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>

Wang, J., & Zheng, C. (2012). Characterization of a newly discovered *Beauveria bassiana* isolate to *Frankliniella occidentalis* Perganda, a non-native invasive species in China. *Microbiological Research*, 167(2), 116-120. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2011.05.002>

World Federation for Culture Collections (WFCC). (2010). *Recomendaciones para el establecimiento y funcionamiento de colecciones de cultivos de microorganismos*. http://www.wfcc.info/pdf/Guia_WFCC_espa_ol.pdf

Yadav, A. N., Kumar, R., Kumar, S., Kumar, V., Sugitha, T. C. K., Singh, B., Singh Chauahan, V., Singh Dhaliwal, H., & Kumar Saxena, A. (2017). Beneficial microbiomes: Biodiversity and potential biotechnological applications for sustainable agriculture and human health. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 5(6), 45-57. <https://doi.org/10.7324/jabb.2017.50607>

Yang, H.-J., & Sung, Y. (2011). Biocontrol of mildew with *Bacillus subtilis* in bitter melon (*Momordica charantia* L.) seeds during germination. *Scientia Horticulturae*, 130(1), 38-42. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.05.017>

Zare, R., & Gams, W. (2008). A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and its affinity with the genus *Lecanicillium*. *Mycological Research*, 112(7), 811-824. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.01.019>