

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DEL BIOSURFACTANTE PRODUCIDO POR
SERRATIA UREILYTICA UTS”**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

ING. CARLOS ANDRES ZAMORANO GONZALEZ

DIRECTOR: DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

CODIRECTOR: DR. ARNOLDO WONG VILLARREAL

CUERNAVACA, MORELOS

FEBRERO, 2025

RESUMEN

Los nematodos fitopatógenos, debido a su gran diversidad de hospederos, generan pérdidas económicas significativas a nivel mundial. Entre ellos, el nematodo falso agallador (*Nacobbus aberrans*) y diversos hongos fitopatógenos afectan a diferentes especies de interés económico. Tradicionalmente, el control de estos fitopatógenos se ha basado en el uso de plaguicidas, lo que ha generado problemas de resistencia a los agroquímicos. Como alternativa, se está explorando el uso de microorganismos y sus metabolitos secundarios, como los biosurfactantes, que tienen propiedades antagónicas y pueden actuar como agentes de biocontrol. Este proyecto busca alternativas sustentables y sostenibles para el control de plagas y enfermedades, mediante la actividad biológica del biosurfactante producido por la bacteria *Serratia ureilytica* UTS. La mortalidad de los J2 *N. aberrans* en las pruebas *in vitro* demostró la actividad nematocida del biosurfactante (BS) obteniendo el menor porcentaje de mortalidad de $87 \pm 3.65\%$ y el mayor de $92 \pm 4.28\%$ a las 72 h, mientras que el grupo testigo (Nematrol) obtuvo un porcentaje de mortalidad del $96.0 \pm 2.58\%$. En las cepas de *Fusarium spp* el menor porcentaje de inhibición es de $33.5 \pm 6.97\%$ y el mayor de $80.2 \pm 2.62\%$. Con respecto a la cepa *Alternaria solani* el menor porcentaje de inhibición fue $49.4 \pm 5.06\%$ y el mayor del 100%. El análisis por GC-MS identificó señales de distintos metabolitos; Alanina, N-acetyl-3-phenyl-N-(trifluoroacetyl) éster metílico, DL- Homocisteina y L-Valina N-[2-(chloroiminio)-3-methyl-1-oxobutyl]-, ácido estérico, ácido láurico y ácido palmítico. El programa AntiSMASH identificó regiones del genoma involucrados en la síntesis de metabolitos secundarios, teniendo interés en los NRPS los cuales han sido descritos como encargados en la producción de biosurfactantes. Los biosurfactantes pueden ser una alternativa para el control de plagas y enfermedades, así mismo demuestra que los lipopéptido se tiene una eficiencia en el biocontrol.

DEDICATORIA

A dios por haberme dado la oportunidad de alcanzar una de mis metas profesionales.

A mi familia por haber estado en todo momento en el transcurso de mi vida profesional, por darme su cariño, amor y comprensión incondicionalmente, y saber que siempre tendré un apoyo.

A mi novia por siempre confiar en mis decisiones, por darme su amor y comprensión y estar siempre ahí cuando más la necesito.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías por haberme otorgado la beca con el número 825516.

Al Centro de Investigaciones en Biotecnología por haberme brindado un lugar para seguir con mi camino profesional y haber formado parte de un excelente centro de investigación.

A mis directores de tesis, el Dr. Arnoldo Wong Villarreal y el Dr. José Augusto Ramírez Trujillo por haberme brindado su apoyo, su guía y sus consejos durante todo el proyecto, así mismo por haberme dado la confianza y un lugar en sus grupos de investigación.

A mi comité tutorial, al Dr. Ramon Suarez Rodríguez, a la Dra. Liliana Aguilar Marcelino y al Dr. Víctor Hernández Velázquez por todo el apoyo y por las opiniones a favor del proyecto.

A mis amigos por siempre apoyarme, por sus consejos, por sus enseñanzas, por todos los momentos divertidos que pasamos juntos y sobre todo por habernos cruzado en esta vida.

Así como también en especial al Dr. Julio Cruz y al Dr. Ricardo Sánchez por siempre poder contar con su apoyo, y sobre todo por sus consejos.

También agradecer de todo corazón a la Dra. Lorena Ruíz quien en su momento me apoyo e inspiro para seguir en el camino de la investigación.

Índice

1.	INTRODUCCIÓN.....	10
2.	Marco teórico.....	12
2.1.	<i>Nacobbus aberrans</i>	12
2.2.	Distribución.....	14
2.3.	Clasificación taxonómica de <i>Nacobbus aberrans</i> (Thorne and Allen, 1944).....	14
2.4.	Importancia económica de plagas y enfermedades	15
2.5.	Cultivos de importancia económica que afecta el nematodo falso agallador (<i>Nacobbus aberrans</i>).....	15
2.6.	Afectaciones por <i>Nacobbus aberrans</i>	16
2.7.	Hongos fitopatógenos.....	16
2.8.	<i>Fusarium</i>	17
2.9.	Morfología de <i>Fusarium</i>	18
2.10.	Ciclo biológico o etapas e infección.....	19
2.11.	<i>Alternaria solani</i>	20
2.12.	Morfología de <i>Alternaria</i>	20
2.13.	Taxonomía de <i>Alternaria solani</i> (EPPO, 2024 ^b).....	21
2.14.	Ciclo biológico o etapas de infección.....	22
2.15.	Control biológico	23
2.16.	Control biológico de nematodos y hongos fitopatógenos.....	24
2.17.	<i>Serratia</i>	25
2.18.	Taxonomía del género de <i>Serratia</i> (Schoch <i>et al.</i> , 2020).....	25
2.19.	Biosurfactantes	26
2.20.	Tipos de biosurfactantes	27
2.21.	Composición química de los biosurfactantes.....	27
2.22.	Importancia de los biosurfactantes.....	29
2.23.	Aplicaciones de los biosurfactantes.....	29
2.24.	Microorganismos productores de biosurfactantes	30
2.25.	Modo de acción de los biosurfactantes	30
3.	Justificación	33
4.	Hipótesis.....	34
5.	Objetivos	35
6.	Estrategia experimental	36
7.	Materiales y métodos	37
7.1.	Métodos	37
7.1.1.	Análisis bioinformático para la identificación de genes productores de biosurfactantes.....	37

7.1.2.	Agar azul de metileno	38
7.1.3.	Producción del biosurfactante	38
7.1.4.	Recuperación del biosurfactante crudo	38
7.1.5.	Pruebas tensioactivas	39
7.1.5.1.	Tensión superficial	39
7.1.5.2.	Índice de emulsificación	39
7.1.5.3.	Colapso de gota.....	40
7.1.5.4.	Dispersión de aceite.....	40
7.2.	Actividad biológica del biosurfactante producido por la cepa <i>Serratia ureilytica</i> UTS	41
7.2.1.	Ensayo contra <i>Nacobbus aberrans</i>	41
7.2.2.	Ensayo antifúngico.....	42
7.3.	Análisis estadístico.....	43
7.4.	Análisis por cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS).....	44
8.	Resultados.....	45
8.1.	Análisis bioinformático para la identificación de genes productores de biosurfactante	45
8.2.	Agar azul de metileno	52
8.3.	Evaluación del biosurfactante	53
8.4.	Tensión superficial	53
8.5.	Indicé de emulsificación	54
8.6.	Colapso de gota.....	54
8.7.	Dispersión de aceite	55
8.8.	Actividad nematocida	56
8.9.	Actividad antifúngica	58
8.10.	Identificación por GC-MS	61
9.	Discusión de resultados	62
10.	Conclusión.....	65
11.	Perspectivas.....	66
12.	Bibliografía.....	67
13.1.	Medios de cultivos utilizados	83
13.2.	Artículo	85

Índice de figuras

Figura 1. Diferentes etapas del *N. aberrans*, observadas por micrografías; resaltando sus características morfológicas y estructurales en cada etapa. Etapas juveniles: cuerpo entero (A); cuerpo anterior y cola (B y C). Hembra inmadura: cuerpo entero (D); región de cola de la vulva (E); campo lateral (F); extremo anterior y posterior (G, H). I, J; Fragmento anterior y posterior del cuerpo masculino. Hembra adulta (K), extremo anterior en perfil (L) y de frente (M); área terminal de la vulva (N). Barras de escala K= 400 μ m; todos los demás = 25 μ m (Vovlas *et al.*, 2007). 13

Figura 2. Estructuras morfológicas del género *Fusarium*. A) macroconidios, B) monofiálides ramificadas, C) microconidios, D) esporodoquio, E) clamidosporas en cadena, F-G) polifiálides. Obtenido de (Domsch *et al.*, 2007). 18

Figura 3. Ciclo del marchitamiento o fusariosis del tomate (*Solanum lycopersicum*) causado por (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) (tomado de Jangir *et al.*, 2021). 19

Figura 4. Morfología del género *Alternaria*. A) Conidióforo macronematoso con una rama dando origen a los poroconidios. B) Conidióforo corto no ramificado con un dictioconidio. C) Conidios con septos transversales, longitudinales y oblicuos. D) Conidióforos a p partir del micelio. E) Conidios con septos transversales. F) Conidios en cadenas con sucesión acrópeta. Obtenido de (Pérez-Reyes *et al.*, 2024) 21

Figura 5. Ciclo de infección de *Alternaria*, obtenido del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) (Acuña *et al.*, 2021) 22

Figura 6. Grupo biosintético de la estructura del gen swrW (serrawetina W1) Organización genética del genoma de la cepa *Serratia ureilytica* UTS por el análisis AntiSMASH. A) Grupos de genes biosintéticos con la identificación del core del gen swrW: dominio de condensación, dominio de acetilación, dominio de thiolación, dominio de thioesterasa. B) organización del gen. C) proteína biosintética con los dominios de condensación, acetilación, thiolación y thioesterasa. 48

Figura 7. Árbol filogenético de genes de serrawetina, se puede observar que el contig 23 de *S. ureilytica* UTS en negritas, se separa de los dos grupos de serrawettina, indicando que puede ser otro biosurfactante. 51

Figura 8. Caja de Petri de agar azul de metileno con la cepa *S. ureilytica* UTS, mostrando resultado negativo. 52

Figura 9. Emulsificación del biosurfactante con base hidrofóbica, a) emulsificación a las 0 h, b) emulsificación a las 24. La flecha roja indica la altura total de la mezcla, mientras que la flecha azul indica la emulsificación. 54

Figura 10. Colapso de gota. a) se utilizó un microtubo eppendorf de 200 μ L, se añadió una base hidrofóbica y se añadió 10 μ L del sobrenadante libre de células, b)

se utilizó un gota de agua y se le añadió 5 µL del sobrenadante libre de células, la flecha verde in indica la gota de agua, la flecha roja indica la actividad del biosurfactante..... 55

Figura 11. Dispersión de aceite. a) efecto de dispersión por la presencia de un biosurfactante, b) base hidrofóbica antes de la presencia del biosurfactante, la flecha roja representa el diámetro del halo. 55

Figura 12. Actividad nematocida del biosurfactante producido por la cepa *Serratia ureilytica* UTS contra *Nacobbus aberrans* J², se muestra la media ± de la desviación estándar del porcentaje de mortalidad, $p \leq 0.001$, test Tukey 0.05 de confiabilidad, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes..... 57

Figura 13. Vista microscópica (4X) de la actividad nematocida; A) Control, B) Nematrol, C) 10mg/mL, D) 20mg/mL, E) 30 mg/mL 57

Figura 14. Vista macroscópica de la inhibición del crecimiento micelar por un biosurfactante. Todos los tratamientos están de menor a mayor concentración en dirección de izquierda a derecha, iniciando con el control, a) *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sp* y *Alternaria solani*. 59

Figura 15. Vista microscopia 40x de la actividad antifúngica de un biosurfactante. Las imágenes del lado izquierdo corresponden al control, mientras que las imágenes del lado derecho corresponden al porcentaje más alto, sin embargo *A. solani*, solo llega al T4. A), *Fusarium oxysporum*, b) *Fusarium sp* y c) *Alternaria solani*..... 60

Índice de tablas

Tabla 1. Mircoorganismo productores de biosurfactantes modificado a partir de (Desai & Banat, 1997; Borah 2021).....	31
Tabla 2. Genes involucrados en la producción de biosurfactantes modificado a partir de (Borah, 2021; Markande <i>et al.</i> , 2021).....	32
Tabla 3. Resultados de la identificación de la región de síntesis de metabolitos secundarios en <i>Serratia ureilytica</i> UTS	46
Tabla 4. Resultados de la identificación de la región de síntesis de metabolitos secundarios en <i>Serratia ureilytica</i> UTS	47
Tabla 5. Análisis blast global con la secuencia NRPS del contig 19 del genoma de <i>S. ureilytica</i> UTS con 11 secuencias de biosíntesis del Biosurfactante.....	49
Tabla 6. Análisis blast global con la secuencia NRPS del contig 19 del genoma de <i>S. ureilytica</i> UTS con 11 secuencias de biosíntesis del biosurfactante.	50
Tabla 7. Pruebas tensioactivas aplicadas al extracto crudo del biosurfactante.....	53
Tabla 8. Porcentaje de mortalidad de la actividad nematocida del biosurfactante crudo.	56
Tabla 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelar de la actividad antifúngica del biosurfactante.	59

1. INTRODUCCIÓN

Los nematodos agalladores, como el nematodo falso agallador (*Nacobbus aberrans*), impactan cultivos de interés económico y comprende 18 familias con aproximadamente 84 especies, incluyendo tanto cultivos como malezas (Manzanilla-López, 2002). Un claro ejemplo son las pérdidas en el cultivo del chile habanero que pueden alcanzar entre el 30-90% (Bridge & Starr, 2007). De igual manera los cultivos de interés económico se ven afectados por enfermedades causadas por hongos fitopatógenos, provocando daños en raíces, tallo, ahogamiento de la semilla, así como la disminución de la calidad de los frutos, lo que puede resultar en pérdidas y destrucción de hasta el 60% (Narváez-Montaño *et al.*, 2023). Esto dependerá de los cultivos infectados, ya que algunos casos, como el del tomate, las perdidas pueden alcanzar hasta el 100%. Algunos otros ejemplos de cultivo son: arroz (*Oryza sativa*), trigo (*Triticum*), cebada (*Hordeum vulgare*), avena (*Avena sativa*), soja (*Glycine max*), maní (*Arachis hypogaea*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), alfalfa (*Medicago sativa*), garbanzos (*Cicer arietinum*), lentejas (*Lens culinaris*), guisantes (*Pisum sativum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), papa (*Solanum tuberosum*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), canola (*Brassica napus*), café (*Coffea arabica*), algodón (*Gossypium*) y lechuga (*Lactuca sativa*) (Ajayi-Oyetunde & Bradley, 2018).

El uso de productos químicos para el control de plagas o enfermedades en la agricultura tiene un impacto negativo en el medio ambiente, provocando la contaminación del suelo y afluentes de agua, así como intoxicaciones en mamíferos y enfermedades en los seres humanos. Además, el uso de estos productos provoca que las plagas y enfermedades desarrollen resistencia a los agroquímicos, reduciendo su efectividad con el tiempo (Hernández-Trejo *et al.*, 2019; Romano Casas, 2019).

Una de las alternativas para el control de las plagas son los antagonistas naturales. Este método ofrece varias ventajas sobre los productos químicos, ya que son biodegradables, no son tóxicos y son altamente específicos. Entre los microorganismos antagonistas para el control de plagas y enfermedades, se destacan las rizobacterias, especialmente los géneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Maheshwari *et al.*, 2013).

Las bacterias del género *Serratia* son considerada un patógenos facultativo, sin embargo, su aplicación como agente de biocontrol, tiene una interacción negativa para los fitopatógenos, debido al efectos de las enzimas, toxinas y/o metabolitos secundarios que reduce el inóculo del fitopatógeno. (Liu *et al.*, 2010; Wong-Villarreal *et al.*, 2021).

Por lo que el objetivo del presente estudio es evaluar la actividad biológica del biosurfactante producido por la bacteria *S. ureilytica* UTS contra el nematodo falso agallador (*N. aberrans*) y hongos fitopatógenos (*Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Fusarium sp*).

2. Marco teórico

2.1. *Nacobbus aberrans*

El nematodo *N. aberrans* comúnmente conocido como “Nematodo falso agallador” es un nematodo endoparásito causando la formación de agallas en las raíces de sus huéspedes (Ramírez-Suarez, 2011). *N. aberrans* es muy inusual ya que es el único nematodo conocido que tiene una etapa endoparásito migratoria y una etapa sedentaria (biotrófica) dentro de su ciclo de vida, estos nematodos presentan un ciclo de vida que incluye las siguientes etapas: huevos, juveniles de segundo estadio (J^2) juveniles de tercer estadio (J^3), juveniles de cuarto estadio (J^4), hembras preadultas y hembras adultas (Eves-van den Akker *et al.*, 2014) (Figura 1). En la forma sedentaria los juveniles de segunda etapa (J^2) penetran las raíces del huésped y el desarrollo de las etapas siguientes J^3 , J^4 , hembras preadultas, hembras maduras pueden ocurrir tanto dentro como fuera de las raíces. Este proceso implica múltiples penetraciones y repetidas antes de alcanzar la etapa adulta madura. Sin embargo, en su forma sedentaria estricta, la etapa del J^2 infecta la raíz y etapas posteriores se desarrollan dentro de las raíces, con etapas que muestran un comportamiento migratorio endoparásito (Costilla, 1985; Manzanilla-López, 2002).

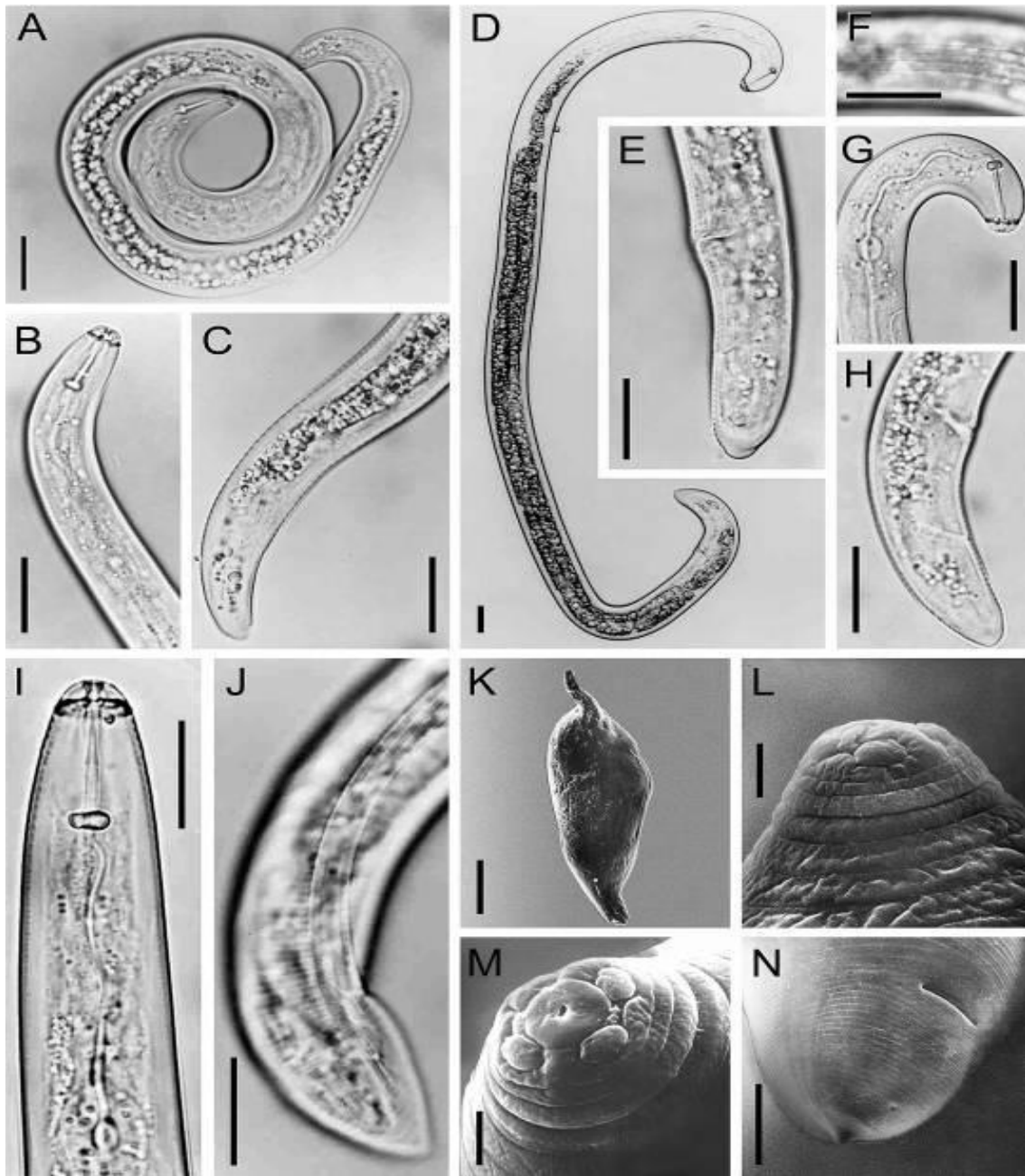


Figura 1. Diferentes etapas del *N. aberrans*, observadas por micrografías; resaltando sus características morfológicas y estructurales en cada etapa. Etapas juveniles: cuerpo entero (A); cuerpo anterior y cola (B y C). Hembra inmadura: cuerpo entero (D); región de cola de la vulva (E); campo lateral (F); extremo anterior y posterior (G, H). I, J; Fragmento anterior y posterior del cuerpo masculino. Hembra adulta (K), extremo anterior en perfil (L) y de frente (M); área terminal de la vulva (N). Barras de escala K= 400 µm; todos los demás = 25 µm (Vovlas *et al*, 2007).

2.2. Distribución

El nematodo *N. aberrans* tiene una amplia distribución que abarca desde el sur hasta el norte del continente americano. Se encuentra en países como Argentina, Bolivia, Chile, Ecuador, Estados Unidos, México y Perú (Reid A, 2003). También hay reportes de la presencia del nematodo *N. aberrans* en Europa y Asia (Manzanilla-López, 2010; Lodovica Gullino *et al.*, 2020), sin embargo, en algunos países como Brasil, Colombia, Guyana, Paraguay, Surinam, Uruguay y Venezuela no se tiene registros (Manzanilla-López, 2002; Manzanilla-López, 2010). En México se ha registrado la presencia de *N. aberrans* en los estados de Puebla, Guanajuato, Hidalgo y Zacatecas, Estado de México y Morelos (Martínez-Fuentes *et al.*, 2009).

2.3. Clasificación taxonómica de *Nacobbus aberrans* (Thorne and Allen, 1944)

Phylum: Nematoda

Clase: Chromadorea

Orden: Rhabditida

Suborden: Nematoda

Infraorden: Tylenchina

Superfamilia: Tylenchomorpha

Familia: Pratylenchidae

Subfamilia: Nacobbinae

Género: *Nacobbus*

Especie: *Nacobbus aberrans*

2.4. Importancia económica de plagas y enfermedades

Los estatutos reglamentarios adoptados por las agencias de protección vegetal como la NAPPO (Norte Organización Americana de Protección de Plantas), EPPO (Organización Europea de Protección de Plantas) y COSAVE (Comité de Sanidad Vegetal del Cono Sur), clasifican a *N. aberrans* como una plaga reglamentada de categoría A1 (OEPP/EPPO, 2001) (OEPP/EPPO, 2001). Esta designación implica que la especie es de alta preocupación fitosanitaria debido a la alta reproductibilidad y su control es fundamental para prevenir su propagación en las áreas afectadas (Manzanilla-López *et al.*, 1997) produciendo además una enfermedad conocida como jicamilla causado por el nematodo *N. aberrans* (Sánchez Portillo, 2010). Por el grave impacto que provoca en la agricultura en general, con pérdidas que oscilan entre el 35-90 %, dependiendo del cultivo (Manzanilla-López *et al.*, 2008; Nabor-Romero *et al.*, 2020), aun que hay pocos reportes de perdidas monetarias Nicol, 2011 menciona que los daños ascienden a 80, 000 millones de dólares anuales en todo el mundo.

2.5. Cultivos de importancia económica que afecta el nematodo falso agallador (*Nacobbus aberrans*)

Los cultivos afectados por *N. aberrans* comprende 18 familias con aproximadamente 84 especies, entre cultivos y malezas, las familias afectadas por este nematodo son: *Amaranthaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Basellaceae*, *Brassicaceae*, *Cactaceae*, *Caryophyllaceae*, *Chenopodiaceae*, *Convolvulaceae*, *Cucurbitaceae*, *Euphorbiaceae*, *Fabaceae*, *Labiatae*, *Malvaceae*, *Nyctaginaceae*, *Oxalidaceae*, *Plantaginaceae*, *Polygonaceae*, *Portulacaceae*, *Solanaceae*, *Tropaeolaceae* y *Zygophyllaceae* (Manzanilla-López *et al.*, 2010), *N. aberrans* afecta principalmente a papa (*Solanum tuberosum*), tomate (*Solanum lycopersicum*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), pimiento (*Capsicum annuum*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*) (Manzanilla-López *et al.*, 2002; Caccia *et al.*, 2013).

2.6. Afectaciones por *Nacobbus aberrans*

En México, los cultivos de chile son afectados por nematodos y en especial falsos agalladores como *N. aberrans*. Esta infestación puede disminuir la producción de los cultivos, generando pérdidas que oscilan entre el 30% al 90% del total. El manejo de esta plaga se realiza principalmente de forma convencional y se enfoca en el uso de nematicidas sintéticos (Bridge & Starr, 2007). Uno de los principales problemas es la resistencia de estas plagas, lo que lleva a buscar alternativas amigables con el medio ambiente, y la biodegradación de los compuestos químicos. Una de las mejores alternativas es el control biológico de nematodos, que incluye el uso de microorganismos antagonistas o aquellos capaces de inducir defensa en las plantas de igual manera esta estrategia no solo ayuda a reducir la población de nematodos, sino que también promueve prácticas sostenibles.

2.7. Hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos son de importancia económica en el sector agrícola, debido a las enfermedades ocasionadas en las plantas. Atacan principalmente las raíces y los tallos, así mismo producen micotoxinas que quedan adheridas a los productos comercializados ocasionando pérdidas económicas, sin embargo, estos hongos pueden presentarse postcosecha y tener un mayor impacto negativo a sus consumidores, cabe mencionar que de las 8000 especies reportadas como fitopatógenas los principales géneros con mayor relevancia son: *Botrytis*, *Lasiodiplodia*, *Penicillium*, *Colletotrichum*, *Phoma*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Fusarium* y *Alternaria* (Trigos *et al.*, 2008; Castañeda-Ramírez *et al.*, 2016), ocasionando pérdidas que rondan del 40% en plantaciones de cítricos hasta el 100% en cultivos de fresa (*Fragaria vesca* L), tomate (*Solanum sect. Lycopersicon*), garbanzo (*Cicer arietinum*), entre otros (Polanco *et al.*, 2019; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2019). Esta variabilidad en las pérdidas destaca la gravedad del impacto que estas enfermedades fúngicas pueden tener en la producción agrícola.

2.8. *Fusarium*

El género *Fusarium* es un hongo fitopatógeno de importancia mundial debido a que genera enfermedades en cereales como: el maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum*), avena (*Avena sativa*) y cebada (*Hordeum vulgare*), también se ven afectados los cultivos de leguminosas como: el frijol (*Phaseolus vulgaris*) y la soya (*Glycine max*), además de los cultivos de cucurbitáceas como: calabaza (*Cucurbita moschata Duchesne*), melón (*Cucumis melo*) y sandía (*Citrullus lanatus*), así mismo afectando algunas semillas de importancia alimenticia e industrial como: girasol (*Helianthus annuus*), linaza (*Linum usitatissimum*), maní (*Arachis hypogaea*), entre otros. La distribución de este hongo fitopatógeno es cosmopolita, lo que provoca que esté presente en 81 principales cultivos de importancia económicas de 101, causando principalmente pudrición de tallos, marchitamiento, aborto de semillas, pudrición de granos, causando clorosis en las plantas (DGSV-CNRF, 2020; Pérez-Reyes *et al.*, 2024).

Las cepas de *Fusarium oxysporum* y *Fusarium sp* tienen un gran impacto en cultivos de interés económico (Leslie & Summerell, 2006) debido a la producción de metabolitos tóxicos como el ácido fusárico, moniliformina pigmentos de naftoquinona y nectriafurona, provocando marchitamiento vascular de las plantas, así como pudrición de raíces, por otra parte, presentan clamidosporas, macroconidios y microconidios como mecanismos de protección en condiciones de baja humedad y altas temperaturas (Koike *et al.*, 2019).

2.9. Morfología de *Fusarium*

Este hongo presenta diferentes estructuras; incluyendo macroconifios con tres septos, monofialides de forma corta y ramificadas, y microconidios que carecen de septos y tienen una forma ovalada, esporodoquio. También se observan esporodoquios, clamidosporas en cadena y polifialides como se observa en la Figura 2. Presenta un crecimiento rápido, variando la coloración entre rosa, rojizo dependiendo del medio de cultivo, teniendo un aspecto algodonoso y abundante en la parte aérea (Salazar González *et al.*, 2020).

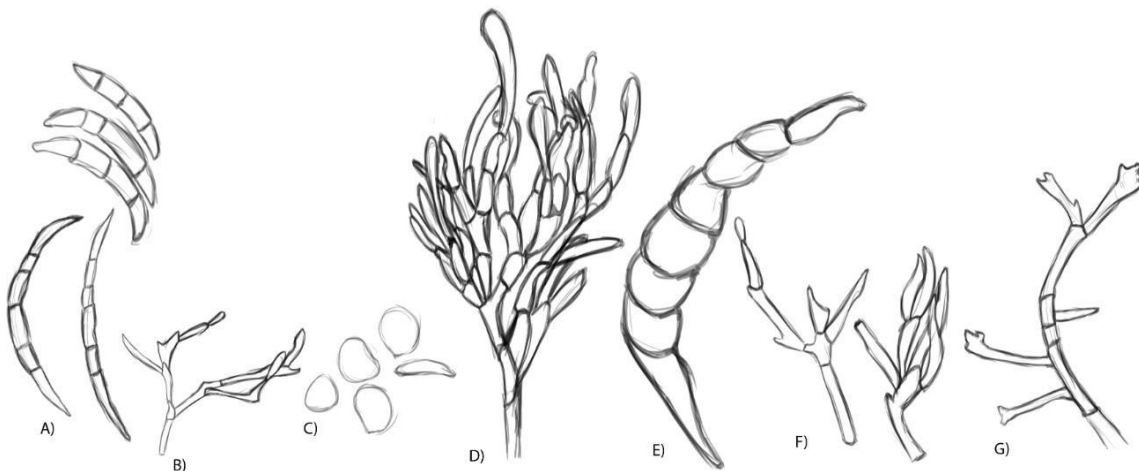


Figura 2. Estructuras morfológicas del género *Fusarium*. A) macroconidios, B) monofialides ramificadas, C) microconidios, D) esporodoquio, E) clamidosporas en cadena, F-G) polifialides. Obtenido de (Domsch *et al.*, 2007).

Taxonomía de *Fusarium* (EPPO, 2024^a)

Phylum: Ascomycota

Clase: Sordariomycetes

Orden: Hipocreales

Familia: Nectriaceae

Género: *Fusarium*

Especie: *Fusarium oxysporum*.

Fusarium sp

2.10. Ciclo biológico o etapas e infección

Las clamidosporas de *Fusarium* que están presentes en el suelo, materia orgánica o agua inician su infección en etapas tempranas del cultivo, haciendo se presente en la migración de la fotosíntesis de la base de los tallos a las extremidades y posterior debilitamiento de la planta, la enfermedad dependerá de la cantidad de inóculo que esté presente al momento de la siembra, los tubos germinales de las esporas penetran las raíces atrás de alguna lesión o herida presente en el manejo del cultivo, posteriormente se propagan mediante de la corteza de la raíz y se coloniza a través del sistema de transporte de agua (Figura 3) (Villaverde, 2018; DGSV-CNRF, 2020).

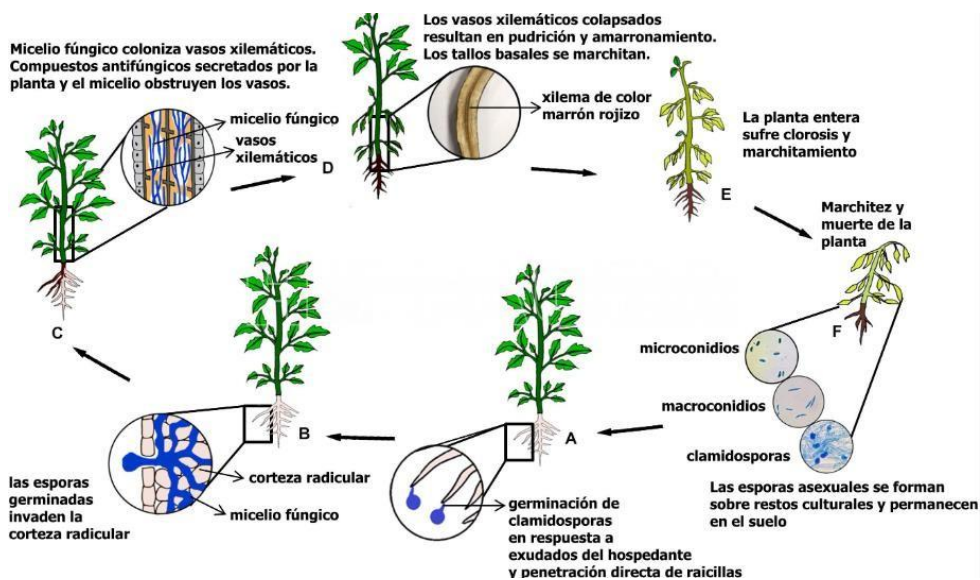


Figura 3. Ciclo del marchitamiento o fusariosis del tomate (*Solanum lycopersicum*) causado por (*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*) (tomado de Jangir et al., 2021).

2.11. *Alternaria solani*

El hongo fitopatógeno *Alternaria solani* está presente en el suelo y en la materia orgánica en descomposición, es cosmopolita y acumula alrededor de 250 especies y muchas de ellas son patógenos de plantas por ejemplo; *A. solani*, *A. alternata*, *A. arborescens*, *A. brassicae*, *A. brassicicola*, *A. citri*, *A. cucumerinai*, *A. danci*, *A. gaisen*, *A. infectoria*, *A. longipes*, *A. mali*, *A. porri*, *A. radicina*, *A. tensísima*, estas especies tienen la capacidad producir fitotóxicas, afectando el cultivo antes y después de la cosecha. Los cultivos de importancia económica que se ven afectados por estos hongos son el trigo (*Triticum*), maíz (*Zea mays*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), cacahuate (*Arachis hypogaea*), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), cebada (*Hordeum vulgare*), alfalfa (*Medicago sativa*), pastos (*Cynodon dactylon*), entre otros, además pueden ser transmitidos por medio de las semillas (Pavón-Morano *et al*, 2012; Pérez-Reyes *et al*, 2024) teniendo una disminución en el campo de hasta el 46% desde la germinación de la semilla (SENASICA., 2021). *Alternaria solani* es de importancia agrícola debido a que afecta principalmente a los cultivos de tomate, chile y papa causando la enfermedad del tizón temprano provocando pérdidas en el rendimiento de los cultivos que oscilan entre el 30 y el 100% anualmente (Quiroga-Madrigal *et al.*, 2007; SIAP, 2016; Acuña *et al.*, 2021).

2.12. Morfología de *Alternaria*

Esta especie presenta conidióforo; que se distinguen por tener hifas por tener de tonalidad oscura, las cuales pueden encontrarse en grupos o de forma aislada, originándose a partir de una hifa en común. Aunque, no presenta ramificación, puede tener ramas laterales. Los conidios poseen poros, y se les denomina poroconidios, con formas ovoides o elipsoidales, también presentan células apicales en forma de romo y filamentoso como se observa en la Figura 4 (SENASICA., 2021; Pérez-Reyes *et al.*, 2024).

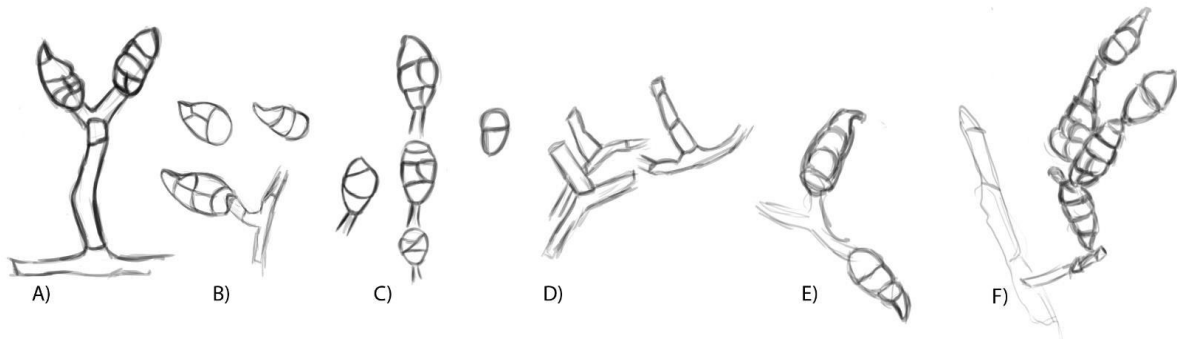


Figura 4. Morfología del género *Alternaria*. A) Conidióforo macronematoso con una rama dando origen a los poroconidios. B) Conidióforo corto no ramificado con un dictioconidio. C) Conidios con septos transversales, longitudinales y oblicuos. D) Conidióforos a p partir del micelio. E) Conidios con septos transversales. F) Conidios en cadenas con sucesión acrópeta. Obtenido de (Pérez-Reyes *et al.*, 2024)

2.13. Taxonomía de *Alternaria solani* (EPPO, 2024^b)

Phylum: Ascomycota

Clase: Dothideomycetes

Orden: Pleosporales

Familia: Pleosporaceae

Género: *Alternaria*

Especie: *Alternaria solani*

2.14. Ciclo biológico o etapas de infección

La infección ocurre con el micelio o conidios presentes en restos de material orgánico, favorecida por las condiciones de alta humedad. Se disemina con la ayuda del viento o lluvia propagando el inóculo desde el suelo. Este hongo penetra los estomas o se introduce detrás de la cutícula, y la infección también puede ocurrir mediante el uso de herramientas infectadas. Las manchas sobre las hojas se observan generalmente de 2 a 3 días después de la inoculación, como se observa en la Figura 5 (Acuña *et al*, 2021; Herbario Virtual, 2024).

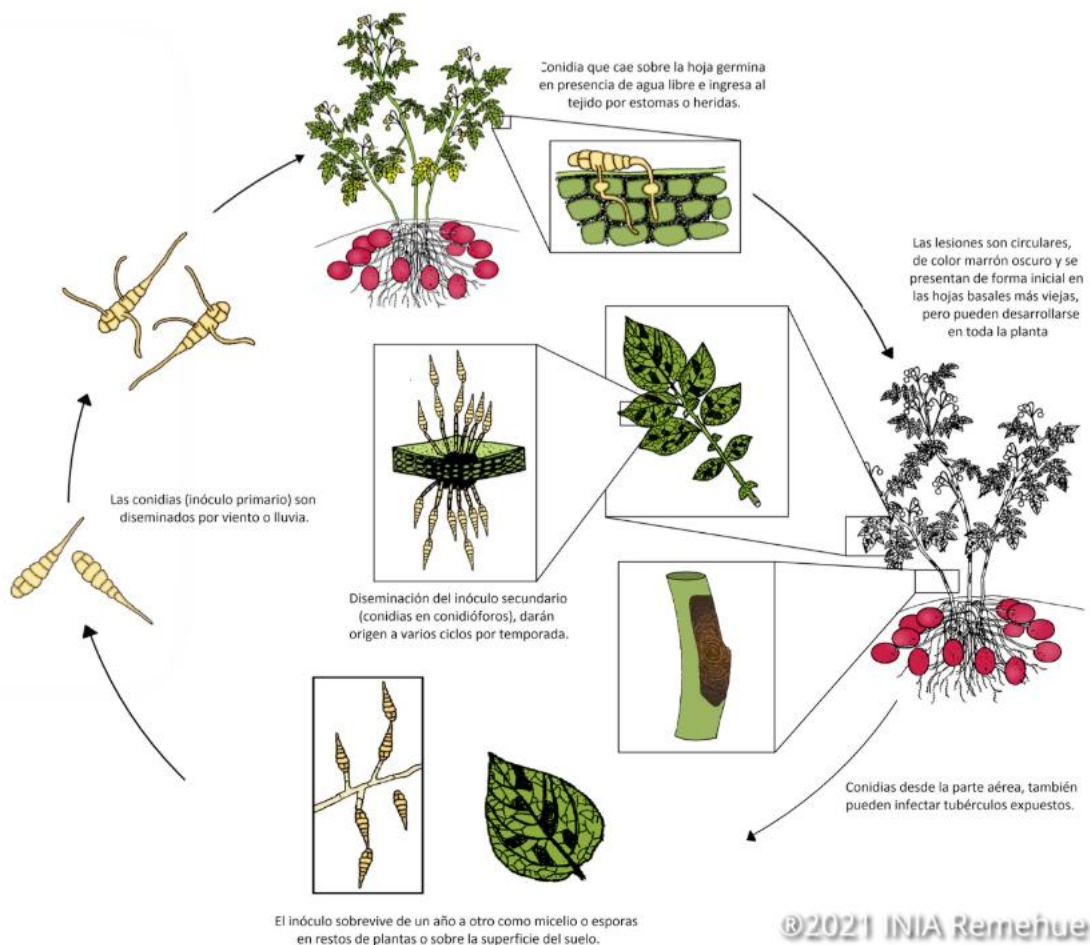


Figura 5. Ciclo de infección de *Alternaria*, obtenido del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) (Acuña *et al.*, 2021).

2.15. Control biológico

El uso de poblaciones de enemigos naturales para reducir el inóculo de plagas o enfermedades en cultivos de manera temporal y en algunos casos permanente, se denomina control biológico (Van Driesche *et al.*, 2007). El control biológico se divide en tres estrategias; (1) control biológico clásico que consiste en la introducción de enemigos naturales endémicos de la plaga para el control de la plaga objetivo, (2) control biológico de conservación consiste en el uso o estimulación de enemigos naturales presentes en la zona de la infección de la plaga, y (3) control biológico aumentativo en donde se realiza la liberación en masa de nuevos antagonistas naturales a una zona ya tratada (Van Driesche *et al.*, 2007; Stenberg *et al.*, 2021).

El uso de antagonistas naturales para el control de plagas y enfermedades se ha retomado en los últimos años, esto debiéndose a los estragos que ha dejado el uso de agroquímicos, ya que es el método principal para el control de plagas (Pérez-Agis *et al.*, 2004; González-Maldonado *et al.*, 2015; Reséndiz Ramírez *et al.*, 2016). Este método de control es la principal contaminación en el sector agrícola, contribuyendo al deterioro de suelos y mantos acuíferos, y causando efectos negativos en el ambiente. Esto incluye la eliminación de insectos benéficos, enemigos naturales, y polinizadores, así como la toxicidad para los seres humanos que pueden provocar enfermedades crónicas y genéticas (Romano Casas, 2019). Además, su uso puede generar resistencia en las plagas a diferentes productos químicos (Hernández-Trejo *et al.*, 2019).

Los enemigos naturales de plagas tienen una gran ventaja para el control biológico, debido que producen metabolitos secundarios que no dañan el ambiente, no son tóxicos para animales, y son biodegradables. Entre los enemigos naturales más utilizados y de importancia biotecnológica, se destacan las *Rhizobacterias* promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés), especialmente los géneros *Bacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Maheshwari *et al.*, 2013). Esta última bacteria pertenece a un género que se encuentran en la rizosfera que actúan como antagonistas de plagas y enfermedades, debido a la interacción de la bacteria con el objeto de estudio se ha visto que puede reducir las poblaciones del inóculo, debido a

la producción de enzimas, toxinas y metabolitos secundarios que ejercen presión mediante diferentes métodos de interacción (Wong-Villarreal *et al.*, 2021).

2.16. Control biológico de nematodos y hongos fitopatógenos

El control de las plagas y enfermedades pueden llevarse a cabo de manera cultural, con el objetivo de reducir el daño ocasionado a los cultivos de interés económico, además de mantener en menor presencia a estos organismos fitopatógenos. Unos de los principales controles es la rotación de cultivos. Esta práctica consiste en cultivar plantas que no sean susceptibles a la plaga o enfermedad en cuestión, dependiendo del organismo fitopatógeno que se desea evitar. Además, el uso inadecuado de riegos en parcelas infectadas promueve la proliferación de plagas y enfermedades. Otra alternativa es el descanso de las parcelas durante un tiempo prolongado, lo que puede reducir el riesgo de la infestación por plagas y enfermedades (Marban *et al.*, 1989; Pozo *et al.*, 2007; Tejera-Hernández *et al.*, 2011). Otra medida es el uso de plantas antagonistas o plantas trampas, un ejemplo de estas son: *Tagetes spp.*, Las leguminosas del género *Mucuna deeringiana* y *Canavalia ensiformis* (Santiago, 2020), Sin embargo, el uso de agroquímicos aun utilizados para el control de nematodos es el uso de Telone II y no fumigantes como aldicarb, oxamyl, y fenamifos (Cortez Hernández, 2019). Además, para el control de hongos se utilizan los fungicidas de origen químico como son los compuestos de cobre y los compuestos organomercúricos, entre otros (Ferrer, 2003; Mandal *et al.*, 2020). Sin embargo, el uso inadecuado e indiscriminado de los agroquímicos han generado que las plagas y enfermedades adquieran resistencia a estos compuestos, lo cual es una problemática hoy en día. Una de las opciones ecológicas y amigables con el medio ambiente es el control biológico con el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) como son; *Bacillus*, *Penibacillus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Actinoplanes*, *Agrobacterium*, *Azobacter* y *Serratia*. Esta última bacteria tiene un alto potencial como controlador de plagas, debido a los metabolitos producidos. Su finalidad es controlar plagas y enfermedades a través de diferentes mecanismos de acción, como la producción de las quitinasas o los biosurfactante (Wong- Villarreal *et al.*, 2021; Marques-Pereira *et al.*, 2022).

2.17. *Serratia*

El género *Serratia* está ampliamente distribuido en suelo, agua, plantas, animales, invertebrados y humanos (Wong-Villarreal *et al.*, 2021). Pertenece a la familia Enterobacteriaceae, integrada por bacilos Gram negativos cortos y rectos de 0.5-0.8µm de diámetro y 0.9-2.0µm de longitud, generalmente móviles por flagelos peritricos (Von Graevenitz, 1980; Van Houdt *et al.*, 2007; Alonso Fernández, 2002). Son bacterias anaeróbicas facultativas con requisitos nutricionales bajos, quimiorganotrofos con metabolismo de tipo respiratorio y fermentativo, fermentan la glucosa y reducen el nitrato, y oxidasa negativos (Cano-González *et al.*, 2004; Venanzio, 2014). Existen, 14 especies y 2 subespecies reconocidas en el género, *S. entomophila*, *S. ficara*, *S. fonticola*, *S. glossinae*, *S. grimesii*, *S. liquefaciens*, *S. maercescens subsp. marcescens*, *S. marcescens subsp. sakuensis*, *S. nematodiphila*, *S. odorifera*, *S. plymuthica*, *S. proteamaculans*, *S. quinivorans*, *S. rubidaea*, *S. ureilytica* (Casas-Moreno, 2010; Mahlen, 2011; Aguilar-Gamboa & Suclupe-Campos, 2023).

2.18. Taxonomía del género de *Serratia* (Schoch *et al.*, 2020)

Dominio:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	<i>Serratia</i>
Especie:	<i>Serratia ureilytica</i>

Algunas especies del género *Serratia* producen un pigmento rojo no difusible denominado prodigiosina (Álvarez-López *et al.*, 2014), y algunas especies tienen actividad antifúngica, antibacteriana y nematocida (Wong-Villarreal *et al.*, 2021). Estos compuestos incluyen a los: Compuestos orgánicos volátiles (COV), incluidos trisulfuro de dimetilo, sotorifeno y metanotioland terpenoides (Finlay *et al.*, 2012; Popova *et al.*, 2014; Su *et al.*, 2016), tienen una amplia actividad inhibitoria bacteriostática citotóxica contra diversas bacterias y hongos patógenos, moscas de la fruta y nematodos (Dang, *et al.*, 2016; Schmidt *et al.*, 2017) la producción de quitinasas, sideróforos, proteasas, serralisinas, hemolisina y serrawettina W2 que han sido reportados para el biocontrol de nematodos (Wong-Villarreal, 2021). Además, son capaces de sintetizar metabolitos secundarios bioactivos adicionales, como biosurfactantes (serrawettina, stephensiolidas, rubiwettina y ramnolipidos), althiomicina y bacteriocinas (Clements, 2019).

2.19. Biosurfactantes

Los biosurfactantes son compuestos biológicos anfifílicos producen extracelularmente o como parte de la membrana celular por diversas levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Chen *et al.*, 2007). Una de las características de los tensioactivos es su parte hidrofílica, que tiene una afinidad por el agua, así mismo, posee un extremo hidrofóbico que tiene afinidad por hidrocarburos (aceites, grasas, derivados del petróleo, entre otros). Estas moléculas presentan diversos grupos funcionales y son sintetizados por microorganismos (Desai & Banat, 1997; Banat *et al.*, 2000; Makkar *et al.*, 2011), y que actúan como metabolitos secundarios, lo que ayuda a las bacterias en la retención de moléculas hidrofóbicas, provocando una disminución en la viscosidad (Satpute *et al.*, 2010).

2.20. Tipos de biosurfactantes

Los biosurfactantes se clasifican principalmente en función de su estructura (Shekhar *et al.*, 2015), su composición química, su peso molecular, con relación a su tamaño, además los compuestos pueden ser de bajo peso molecular, (biosurfactantes), o alto peso molecular (bioemulsificantes) (Rosenberg & Ron, 1999; Banat *et al.*, 2010; Sáenz-Marta *et al.*, 2015). Las propiedades fisicoquímicas, la disociación en el agua, y el origen microbiano. Según su peso molecular existen dos grandes grupos: los glucolípidos, fosfolípidos y lipopéptidos tienen un peso molecular bajo, mientras que los polisacáridos anfifílicos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas o mezclas complejas de biopolímeros, son de alto peso molecular (Rahman *et al.*, 2002; Gautam & Tyagi, 2006; Martinez- Checa *et al.*, 2007; Pacwa-Płociniczak *et al.*, 2011; Sáenz-Marta *et al.*, 2015).

2.21. Composición química de los biosurfactantes

Los biosurfactantes tiene un grupo hidrofílico compuesto de aminoácidos, péptidos aniónicos o catiónicos pueden ser; mono, di, o polisacáridos. El grupo hidrofóbico está constituido por ácidos grasos saturados o insaturados. La mayor parte de estos compuestos esta agrupado por glicolípidos, polipéptidos, lipoproteínas, fosfolípidos y ácidos grasos (Desai & Banat, 1997; Mondragon Mora, 2011).

Los glicolípidos son los: biosurfactante más común y fácilmente disponibles, están constituido por carbohidratos que consisten en mono-, di, tri, y tetrasacáridos, que incluyen a la glucosa, la manosa y el sulfato de galactosa formando una combinación con una larga cadena alifática de ácidos y ácidos hidroxílicos (Veenanadig *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2007; Rahman & Gakpe, 2008). Generalmente son compuestos de carga aniónica, con la capacidad de generar cambios en la hidrofobicidad de la membrana bacteriana. Los mejores biosurfactantes conocidos entre los glicolípidos más

estudiados son los ramnolípidos, trihalolípidos y sorfolípidos (Desai & Banat, 1997; Shekhar *et al.*, 2015), los soforolípidos compuestos de monosacáridos u oligosacáridos unidos a fracciones lipídicas para formar moléculas tensioactivas de bajo peso molecular (Sharma *et al.*, 2016).

Los polipéptidos y lipoproteínas: son el segundo grupo de biosurfactantes microbianos más estudiados, representado por lipopéptidos, que son simples moléculas organizadas en un compuesto cuyo esqueleto está conformado por un péptido cíclico unido a una cola de ácido graso, sin embargo, existen numerosas variantes en su estructura que generan cambios en su comportamiento como agente tensoactivo (Desai & Banat, 1997; Perfumo *et al.*, 2010; Mondragon-Mora, 2011). Un gran número de lipopéptidos cíclicos, incluidos los decapeptidos y lipopéptidos producen antibióticos. Estos contienen un lípido unido a una cadena polipeptídica llamado lipopéptido las moléculas de esta clase de biosurfactantes en general consisten en péptidos cíclicos unidos a una grasa ácida, se sabe que varias bacterias producen esas moléculas parecidas a los antibióticos, entre ellas *Bacillus subtilis*, que produce surfactina (Sudhanshu Shekhar, 2014). Una característica importante de la surfactina es su capacidad para lisar eritrocitos de mamíferos y formar esferoplastos la cual se utiliza para detectar la producción de surfactina a través de la hemólisis de agar sangre (Rahman & Gakpe, 2008).

Los ácidos grasos son los componentes solubles en grasa de todas las células vivas que tienen una cadena larga y recta de átomos de carbono junto con átomos de hidrógeno a lo largo de la cadena y un grupo -COOH (carboxilo) en el otro extremo. Si la molécula de ácido graso tiene enlaces simples entre moléculas de carbono a carbono, entonces se consideran saturadas (por ejemplo, ácido butírico, ácido láurico, ácido mirístico, etc.), y si tiene enlaces dobles o triples, entonces son considerados como ácidos grasos insaturados (por ejemplo, ácido palmitoleico, ácido oleico, ácido miristoleico, ácido linoleico, ácido araquidónico, etc.) (Borah *et al.*, 2021). El balance hidrofílico o lipofílico de los ácidos grasos está relacionado con la longitud de la cadena de hidrocarburo. Los ácidos grasos que disminuyen considerablemente la tensión superficial e interfacial son aquellos que en su molécula presentan entre 12 y 14 átomos

de carbono (Desai & Banat, 1997; Gautam & Tyagi, 2006; Mondragon Mora, 2011). Los fosfolípidos son los derivados de las moléculas de glicerol con dos moléculas de ácidos grasos y un grupo fosfato con carga negativa. El grupo fosfato cargado negativamente en el fosfolípido es de naturaleza hidrófila, y las cadenas de ácidos grasos no polares son de naturaleza hidrófoba. Durante la formación del micelio en el agua, se disponen de forma esférica con la cabeza hidrófila orientado hacia el agua y las colas hidrófobas ocultándose en el interior, lejos del contacto el agua (Borah *et al.*, 2021).

2.22. Importancia de los biosurfactantes

Los biosurfactantes ofrecen numerosas ventajas, como baja toxicidad, un alto nivel de biodegradación y mejor compatibilidad con el ambiente. Además, tiene una alta productividad de emulsiones, un alto grado de selectividad y actividad específica en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad. También poseen la capacidad de sintetizar sistemas de retroalimentación renovables en el entorno. Se le consideran como alternativas "verdes" a los surfactantes sintéticos, pero quizás lo más importante es que la estructura química de los biosurfactantes es única y exhibe una gran diversidad estructural que incluye glicolípidos, lipopéptidos, ácidos grasos, lípidos sideróforos y surfactantes poliméricos (Desai & Banat, 1997; Cameotra & Makkar, 1998; Soberón-Chávez & Maier, 2011).

2.23. Aplicaciones de los biosurfactantes

Los biosurfactantes al ser moléculas versátiles tienen diversas aplicaciones. En el área médica; se utilizan como antitumorales, anti-biopelículas, antiinflamatorios, cicatrizante entre otros. En el área industrial, se emplean como textiles, alimentos, petroquímica, farmacéutica. También son útiles en el área de la biorremediación (incluyendo el tratamiento de aguas residuales, remediación agroindustrial). Además, en la agricultura

estos compuestos son valiosos como agentes controladores de plagas (insectos, nematodos, entre otros) (Markande *et al.*, 2021; Wong-Villarreal *et al.*, 2021; Marques-Pereira *et al.*, 2022).

2.24. Microorganismos productores de biosurfactantes

Los biosurfactante son producido por diversos tipos de microorganismos entre ellos se destacan las bacterias como: *aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Burkholderia* (*Pseudomonas cepacia*), *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus mojavensis*, *Acinetobacter bouvetii*, etc (Tabla 1). También se conocen algunos de los genes que se encuentran involucrados en la producción de un biosurfactante en bacterias (Tabla 2) (Youssef *et al.*, 2004; Mulligan, 2005; Tugrul & Cansunar, 2005; Ron & Rosenberg, 2006; Wei *et al.*, 2007; Bordoloi & Konwar, 2008; Saravanakumari & Mani, 2010; Aparna *et al.*, 2012; Luna *et al.*, 2012; Chan *et al.*, 2013; Chaprão *et al.*, 2015; Shekhar *et al.*, 2015; Vijayakumar & Saravanan, 2015; Fooladi *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2017 Ghosh *et al.*, 2020).

2.25. Modo de acción de los biosurfactantes

El modo de acción de los biosurfactantes no está completamente descrito ya que la mayoría de las aplicaciones se han centrado en temas de biorremediación por contaminación de hidrocarburos. Sin embargo, algunos autores sugieren que la actividad de estos compuestos actúa a nivel de membrana, lo que provoca a cambios en la morfología de los hongos, como la deformación de hifas o baja carga de esporas. Así mismo, en insectos tiene, los biosurfactantes se encuentran en el intestino medio, donde se lleva a cabo la digestión, observándose deformaciones y poros en el intestino, lo que indica una actividad lítica en las paredes celulares (Mnif, *et al.*, 2015; Mnif, *et al.*, 2016; Ben Khedher *et al.*, 2020).

Tabla 1. Microorganismo productores de biosurfactantes modificado a partir de (Desai & Banat, 1997; Borah 2021)

Biosurfactante	Sub-clase	Organismos	Actividad biológica
Glicolípidos	Ramnolípidos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Buenos agentes tensoactivos y emulsificantes. Aumentan la hidrofobicidad de la membrana bacteriana
		<i>Pseudomonas sp</i>	
	Trehalolípidos	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
		<i>Rhodococcus erythropolis</i>	
	Soforolípidos	<i>Torulopsis bombicola</i>	
		<i>Torulopsis tapicola</i>	
		<i>Torulopsis petrophilum</i>	
Polipéptidos y lipoproteínas	Péptido-lípidos	<i>Bacillus lincheniformis</i>	Excelentes agentes espumosos, muy activos en la interfaz, debido a sus grandes propiedades de disminuir en gran medida los niveles de tensión interfacial a bajas concentraciones. Modulan la hidrofobicidad de la membrana bacteriana.
	Serrawettina	<i>Serratia marcescens</i>	
	Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	
	Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>	
	Gramicidinas	<i>Bacillus brevis</i>	
	Polymyxinas	<i>Bacillus polymyxa</i>	
Fosfolípidos, ácidos grasos	Proteína-lípida manoproteína	<i>Candida tropicalis</i>	Excelentes agentes tensoactivos
	Proteína-lípida-carbohidrato	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
		<i>Debaryomyces polymorphus</i>	
	Proteína PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

Tabla 2. Genes involucrados en la producción de biosurfactantes modificado a partir de (Borah, 2021; Markande *et al.*, 2021).

Nombre del organismo	Nombre del biosurfactante	Gen involucrado en la producción	Referencia
<i>Ustilago maydis</i>	Mannosylerythritol lipid	<i>emt1</i>	(Hewald, 2005)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rhamnolipid	<i>Rhl</i> (<i>rhlA</i> , <i>rhlB</i> , <i>rhlR</i> , y <i>rhlL</i>)	(Wittgens, 2018)
<i>B. subtilis</i> RB14	Iturin A	<i>ituD</i> <i>ituA</i> <i>ituB</i> <i>ituC</i>	(Das <i>et al.</i> , 2008)
<i>B. subtilis</i>	Surfactin	<i>srfA</i> <i>srfB</i> <i>srfC</i> <i>srfD</i>	(Das <i>et al.</i> , 2008)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Viscosin	<i>LuxR</i> - tipo de reguladores transcripcionales	(De Bruijn & Raaijmakers, 2009)
<i>Starmerella bombicola</i> (Candida)	Sophorolipid	<i>cyp52M1</i> , <i>ugtA1</i> , <i>ugtB1</i> y <i>mdr</i>	(Kurtzma <i>et al.</i> , 2010)
<i>Acinetobacter radioresistens</i> KA53	Alasan	<i>alnA</i>	(Das <i>et al.</i> , 2008)
<i>Serratia marcescens</i>	Serrawettin W1	<i>pswP</i>	(Das <i>et al.</i> , 2008)
<i>Serratia marcescens</i> 274	Serrawettin W1	<i>swrW</i>	(Das <i>et al.</i> , 2008)
<i>Serratia liquefaciens</i> MG1	Serrawettin W2	<i>swrA</i> , <i>swrI</i> , <i>swrR</i>	(Das <i>et al.</i> , 2008)

3. Justificación

Uno de los principales desafíos en la actualidad es la identificación de microorganismos capaces de producir metabolitos secundarios con actividad antagónica. Que puedan utilizarse como biocontrol contra plagas y enfermedades en cultivos de interés económico. Esta necesidad surge debido a la toxicidad de los plaguicidas, la resistencia de las plagas, la contaminación ambiental y los problemas de salud que estos químicos pueden causar en los seres humanos, por el contrario, los fitopatógenos, como nematodos y hongos representan un problema significativo a nivel mundial, ya que generan daños considerables en los cultivos, lo que se traduce en pérdidas económicas para el sector agrícola. En este contexto, el biosurfactante producido por la cepa *Serratia ureilytica* UTS muestra gran potencial como agente antagónico contra el nematodo falso agallador (*Nacobbus aberrans*) así como, contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Fusarium* sp, además, los biosurfactantes se caracteriza por ser no toxicidad, biodegradable y no tener un impacto negativo en el medio ambiente.

4. Hipótesis

El biosurfactante producido por *Serratia ureilytica* UTS tiene actividad nematocida y fungicida contra el nematodo *Nacobbus aberrans* y los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Fusarium sp.*

5. Objetivos

Objetivo general

Evaluar la actividad biológica del biosurfactante producido por *Serratia ureilytica* UTS contra el nematodo falso agallador y hongos fitopatógenos.

Objetivos específicos

Producir, obtener y evaluar el biosurfactante producido por *Serratia ureilytica* UTS.

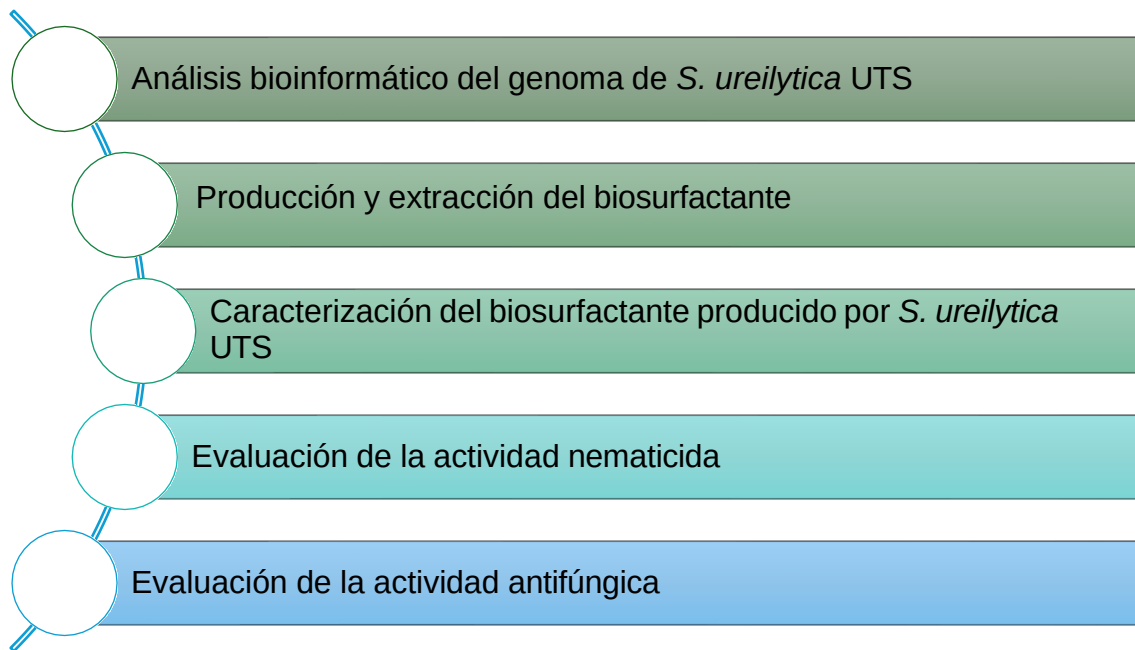
Analizar el genoma de *Serratia ureilytica* UTS mediante un análisis bioinformático en busca de genes productores de biosurfactante.

Caracterizar el biosurfactante producido por *Serratia ureilytica* UTS.

Evaluar la actividad nematocida del biosurfactante producido por *Serratia ureilytica* UTS contra *Nacobbus aberrans* (J₂).

Evaluar la actividad fungicida del biosurfactante producido por *Serratia ureilytica* UTS contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Fusarium* sp.

6. Estrategia experimental



7. Materiales y métodos

7.1. Métodos

7.1.1. Análisis bioinformático para la identificación de genes productores de biosurfactantes

La identificación de los genes relacionados con la biosíntesis de biosurfactantes se realizó en el genoma de *S. ureilytica* UTS mediante la herramienta bioinformática AntiSMASH desde su servidor <https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start> (Medema *et al.*, 2011), con este análisis lo que se busca es identificar los posibles genes relacionados con la biosíntesis de los metabolitos secundarios presentes en el genoma de *S. ureilytica* UTS.

AntiSMASH permite la entrada de archivos de diferente tipo (FASTA, GBK o EMBL) y también puede proporcionar un número de acceso a GenBank/RefSeq, que es utilizado por el servidor web para obtener el archivo asociado de GenBank. Si se elige la opción de archivo FASTA, el programa realiza una predicción de genes utilizando su herramienta de marcos abiertos de lectura largos (ORFs largos) para construir un modelo del gen basado en la secuencia proporcionada. (Espinoza, 2022).

También se utilizó la herramienta bioinformática BioSurfDB desde su servidor www.biosurfdb.org la información obtenida con este programa se compara con la base de datos de su servidor, que incluye listas de biosurfactantes, agrupados por organismo productores de biosurfactantes, nombre del surfactante, clase y referencia (Oliveira *et al.*, 2015).

El modelo de base de datos del sistema BioSurfDB fue diseñado para hacer el modelado de los principales conceptos y relaciones en los dominios de biodegradación y producción de surfactantes. Este modelo fue implementado en MySQL. Se han creado secuencias de comandos Perl para admitir el filtrado y la carga de datos de GenBank (Benson *et al.*, 2012). Todos los datos de secuencias nucleicas o proteicas, KEGG se representaron utilizando formatos de archivo estándar FASTA (Pearson, 1990; Kanehisa, 2001), para las vías y PUBMED para las referencias de artículos. Se

han incluido enlaces URL para conectar los datos de este repositorio a fuentes externas con el objetivo de respaldar una política de datos enlazados (Oliveira *et al.*, 2015).

7.1.2. Agar azul de metileno

El medio agar azul de metileno fue descrito por (Siegmund & Wagner, 1991) para la identificación de ramnolípidos, de la familia de los glucolípidos, sin embargo, esta prueba es de bajo espectro ya que debido a la naturaleza solo detecta biosurfactantes con carga aniónica, para la identificación de la presencia de biosurfactantes aniónicos el azul de metileno y el bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) hacen que ocurra una precipitación del biosurfactante y así formando un halo alrededor de las colonias, este proceso es el sugerido de lo que ocurre en el medio de cultivo, la condiciones de incubación fueron; 24 h a 30 °C, y para favorecer la visualización del halo se sugiere almacenar las placas a 4°C durante 24h (Gunther *et al.*, 2005; Sumathi & Yogananth, 2016; Barrionuevo, 2017; Jaramillo, 2019).

7.1.3. Producción del biosurfactante

Se realizó un pre-cultivo de la cepa *S. ureilytica* UTS y se incubo 17 h a 30°C por 140 rpm en un matraz de 250 mL con un total de 50 mL de medio LB. En un matraz de 1 L con 400 mL de medio estéril PG (peptona de caseína 4 g/L, glicerol 14 g/L y (NH₄)₂SO₄ 1.50 g/L) se inóculo el 10% de su volumen del medio PG (Rosas-Galván *et al.*, 2018) y fue incubado a 30°C por 144 h a 140 rpm.

7.1.4. Recuperación del biosurfactante crudo

Después de las 144h de incubación el medio de cultivo fue centrifugado a 6000 rpm por 25 min a 4 °C. Todo el sobre nadante libre de células fue obtenido y acidificado a pH 2 con una solución de HCl 1 M, (Mukherjee *et al.*, 2006) posteriormente se le agrego 2 volúmenes de etanol frío (4 °C ± 2) (Phetrong *et al.*, 2008) La solución etanólica se

agito durante 30 min, y se incubó a 4 °C por 72 h con el objetivo de precipitar el biosurfactante. Los sedimentos formados se eliminaron por centrifugación a 6000 rpm por 20 min a 4°C, la solución libre de impurezas fue evaporada en un rotavapor, hasta obtener una solución marrón de aspecto viscoso (García-Reyes *et al*, 2018).

7.1.5. Pruebas tensioactivas

Se realizaron cuatro pruebas para detectar la actividad tensioactiva del biosurfactante producido por la cepa *S. ureilytica* UTS. Las pruebas fueron aplicadas al sobrenadante libre de células donde se encuentra el biosurfactante; la reducción de la tensión superficial, índice de emulsificación, dispersión de aceite y el colapso de gota, con esto se pudo comprobar la actividad tensioactiva del biosurfactante.

7.1.5.1. Tensión superficial

La tensión superficial será determinada con el sobrenadante libre de células del producto de la incubación de la cepa *S. ureilytica* UTS, se midió a temperatura ambiente (28 °C) con la ayuda de un tensiómetro, la validez de las lecturas de tensión superficial se comprobará con agua destilada (67 ± 1.7 mN/m) antes de cada lectura (Aparna *et al*, 2012; Somoza-Coutiño *et al*, 2020).

7.1.5.2. Índice de emulsificación

La prueba de emulsificación se determinó con el sobrenadante libre de células del medio de cultivo de 144h, el cual sirvió para realizar el ensayo utilizando aceite de soya en una relación 1:1. Después se agito por dos minutos con la ayuda de un vortex a máxima velocidad, después de 24 h se tomó la medida de emulsificación (Cooper & Goldenberg, 1987; Sumathi & Yogananth, 2016; Barrionuevo, 2017; García-Reyes, *et al*, 2018; Jaramillo, 2019), y se determinó el porcentaje mediante la siguiente formula:

Ecuación 1

$$IE = H_a/H_b \times 100$$

Donde H_a es la altura de la capa de emulsión, H_b es la altura de la mezcla total.

$$IE = h \times 100 / H$$

Donde H es la altura total de la mezcla y h es la altura de la emulsificación

7.1.5.3. Colapso de gota

Para la prueba de colapso de gota se utilizó tubos eppendorf de 200 μ L, agregándoles 100 μ L de aceite de soya (sin embargo puede ser sustituido con alguna otra base de hidrofóbica), posteriormente se agregó 10 μ L del sobrenadante libre de células, la capacidad de los biosurfactantes para desestabilizar una superficie de origen hidrofóbica que a su vez tiene una relación con la tensión superficial, a su vez las moléculas de agua al ser agregadas fueron repelidas y permanecieron estables, sin embargo, el sobrenadante que porta el biosurfactante, colapso debido a la reducción de la tensión superficial (Jain *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 2010; Sumathi & Yogananth, 2016; Santos-Goncalves, 2017).

7.1.5.4. Dispersión de aceite

Se realizó la metodología de Morikawa *et al* (2000) con modificaciones de acuerdo con los objetivos del proyecto, consistió en añadirle 20 mL de agua a una caja Petri de 90 x 15 mm para posteriormente añadir 1 mL de aceite quemado de motor para tener una capa de aceite, luego se coloca suavemente 0.2 mL del sobrenadante libre de células, si hay biosurfactante presente en el sobrenadante el aceite se desplazara y se formará un halo transparente. El diámetro del halo transparente se correlaciona con la actividad tensioactiva, ya que un aumento del diámetro significa una elevada actividad del biosurfactante. (Sharma *et al.*, 2014; García-Reyes & Yañez-Ocampo, 2016). Los datos del diámetro del halo fueron obtenidos con un vernier electrónico y se representaron por el promedio del halo de transparencia.

7.2. Actividad biológica del biosurfactante producido por la cepa *Serratia ureilytica* UTS

7.2.1. Ensayo contra *Nacobbus aberrans*

La actividad biológica del biosurfactante producido por la cepa *S. ureilytica* UTS fue evaluado a tres diferentes concentraciones: 10, 20 y 30 mg/mL, se colocó un grupo control positivo (Nematrol Plus 6 mg/mL) y un grupo control negativo (agua), las pruebas *in vitro* se realizaron en una placa Elisa de 96 pocillos en cada pocillo se le añadió 50 µL del tratamiento correspondiente (Nematrol, agua o biosurfactante a diferentes concentraciones) y 50 µL de agua destilada que tenía 100 J2 y se mezcló suavemente, cada pocillo representa una unidad experimental, para la distribución de los tratamientos se realizó un diseño completamente aleatorizado, por lo tanto, los tratamientos consistieron en cinco repeticiones y se realizaron tres replicas experimentales. Posteriormente se incubó en una cámara de humedad a 28°C con agitación; después de 72 h, la mortalidad fue evaluada añadiendo 10 µL de NaOH 1 N a cada tratamiento (pocillo), esto estimuló a los J₂ sobrevivientes, mientras que los nematodos que no presentaron motilidad se consideraron muertos. Las muestras se observaron bajo un microscopio óptico (10X), mientras que los resultados porcentuales de mortalidad del bioensayo se estimaron con la siguiente fórmula (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2023).

$$\% \text{Mortalidad} = (\text{número de larvas muertas} / \text{número de larvas muertas} + \text{número de larvas vivas}) \times 100$$

7.2.2. Ensayo antifúngico

La actividad antifúngica del biosurfactante de la cepa *S. ureilytica* UTS fue evaluado mediante la inhibición del crecimiento micelial de *F. oxysporum*, *Alternaria solani* y *Fusarium sp.* Las concentraciones evaluadas del BS crudo fueron (0.02, 0.04, 0.1, 0.5 y 1 %), se utilizaron 15 mL de medio PDA para verter en placas Petri y se inóculo con discos de 12 mm con micelios de los hongos fitopatógenos en el centro de cada placa ya solidificada y se incubaron a 28°C por 7 días (144h) mientras que para el control se utilizó agua destilada estéril, cada tratamiento se realizó por triplicado, el diámetro del crecimiento micelial se midió cada 24 horas hasta las 144h y el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial se calculó con la siguiente formula (Mnif *et al.*, 2015; Sarwar *et al.*, 2018; Ben Khedher *et al.*, 2020).

Formula 1

$$\%MGI = (dc-dt/dc) \times 100$$

Formula 2

$$\%Inhibición = (1-(FG/CG)) \times 100$$

Donde FG es el diámetro del crecimiento del hongo tratado y CG es el diámetro del crecimiento del hongo control.

7.3. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los bioensayos se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) para los datos de mortalidad del nematodo *Nacobbus aberrans* (J₂) y los datos del porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (%MGI) fueron transformados mediante la función arcoseno para cumplir con los supuestos de normalidad. Los datos fueron sometidos a un ANOVA de una vía, posteriormente se realizó una prueba Tukey con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ para la comparación de medias, para verificar la normalidad de la mortalidad de los J₂ y el porcentaje de inhibición de los hongos por la actividad del biosurfactante se realizó una prueba Shapiro-Wilk. Las pruebas fueron analizadas usando R versión del programa 4.3.2 (Team, 2023).

7.4. Análisis por cromatografía de gases acoplado a masas (GC-MS)

El análisis de cromatografía de gases acoplados a masas se realizó en un equipo TRACE GC de la marca Thermo Scientific con un detector de masas con trampa de iones ITQ900 (Thermo Electron Corporation, Milán, Italia). El gas portador fue helio con un flujo de 1 mL/min. La columna utilizada fue TRACE-5MS (30 m, 0.25 μ m de película y 0.25 mm de diámetro interno). El GC estaba equipado con un inyector split-splitless que se mantuvo a 270°C. En el método, el horno se programó de la siguiente manera: inicialmente 50°C por 1 min, luego la temperatura se aumentó en tres pasos: de 50 a 300°C a 7°C/min y finalmente se mantuvo a 300°C por 5 min, dando un tiempo cromatográfico total de 56 min. Los espectros de masas se adquirieron mediante ionización por impacto de electrones a 70 eV y el detector se configuró en modo TIC/Scan (corriente de iones total) de 50 a 650 m/z con una velocidad de escaneo de 0.2 s⁻¹ (Dwell). Las temperaturas de la línea de transferencia y de la fuente de iones se mantuvieron a 270 y 200°C respectivamente. Los datos brutos se procesaron utilizando el software XcaliburTM versión 4.0 (Thermo Scientific, EE. UU).

8. Resultados

8.1. Análisis bioinformático para la identificación de genes productores de biosurfactante

El programa AntiSMASH detectó diferentes regiones que están involucradas en la síntesis de metabolitos secundarios como se observa en la Tabla 3, además se pudieron observar siete regiones de péptidos no ribosomal (NRPS) los cuales se describen en la Tabla 4, y se detectó una serrawettina W2, sin embargo, al analizar todas estas regiones hubo otra región de la cual podría codificar para la serrawettina W1. Para confirmar la presencia de cualquiera de las serrawettina se hizo un Blast global con secuencias que contienen la región de biosíntesis de dicho biosurfactante. Además de la identificación de los metabolitos que se encuentran en el genoma, también muestra una predicción de la arquitectura de los dominios presentes en la biosíntesis del gen de interés en este caso la serrawettina W1 (swrW); Dominios de Condensación (C), Acetilación (A), Thiolación (T), y Thioesterasa (TE).

Tabla 3. Resultados de la identificación de la región de síntesis de metabolitos secundarios en *Serratia ureilytica* UTS

Sitios genómicos		Tipos de producto	Clúster conocido más similar	
Sitio de Inicio	Sitio de Termino		Productos más similares	Similitud
185,895	231,603	NRPS	Prodigiosina	12%
22,715	42,993	Contienen RRE	Lankacidina C	13%
55,816	126,324	T1PKS, NRPS	Viobactin	46%
44,923	71,365	Tiopéptido	Antígeno O	14%
49,059	71,156	Metalóforo similar a los opinos	Yersinopina	100%
98,489	124,157	Betalactona	-	-
1	30,126	NRPS	5-dimetilalilindol-3-acetonitrilo	22%
39, 030	39,704	Hserlactona	-	-
1	26, 213	NRPS	xenotetrapéptido	100%
68, 210	93, 533	NRPS	rizomia A/rizomio B/rizomido C	100%
1	50, 947	NRP-metalóforo, NRPS	tricrisobactina/ tricrisacactina cíclica/crisobactina/dicrisobactina	46%
6,335	46, 367	NRPS, Tiopéptido, LAP	microcina E492	12%
629	34, 899	NRPS	-	-
1	2,393	NRPS	Kolossin	100%

Tabla 4. Resultados de la identificación de la región de síntesis de metabolitos secundarios en *Serratia ureilytica* UTS

Región	coordenadas	Clúster similar	Similitud
1.1	185,895 – 23,1603 (45,708pb)	Prodigiosina	12%
12.1	1 - 30,126 (30, 126 pb)	5-dimetilalilindol-3-acetonitrilo	22%
18.1	1 – 26,213 (26, 213 pb)	xenotetrapéptido	100%
19.1	68, 210 – 93, 533 (25, 323)	rizomia A/rizomio B/rizomido C	100%
23.1	1 – 50, 947 (50, 947 pb)	tricrisobactina/ cíclica/crisobactina/dicrisobactina	46%
46.1	629 – 34, 899 (34, 270 pb)	-	-
65.1	1 – 393 (393 pb)	Kolossin	100%

Además de la identificación de los metabolitos que se encuentran en el genoma, también nos da una predicción de la arquitectura de los dominios presentes en la biosíntesis del gen de interés en este caso la serrawettina W1 (swrW); Dominios de Condensación (C), Acetilación (A), Thiolación (T), y Thioesterasa (TE) como se muestra en la Figura 6.

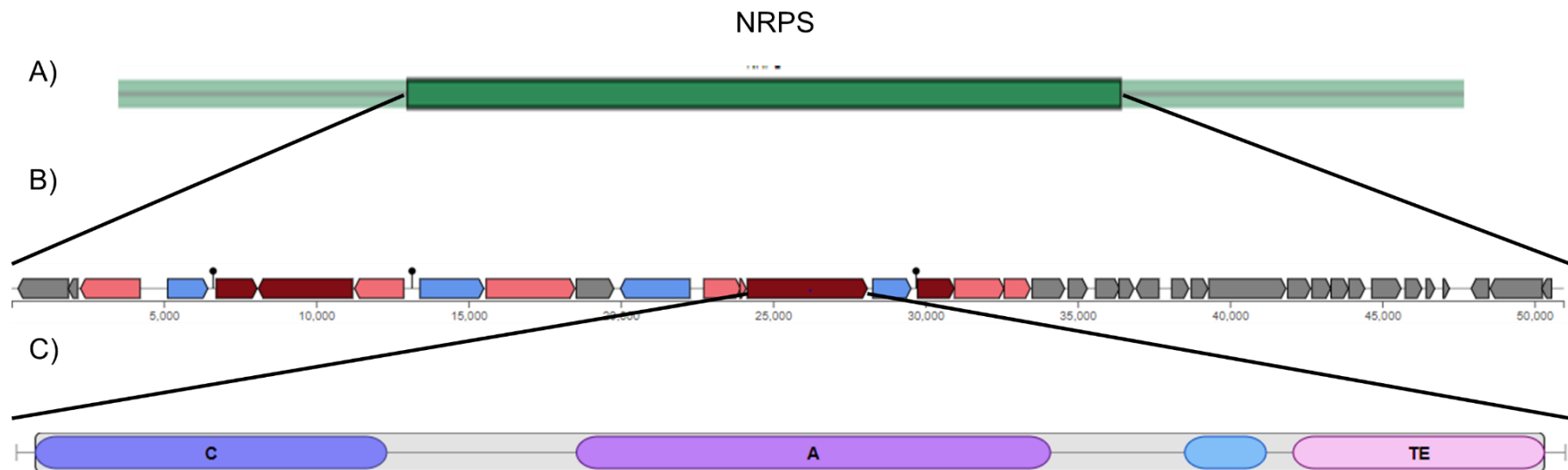


Figura 6. Grupo biosintético de la estructura del gen *swrW* (serrawettina W1) Organización genética del genoma de la cepa *Serratia ureilytica* UTS por el análisis AntiSMASH. A) Grupos de genes biosintéticos con la identificación del core del gen *swrW*: dominio de condensación, dominio de acetilación, dominio de thiolación, dominio de thioesterasa. B) organización del gen. C) proteína biosintética con los dominios de condensación, acetilación, thiolación y thioesterasa.

Se utilizaron 28 secuencias con regiones NRPS que codifican para una serrawettina (Marques-Pereira, 2022), para la confirmación de posibles serrawettina se realizó una comparación de genes mediante la herramienta de Blast alineamiento global con las secuencias antes mencionadas y los contig 19 y 23 (Tabla 5 y 6), así mismo, se realizó un árbol filogenético por el método de Neighbor Joining (Figura 7).

Tabla 5. Análisis blast global con la secuencia NRPS del contig 19 del genoma de *S. ureilytica* UTS con 11 secuencias de biosíntesis del Biosurfactante.

Contig 19 alineamiento con 11 secuencias de serrawettina W2 (srwA)		
Numero de accesión	Clúster del gen	Porcentaje de similitud
BAO35825.1	<i>Serratia marcescens</i> SM39 DNA genoma completo	28%
ALE98111.1	Cepa <i>Serratia marcescens</i> SmUNAM836, genoma complete	28%
AUY16873.1	Cromosoma <i>Serratia</i> sp. SSNOH1 cromosome genoma completo	28%
SAY45247.1	Aislado de <i>Serratia marcescens</i> PWN146_ensamblaje del genoma, cromosoma	28%
KKO55915.1	<i>Serratia marcescens</i> strain UMH7, genoma completo	30%
ALD45109.1	<i>Serratia marcescens</i> strain RSC-14, genoma completo	30%
ETX44761.1	<i>Serratia marcescens</i> strain 1274 genoma	34%
AOF02338.1	<i>Serratia</i> sp. YD25, genoma completo	19%
AIM23801.1	<i>Serratia</i> sp. SCBI, genoma completo	19%
KMU50701.1	Cromosoma <i>Serratia marcescens</i> strain BWH-23, genoma completo	19%
CDG14244.1	<i>Serratia marcescens</i> sub sp. Marcescens Db11, genoma completo	19%

Tabla 6. Análisis blast global con la secuencia NRPS del contig 19 del genoma de *S. ureilytica* UTS con 11 secuencias de biosíntesis del biosurfactante.

Contig 23 alineamiento con 17 secuencias de serrawettina W1 (srwW)		
Numero de accesión	Clúster del gen	Porcentaje de similitud
ERH70695.1	Péptido sintetasa no ribosómica	32%
AGE20181.1	Sintetasa serrawettin W1	32%
AIA46701.1	Sintetasa putativa serrawettin W1	31%
EMF04443.1	Proteína de adenilación de aminoácidos	31%
KFF87803.1	Péptido sintetasa no ribosómica	32%
BAO21138.1	Sintetasa putativa serrawettin W1	32%
ASM18665.1	Péptido sintetasa no ribosómica	32%
KFD14984.1	Proteína que contiene dominio de adenilación de aminoácidos	31%
KFL05097.1	Péptido sintetasa no ribosómica	32%
EZQ62923.1	Péptido sintetasa no ribosómica	31%
KLE36484.1	Péptido sintetasa no ribosómica	31%
WP_063202307.1	Péptido sintetasa no ribosómica	31%
AEG30284.1	Péptido sintetasa no ribosómica	31%
AEF47625.1	Péptido sintetasa no ribosómica	31%
WP_013814722.1	Péptido sintetasa no ribosómica	31%
SMZ58711.1	Proteína que contiene dominio de adenilación de aminoácidos	32%
KFB89923.1	Péptido sintetasa no ribosómica	32%

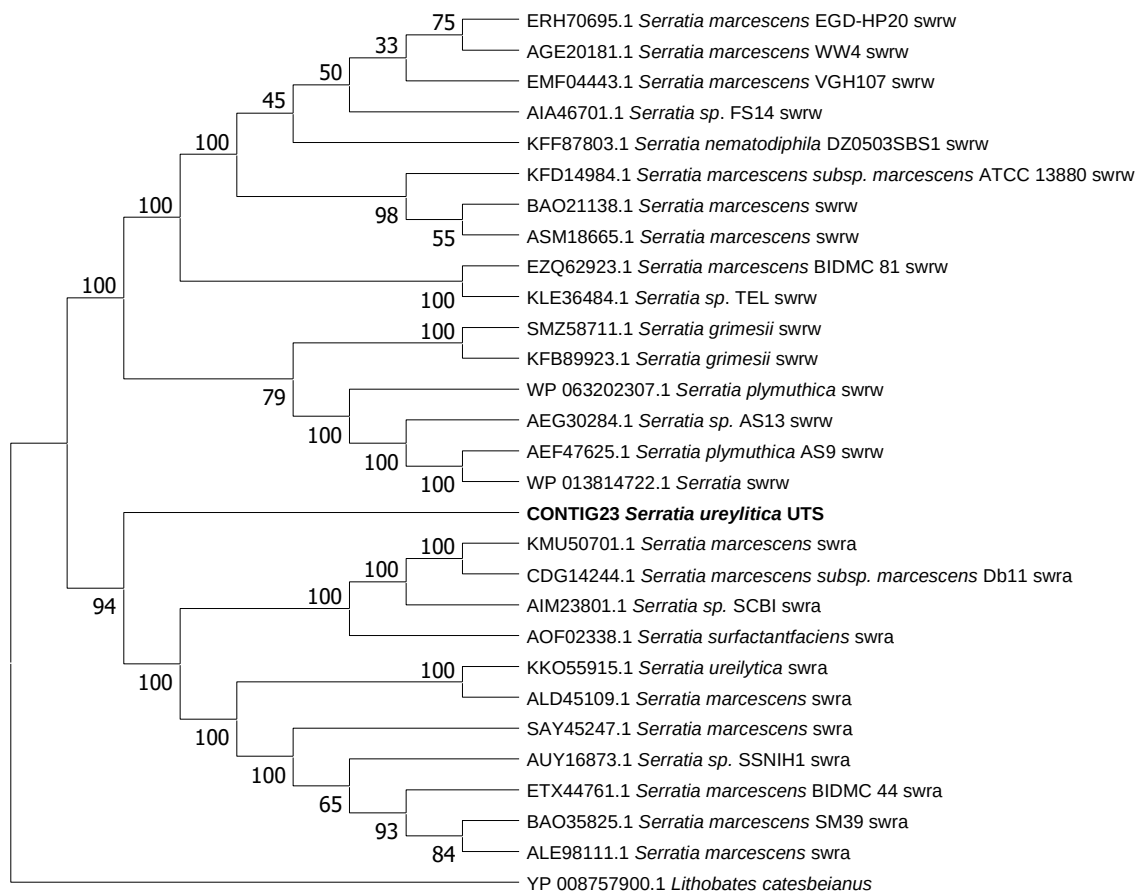


Figura 7. Árbol filogenético de genes de serrawetina, se puede observar que el contig 23 de *S. ureilytica* UTS en negritas, se separa de los dos grupos de serrawettina, indicando que puede ser otro biosurfactante.

8.2. Agar azul de metileno

En esta prueba *in vitro* no hubo presencia de un halo blanquecino transparente que da como resultado de un complejo entre las cargas aniónicas del biosurfactantes y catiónicas del CTAB/Calcio, esto indicaba que podría deberse al tipo de biosurfactante, ya que los únicos que presentan este tipo de interacciones son los glucolípidos como los ramnolípidos (Figura 8).



Figura 8. Caja de Petri de agar azul de metileno con la cepa *S. ureilytica* UTS, mostrando resultado negativo.

8.3. Evaluación del biosurfactante

La producción de biosurfactante en cualquier microorganismo puede ser detecta por pruebas tensioactivas como la tensión superficial, vencimiento de la gota, dispersión de aceite, índice de emulsificación, entre otras como se puede observar en la siguiente Tabla 7.

Tabla 7. Pruebas tensioactivas aplicadas al extracto crudo del biosurfactante

Cepa	Tensión superficial	Índice de emulsificación 24h	Colapso de gota	Dispersión de aceite
<i>Serratia ureilytica</i> UTS	48 ± 4 mN/m	40.71 ± 0.34 %	Positivo	53.05 ± 4.6 mm
Media ± del porcentaje del bioensayo				

8.4. Tensión superficial

La técnica mide la energía externa aplicada sobre un líquido con la cual se rompe la tensión superficial de dicho liquido expresándose la resistencia en mN/m, diferentes reportes indican que un buen biosurfactante es capaz de bajar la tensión superficial hasta 35 mN/m para el caso de la cepa *S. ureilytica* UTS el extractó crudo del biosurfactante pudo disminuir la tensión superficial de 67 ± 1.7 mN/m del agua que se utilizó como control a 48 ± 4 mN/m.

8.5. Indicé de emulsificación

Este tipo de pruebas permite identificar la producción de algún biosurfactante por alguna bacteria, debido a la emulsión entre el aceite o hidrocarburo con el sobrenadante libre de células, ya que una mayor capa de emulsificación formada indicará una producción mayor producción del biosurfactante, para la cepa *S. ureilytica* UTS se observó una emulsificación (IE24) con aceite de soya de $40.71 \pm 0.34 \%$ a las 24 h, como se observa en la Figura 9.

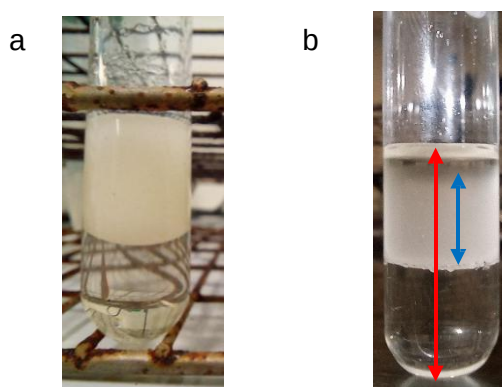


Figura 9. Emulsificación del biosurfactante con base hidrofóbica, a) emulsificación a las 0 h, b) emulsificación a las 24. La flecha roja indica la altura total de la mezcla, mientras que la flecha azul indica la emulsificación.

8.6. Colapso de gota

Es uno de los métodos rápidos y fáciles para comprobar la presencia de biosurfactante presentes en el medio de cultivo, haciendo uso del sobrenadante libre de células con una base hidrofóbica (aceite mineral, aceite de soya, aceite de motor, entre otros), manteniendo un control negativo como es el agua, el sobrenadante de la cepa *S. ureilytica* UTS mostró un colapso positivo respecto al control negativo, indicando la presencia de biosurfactante como se observa en la siguiente Figura 10.

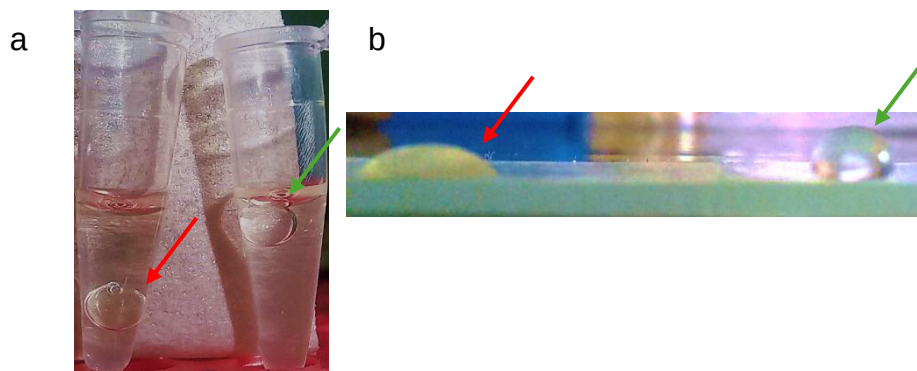


Figura 10. Colapso de gota. a) se utilizó un microtubo eppendorf de 200 μ L, se añadió una base hidrofóbica y se añadió 10 μ L del sobrenadante libre de células, b) se utilizó un gota de agua y se le añadió 5 μ L del sobrenadante libre de células, la flecha verde indica la gota de agua, la flecha roja indica la actividad del biosurfactante.

8.7. Dispersión de aceite

Esta prueba mide indirectamente la actividad superficial donde un mayor diámetro de limpieza del aceite indica un a mayor actividad, para el biosurfactante de la cepa *S. ureilytica* UTS tuvo un diámetro de 53.05 ± 4.6 mm de desplazamiento del aceite quemado de motor como se puede observar en la Figura 11.

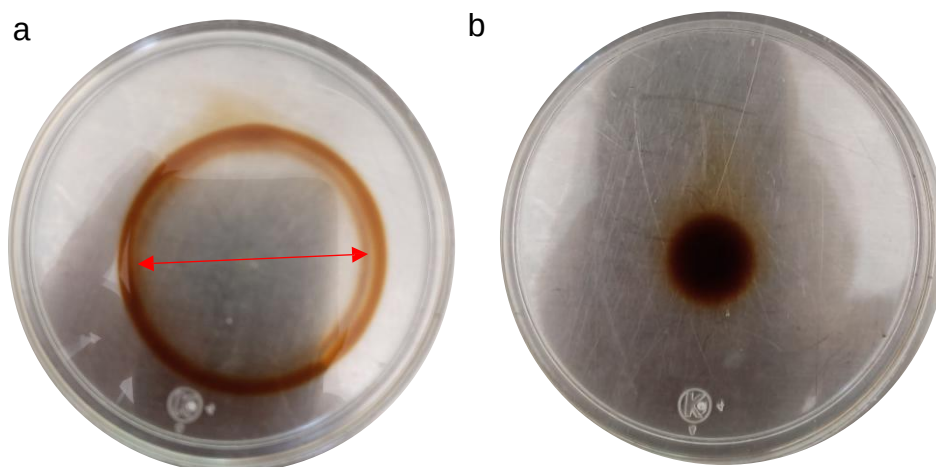


Figura 11. Dispersión de aceite. a) efecto de dispersión por la presencia de un biosurfactante, b) base hidrofóbica antes de la presencia del biosurfactante, la flecha roja representa el diámetro del halo.

8.8. Actividad nematocida

Los resultados obtenidos de la evaluación *in vitro* del biosurfactante a las concentraciones de 10, 20 y 30 mg/mL, un control negativo (agua) y un control positivo (Nematrol), contra *N. aberrans* J2 fue de una p-Value de $<2e-16$ en el análisis de varianza (ANOVA) indicando que hay una diferencia significativa entre los grupos para el cual se aplicó una prueba de Tukey con una confiabilidad del 0.05 para comprobar si hay diferencias significativas entre las medias de los tratamientos para lo cual arrojó tres grupos donde el mejor tratamiento fue el grupo testigo positivo (Nematrol) con un porcentaje de mortalidad de $92 \pm 4.28 \%$, el segundo grupo fueron los tratamientos con el biosurfactante con un porcentaje de $90.6 \pm 5.76\%$ (10 mg/mL), 87.0 ± 3.65 (20 mg/mL) y 92.3 ± 4.28 (30 mg/mL) este último tratamiento estadísticamente es similar al grupo testigo positivo (Nematrol), así mismo se pudo observar que entre los tratamientos del biosurfactante 10, 20 y 30 mg/mL no hubo diferencia significativa, por último el tercer grupo fue el tratamiento del agua obteniendo $2.90 \pm 0.79\%$ estos resultados se pueden observar en la Tabla 8 y Figura 12, también se observan los efectos causados por los tratamientos en los nematodos Figura 13.

Tabla 8. Porcentaje de mortalidad de la actividad nematocida del biosurfactante crudo.

Tratamiento	Concentración mg/mL	%mortalidad
Biosurfactante	10	90.6 ± 5.76^b
Biosurfactante	20	87.0 ± 3.65^b
Biosurfactante	30	92.3 ± 4.28^{ab}
Agua	-	2.90 ± 0.79^c
Nematrol	6	96.0 ± 2.58^a

Media $\pm$ del porcentaje de mortalidad, $p \leq 0.001$, test Tukey 0.05 de confiabilidad, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

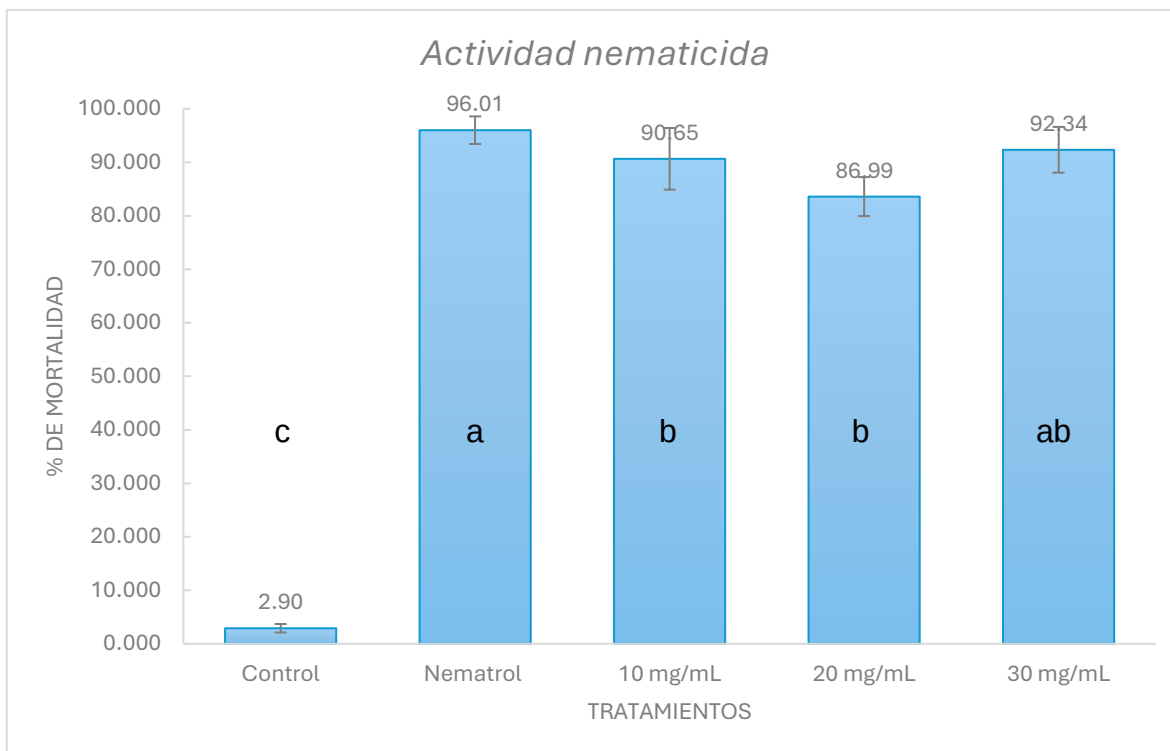


Figura 12. Actividad nematocida del biosurfactante producido por la cepa *Serratia ureilytica* UTS contra *Nacobbus aberrans* J², se muestra la media $\pm$ de la desviación estándar del porcentaje de mortalidad, $p \leq 0.001$, test Tukey 0.05 de confiabilidad, las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

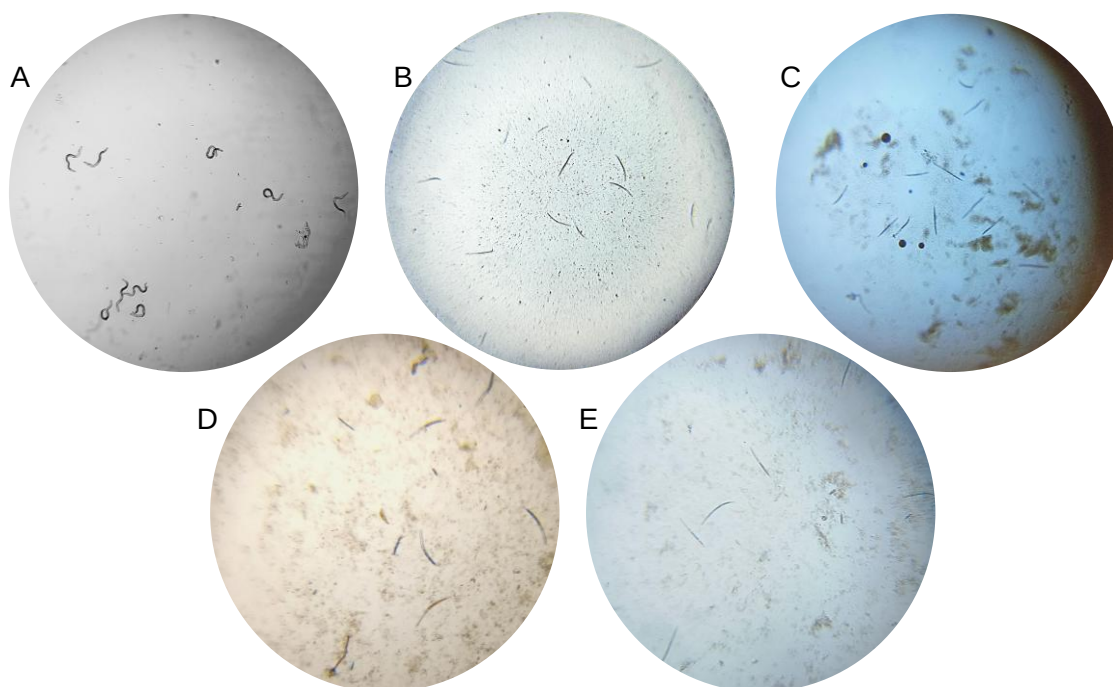


Figura 13. Vista microscópica (4X) de la actividad nematocida; A) Control, B) Nematrol, C) 10mg/mL, D) 20mg/mL, E) 30 mg/mL

8.9. Actividad antifúngica

Los resultados *in vitro* del biosurfactante contra hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Fusarium sp* fueron evaluados a cinco diferentes concentraciones (0.02, 0.04, 0.1, 0.5 y 1 %) del biosurfactante crudo. Para los resultados de la evaluación de las tres cepas se realizó un ANOVA y un prueba a posteriori Tukey con una confiabilidad de 0.05, en la Tabla 9 se puede observar que el biosurfactante alcanzo el menor rango de inhibición de 33.5 ± 6.97 y 45.6 ± 3.76 % respectivamente a concentración de 0.02% y el mayor rango de inhibición fue de 72.2 ± 1.03 y 80.2 ± 2.62 respectivamente, a una concentración de 1%. En el análisis ANOVA se obtuvo una p de 0.0202* para *Fusarium oxysporum* por lo que se realizó la prueba de Tukey con una confiabilidad de 0.05, dando como resultados dos grupos donde las concentraciones 0.1, 0.5 y 1 % no tuvieron diferencia significativa, pero 0.1 y 0.5% no eran diferentes al resto del de los tratamientos. Mientras que *Fusarium sp* se obtuvo una p de 0.00446** indicando que había una diferencia de medias para esto se aplicó la prueba de Tukey mostrando que los tratamientos 1 y 0.5% pertenecían al mismo grupo, sin embargo, el tratamiento 0.5% no había diferencia significativa con el resto de los tratamientos a menor concentración. La cepa de *Alternaria solani* tuvo el menor rango de inhibición de $49.4 \pm 5.06\%$ una concentración de 0.02% y el mayor rango de inhibición del 100% a una concentración de 1%, el análisis ANOVA arrojó una p de $5.6e-10^{***}$ indicando que había una alta diferencia significativa para esto la prueba de Tukey mostro la presencia de tres grupos donde el mejor tratamiento era al 1%, seguido de 0.5% y por ultimo las tres concentraciones. En el análisis de inhibición del crecimiento micelial se logró observar que mientras la concentración del biosurfactante sea mayor, habrá menor crecimiento micelial, es decir, habrá una mayor inhibición del crecimiento micelial como se observa en las Figuras 14 y 15.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento micelar de la actividad antifúngica del biosurfactante.

Concentración (%)	Inhibición del crecimiento micelar (%)		
	<i>Fusarium oxysporum</i> *	<i>Fusarium sp</i> **	<i>Alternaria solani</i> ***
0.02	33.5 ± 6.97 ^b	45.6 ± 3.76 ^b	49.4 ± 5.06 ^c
0.04	36.8 ± 6.64 ^b	46.9 ± 3.81 ^b	52.8 ± 4.92 ^c
0.1	44.3 ± 4.43 ^{ab}	52.3 ± 3.45 ^b	55.9 ± 3.74 ^c
0.5	47.1 ± 0.30 ^{ab}	61.2 ± 4.34 ^{ab}	81.9 ± 1.09 ^b
1	72.2 ± 1.03 ^a	80.2 ± 2.62 ^a	100.0 ± 0 ^a

Medias ± del porcentaje de inhibición micelial, las medias que no comparten letras son significativamente diferentes determinada por el test de Tukey ($\alpha = 0.05$), * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

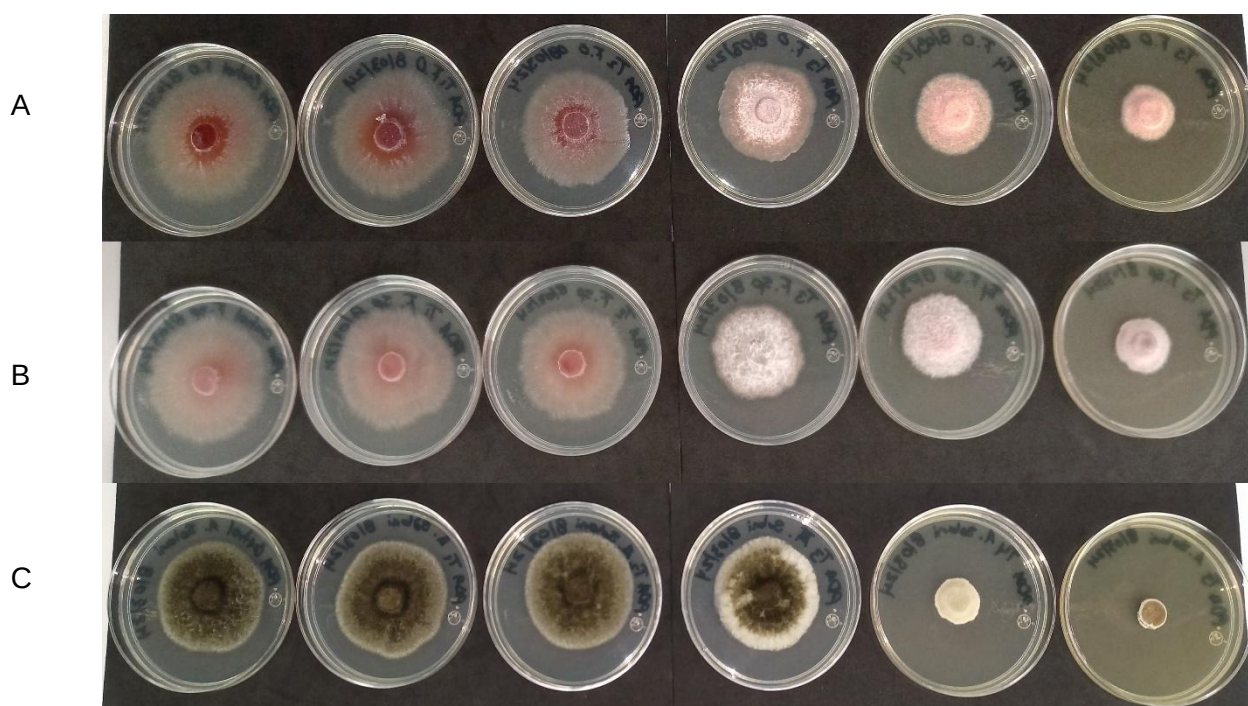


Figura 14. Vista macroscópica de la inhibición del crecimiento micelar por un biosurfactante. Todos los tratamientos están de menor a mayor concentración en dirección de izquierda a derecha, iniciando con el control, a) *Fusarium oxysporum*, *Fusarium sp* y *Alternaria solani*.

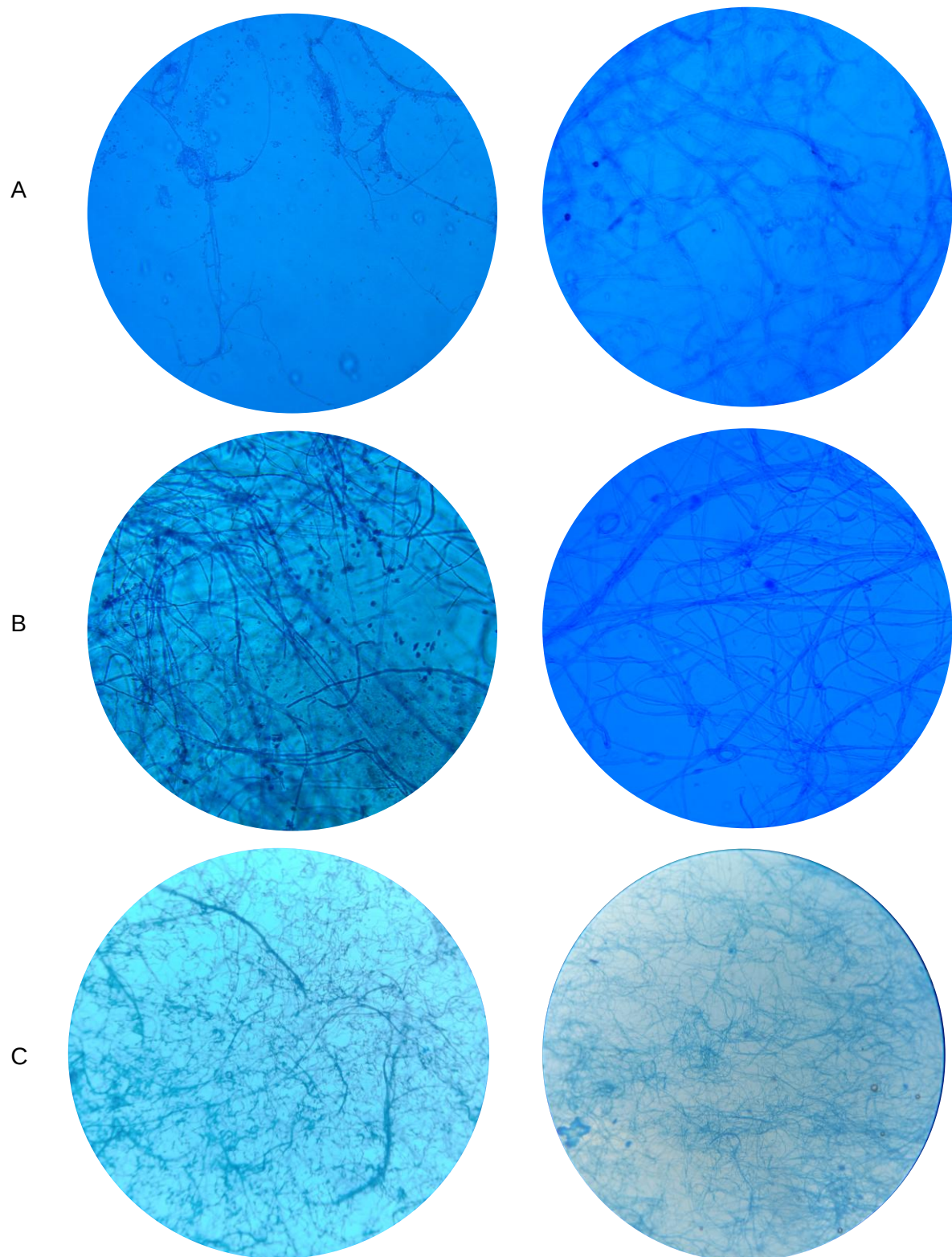


Figura 15. Vista microscopia 40x de la actividad antifúngica de un biosurfactante. Las imágenes del lado izquierdo corresponden al control, mientras que las imágenes del lado derecho corresponden al porcentaje más alto, sin embargo *A. solani*, solo llega al T4. A), *Fusarium oxysporum*, b) *Fusarium sp* y c) *Alternaria solani*.

8.10. Identificación por GC-MS

El extracto crudo producido por la cepa *S. ureilytica* UTS, analizado por GC-MS, se detectaron tres señales a los 11.29, 17.05 y 17.69 minutos RT, que corresponden a los metabolitos Alanina, N-acetil-3-fenil-N-(trifluoroacetilo) éster metílico, DL- Homocistina y L-Valina, N- [2 (cloroimino)-3-metil-1-oxobutil]-, respectivamente. También se detectaron señales a los 15.17, 16.36 y 18.93 minutos RT, que corresponden a los metabolitos ácido 4,7-octadecadiinoico (ácido esteárico), ácido dodecanoico (ácido láurico) y ácido hexadecanoico (ácido palmítico), respectivamente, que son ácidos grasas.

9. Discusión de resultados

Con base en el análisis bioinformático con el programa AntiSMASH, se obtuvieron dos regiones que posiblemente podrían estar involucradas para la producción de un biosurfactante. La búsqueda de genes se realizó con lo reportado para el género de *Serratia*, como menciona Clements (2019) existen dos tipos de biosurfactantes producidos por este género, como los lipopéptido dentro de este grupo existen dos familias; serrawettina y sephensiolide, también están presentes los glucolípidos de igual manera existen dos familias presentes; ramnolípidos y rubiwettin, es por eso que se analizaron principalmente 28 secuencias ya reportadas para la biosíntesis de serrawettina W1 y W2 (17 y 11 respectivamente) (Marques-Pereira *et al.*, 2022). En el alineamiento global con el contig 19 y 23 con las 28 secuencias ya reportadas para los genes *swrW* (W1) y *swrA* (W2) a nivel de proteína obteniendo hasta un 33% de homología con el gen *swrW*, esto se llevó a cabo debido a que, a nivel de arquitectura, los módulos presentes en el programa muestran una similitud. Además, se realizó un árbol filogenético para evaluar si existía algún parentesco con las secuencias previamente identificadas. Sin embargo, se observó que el contig 23 se separaba de los dos grupos de serrawettina, lo que sugiere que podría tratarse de otro tipo de biosurfactante.

Para lo cual se realizó la producción del biosurfactante, así como su extracción, con la finalidad de realizar pruebas tensioactivas y observar la actividad del extracto, todas las pruebas que se realizaron fueron positivas, indicando la presencia de un biosurfactante producido por la cepa *S. ureilytica* UTS. También se realizó la prueba agar azul de metileno para identificar la presencia de ramnolípidos, sin embargo, fue negativa, indicando que podría ser algún otro tipo de biosurfactante.

Las pruebas para la actividad biológica presento una actividad contra *N. aberrans* (J²) con diferentes concentraciones del extracto crudo. En la concentración 30 mg/mL se obtuvo 92.3 ± 4.28 por ciento de mortalidad que es mayor en comparación con el 39.29 ± 18.36 por ciento de mortalidad que se obtuvo cuando se evaluó el biosurfactante por las del género de *Bacillus* (Gómez-Gutiérrez *et al.*, 2023), existen reportes de

lipopéptido que muestras una actividad nematocida, contra *Caenorhabditis elegans*, donde evaluaron la mortalidad de dos cepas de *Bacillus paralicheniformis* y *Bacillus subtilis* obteniendo 100 y 63 por ciento de mortalidad respectivamente (Chavarria-Quicaño *et al.*, 2023), además, el nematodo *Meloidogyne incógnita* que fue evaluado con el cultivo filtrado de la cepa *Bacillus subtilis* HussainT.AMU donde alcanzó un máximo porcentaje de mortalidad del 95.90 % a las 72 h contra J₂ a una concentración del 100% del cultivo filtrado, así mismo, una mínima de 73.01% de mortalidad al 50% del cultivo filtrado, indicando que el lipopéptido producido por la cepa tiene un efecto nematocida. Es importante destacar que este estudio se observaron porcentajes similares a los reportados, incluso a concentraciones menores o equivalentes. Aunque los modelos biológicos utilizados son diferentes, cabe resaltar que el biosurfactante producido por la cepa *S. ureilytica* UTS tiene un efecto similar a los nematocidas comerciales.

Por otra parte, el uso de biosurfactante a cinco diferentes concentraciones contra hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Fusarium sp* tuvo un resultado prometedor con porcentajes máximos de inhibición micelial del 72.2 ± 1.03 , 100.0 ± 0 y 80.2 ± 2.62 respetivamente, a la máxima concentración del extracto crudo que fue del 1% del biosurfactante, donde se presentaba una cambio de color a la orilla del diámetro del crecimiento micelial, además que el hongo tenía un crecimiento vertical y no radial observándose a una vista macroscópica. Por otra parte, se realizaron tinciones de azul de lactofenol para observar cambios en las hifas, se observó una reducción de esporas en comparación con el control (sin biosurfactante). Además, se lograron ver cambios en las hifas, que aparecían más delgadas y con algunas deformidades. Por otra parte, *Bacillus subtilis* V26 mostró una actividad contra *Botrytis cinérea* del 100% de inhibición del crecimiento micelial a 2 mg/mL del biosurfactante extraído, así como la deformación de las hifas (Ben Khedher *et al.*, 2020). De igual manera, Mnif *et al.*, (2016) reportó que la purificación de biosurfactante lipopéptido producido por *Bacillus subtilis* SPB1 tenía actividad antifúngica contra *Rhizoctonia bataticola* y *R. solani*, obteniendo porcentajes de inhibición del crecimiento micelial del 100% a concentraciones del 0.04 mg/mL y del 100% de inhibición a una concentración de 4 mg/mL respectivamente. De igual forma se pudo observar daños a las hifas del

hongo, además las cepas *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 tuvo una actividad contra *Fusarium oxysporum* y *Fusarium moniliforme* del 82% de inhibición a 2000 ppm mientras que *Bacillus subtilis* NH-100 tuvo una inhibió del 85% con las mismas cepas, y también mostró actividad contra *Fusarium solani* y *Trichoderma atroviride* del 83% de inhibición (Sarwar *et al.*, 2018). Estos resultados son equiparables a los obtenidos en este estudio. Aunque algunas cepas de hongos pertenecen a géneros diferentes, la actividad fungicida está presente, lo que sugiere que este biosurfactante podría ser una alternativa viable para el control biológico.

Los resultados del análisis de cromatografía de gases acoplada a masas (GC/MS) se observó la presencia de aminoácidos y ácidos grasos lo que indica que el biosurfactante producido por *S. ureilytica* UTS podría tratarse de un lipopéptido, lo cual concuerda con lo reportado para el género de *Serratia* (Clements *et al.*, 2019) así mismo, los biosurfactantes considerados lipopéptidos como la surfactina, fengicina, putisolvin y serrawetina, presentan en uno de sus extremos aminoácidos (hidrofílico), mientras que en el otro extremo ácidos grasos (hidrofóbico) (Banat *et al.*, 2014) esto es característicos del biosurfactante de origen lipopéptido.

10. Conclusión

Con base a los resultados bioinformáticos y análisis filogenéticos, se puede sugerir que el biosurfactante producido por la cepa *Serratia ureilytica* UTS probablemente es diferente al biosurfactante serrawettina W1 y W2, ya que serrawettina ha sido reportado en *Serratia marcescens*. Además, este biosurfactante mostró actividad nematicida contra el nematodo falso agallador (*Nacobbus aberrans* J₂), así como actividad antifúngica contra tres hongos fitopatógenos. Estos resultados sugieren que podría ser una alternativa prometedora para el control biológico de enfermedades como el tizón temprano, la fusariosis y la plaga del nematodo falso agallador.

11. Perspectivas

Obtener la estructura química del biosurfactante por métodos de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN), espectrometría de masas (EM).

Evaluar el biosurfactante crudo en invernadero para observar el efecto de protección, nematicida y fungicida en cultivos de interés económico.

Evaluar cada una de las fracciones que se obtengan del extracto crudo del biosurfactante para obtener la fracción con la actividad antagónica.

12. Bibliografía

- Acuña, I., Sandoval, C., & Sepúlveda, C. (2021). *Enfermedades de la papa*. . Obtenido de plataforma de evaluación de riesgo sanitario. INIA, Chile: <http://enfermedadespapa.inia.cl>.
- Aguilar-Gamboa, F. R., & Suclupe-Campos, D. O. (2023). Aspectos microbiológicos de la colonización/infección respiratoria causada por *Serratia marcescens*: a propósito de un caso: Microbiological aspects of colonization/respiratory infection caused by *Serratia marcescens*: about a case. *Revista Experiencia en Medicina del Hospital Regional Lambayeque*, 9(3), 101-105.
- Ajayi-Oyetunde, O. O., & Bradley, C. A. (2018). *Rhizoctonia solani*: taxonomy, population biology and management of *Rhizoctonia* seedling disease of soybean. *Plant Pathol*, 67(1):3-17.
- Alonso Fernández, R. (2002). Metodos fenotípicos y genotípicos de análisis intraespecífico en" *Serratia marcescens*". *Universidad Complutense de Madrid, Servicio de Publicaciones*.
- Álvarez-López, C., Osorio-Vega, W., Díez-Gómez, M. C., & Marín-Montoya, M. (2014). Caracterización bioquímica de microorganismos rizosféricos de plantas de vainilla con potencial como biofertilizantes. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 226-241.
- Aparna, A., Srinikethan, G., & Smitha, H. (2012). Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 95, 23-29.
- Banat, I. M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M. G., Fracchia, L., & ... Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied microbiology and biotechnology*, 87, 427-444.
- Banat, I. M., Makkar, R. S., & Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. . *Applied microbiology and biotechnology*, 53, 495-508.
- Banat, I., De Rienzo, M., & Quinn, G. (2014). Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98, 9915–9929. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6169-6>.

- Barrionuevo, M. R. (2017). Producción de biosurfactantes bacterianos para su uso en procesos de biotratamiento de efluentes industriales con contenido en metales . (*Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*).
- Ben Khedher, S., Boukedi, H., Laarif, A., & Tounsi, S. (2020). Biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* V26: A potential biological control approach for sustainable agriculture development. *Organic Agriculture*, 10, 117-124.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic acids research*, 41(D1), D36-D42.
- Borah, D., Chaubey, A., Sonowal, A., Gogoi, B., & Kumar, R. (2021). Microbial biosurfactants and their potential applications: an overview. *Microbial Biosurfactants: Preparation, Properties and Applications*, 91-116.
- Bordoloi, N. K., & Konwar, B. K. (2008). Microbial surfactant-enhanced mineral oil recovery under laboratory conditions. . *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 63(1), 73-82.
- Bridge, J., & Starr, J. L. (2007). *Plant nematodes of agricultural importance: a color handbook*. Elsevier.
- Caccia, M., Lax, P., & Doucet, M. E. (2013). Effect of entomopathogenic nematodes on the plant-parasitic nematode *Nacobbus aberrans*. *Biology and fertility of soils*, 49, 105-109.
- Cameotra, S. S., & Makkar, R. S. (1998). Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. *Applied microbiology and Biotechnology*, 50, 520-529.
- Cano-González, S. B., Romero-Vázquez, A., & Santamaría-Muñoz, R. (2004). Factores de riesgo asociados a sepsis por *Serratia marcescens* en una unidad de cuidados intensivos neonatales. *Salud en Tabasco*, 10(2), 214-220.
- Casas-Moreno, A. (2010). Identificación molecular de una especie de *Serratia* aislada de *Mussa paradisiaca*. *Universidad Veracruzana, Facultad de biología* .
- Castañeda-Ramírez, J., Laurel-Ángeles, V., Espinoza-Zamora, J., Salcedo-

- Hernández, R., LópezRamírez, M., & De la Fuente-Salcido, N. (2016). Efecto del quitosano para el biocontrol de hongos fitopatogenos identificados molecularmente de frutas y hortalizas en guanajuato. *Investigacion y Desarrollo en Ciencia y Tecnología en Alimentos*, 1(2), 207-213.
- Chan, X. Y., Chang, C. Y., Hong, K. W., Tee, K. K., Yin, W. F., & Chan, K. G. (2013). Insights of biosurfactant producing *Serratia marcescens* strain W2. 3 isolated from diseased tilapia fish: a draft genome analysis. *Gut Pathogens*, 5, 1-5.
- Chaprão, M. J., Ferreira, I. N., Correa, P. F., Rufino, R. D., Luna, J. M., Silva, E. J., & Sarubbo, L. A. (2015). Application of bacterial and yeast biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of motor oil from contaminated sand . *Electronic Journal of Biotechnhnology*, 471-479.
- Chavarria-Quicaño, E., De la Torre-González, F., González-Riojas, M., Rodríguez-González, J., & Asaff-Torres, A. (2023). Nematicidal lipopeptides from *Bacillus paralicheniformis* and *Bacillus subtilis*: a comparative study. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107(5), 1537-1549.
- Chen, S. Y., Wei, Y. H., & Chang, J. S. (2007). Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. . *Applied microbiology and biotechnology*, 76, 67-74.
- Clements, T., Ndlovu, T., Khan, S., & Khan, W. (2019). Biosurfactants produced by *Serratia* species: Classification, biosynthesis, production and application. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 589-602. doi: 10.1007/s00253-018-9520-5.
- Cooper, D. G., & Goldenberg, B. G. (1987). Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and environmental microbiology*, 53(2), 224-229.
- Cortez Hernández, M. Á. (2019). Control biológico de *Nacobbus aberrans* mediante hongos antagonistas (Master's thesis). *Colegio de posgraduados*.
- Costilla, M. A. (1985). El falso nematodo del nudo *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944 y su relación con el cultivo de papa en el noreste argentino. . *Revista Industrial y Agrícola de Tucumán.*, 62, 79-97.
- Dang, N. P., Landfald, B., & Willassen, N. P. (2016). Biological surface-active compounds from marine bacteria. *Environmental Technology*, 37(9), 1151-

1158.

- Das, P., Mukherjee, S., & Sen, R. (2008). Genetic regulations of the biosynthesis of microbial surfactants: an overview. *Biotechnol Genet Eng*, 25(1):165–186.
- De Bruijn, I., & Raaijmakers, J. M. (2009). Diversity and functional analysis of LuxR-type transcriptional regulators of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Applied and environmental microbiology*, 75(14), 4753-4761.
- Desai, J. D., & Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiology and Molecular biology reviews*, 61(1), 47-64.
- DGSV-CNRF. (2020). Podredumbre de raíces por *Fusarium* spp (Hypocreales: Nectriaceae) en maíz. *Sader-Senasica. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Ficha técnica. Tecámac, Estado de México*, 15.
- Domsch, K. H., Gams, W., & Anderson, T. H. (2007). Compendium of Soil Fungi. *IHW Verlag. Eching.*, pp 201- 233. en Pérez-Reyes, M. C., Sánchez-Hernández, G., Martínez-Flores, R., Garza-Rivera, J. L., & Espinosa-Rodríguez, J. (17 de 05 de 2024). Mohos productores de micotoxinas. Obtenido de *Fusarium*: https://masam.cuautitlan.unam.mx/mohos_toxigenos_unig.
- EPPO. (17 de 05 de 2024 a). *Fusarium oxysporum*. Obtenido de <https://gd.eppo.int/taxon/FUSAOX>
- EPPO. (2024 b). *Alternaria solani*. obtenido de: <https://gd.eppo.int/taxon/ALTESO>.
- Espinoza, L. E. (2022). ESPINOZA, L. E. R. Genómica estructural para el análisis de péptido sintetasas no ribosomales en *Xenorhabdus nematophila* SC0516, una bacteria de nemátodos entomopatógenos. *Área de conocimiento: Ciencias Agropecuarias y Biotecnología; Campo disciplinar: Ciencias Agrarias*.
- Eves-van den Akker, S., Lilley, C. J., Danchin, E. G., Rancurel, C., Cock, P. J., Urwin, P. E., & Jones, J. T. (2014). The transcriptome of *Nacobbus aberrans* reveals insights into the evolution of sedentary endoparasitism in plant-parasitic

- nematodes. *Genome Biology and Evolution.*, 6(9), 2181-2194.
- Ferrer, A. (2003). Intoxicación por plaguicidas. In *Anales del sistema sanitario de Navarra*, Vol. 26, pp. 155-171. Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- Finlay, R., Neupane, S., Alström, S., Goodwin, L., Kyrpides, N. C., Lucas, S., & ... Högberg, N. (2012). Complete genome sequence of *Serratia plymuthica* strain AS12. *Standards in Genomic Sciences*, 6(2).
- Fooladi, T., Moazami, N., Abdeslahian, P., Kadier, A., Ghojavand, H., Yusoff, W. M., & Hamid, A. A. (2016). Characterization, production and optimization of lipopeptide biosurfactant by new strain *Bacillus pumilus* 2IR isolated from an Iranian oil field. *Journal of Petroleum and Engineering* , 145, 510-519.
- García-Reyes, S., & Yáñez-Ocampo, G. (2016). Microbial biosurfactants: methods for their isolation and characterization. *The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 6(1), 641.
- García-Reyes, S., Yáñez-Ocampo, G., Wong-Villarreal, A., Rajaretinam, R. K., Thavasimuthu, C., Patiño, R., & Ortiz-Hernández, M. L. (2018). Partial characterization of a biosurfactant extracted from *Pseudomonas* sp. B0406 that enhances the solubility of pesticides. *Environmental tecnhnology*, 39(20), 2622-2631.
- Gautam, K. K., & Tyagi, V. K. (2006). A review of microbial surfactant. *Journal of Oleo Science*, 55(4), 155-166.
- Ghosh, S., Ghosh, A., Riyajuddin, S., Sarkar, S., Chowdhury, A. H., Ghosh, K., & Islam, S. M. (2020). Silver nanoparticles architected HMP as a recyclable catalyst for tetramic acid and propiolic acid synthesis through CO₂ capture at atmospheric pressure. *ChemCatChem*, 12(4), 1522-1554.
- Gómez-Gutiérrez, J. A., Wong-Villarreal, A., Aguilar-Marcelino, L., Yáñez-Ocampo, G., Hernández-Nuñez, E., Caspeta-Mandujano, J. M., . . . Gomez-Rodríguez, O. (2023). In vitro nematocidal and acaricidal effect of biosurfactants produced by *Bacillus* against the root-knot nematode *Nacobbus aberrans* and the dust mite *Tyrophagus putrescentiae*. *Brazilian Journal of Mircobiology*, 1-10.
- González-Maldonado, M. B., Gurrola-Reyes, J. N., & Chaírez-Hernández, I. (2015). Productos biológicos para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:

- Noctuidae). . *Revista colombiana de Entomología*, 41(2), 200-204.
- Gunther IV, N. W., Nunez, A., Fett, W., & Solaiman, D. K. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Applied and environmental microbiology*, 71(5), 2288-2293.
- Herbario Virtual*. (2024). Obtenido de Cátedra de Fitopatología. Facultad de Agronomía de la Universidad de Buenos Aires: <https://herbariofitopatologia.agro.uba.ar>
- Hernández-Trejo, A., Estrada Drouaillet, B., Rodríguez-Herrera, R., García Giron, J. M., Patiño-Arellano, S. A., & Osorio-Hernández, E. (2019.). Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays* L.). *Revista mexicana de ciencias agrícolas.*, 10(4), 803-813.
- Hewald S, J. K. (2005). Genetic analysis of biosurfactant production in *Ustilago maydis*. *Appl Environ Microbiol*, 71(6):3033–3040.
- Jain, D. K., Collins-Thompson, D. L., Lee, H., & Trevors, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant-producing microorganisms. *Journal of Microbiological Methods*, 13(4), 271-279.
- Jangir, P., Mehra, N. S., & al., e. (2021). Secreted in xylem Genes: Drivers of host adaptation in *Fusariumm oxysporum*. *Front. Plant Sci*, 12:628611.
- Jaramillo, A. D. (2019). Identificación y cuantificación relativa de genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes en bacterias marinas. *Universidad Autonoma del Estado de Morelos*.
- Kanehisa, M. (2001). Kegg: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 4569-4574.
- Khan, A. H., Tanveer, S., Alia, S., Anees, M., Sultan, A., Iqbal, M., & Yousaf, S. (2017). Role of nutrients in bacterial biosurfactant production and effect of biosurfactant production on petroleum hydrocarbon biodegradation. *Ecological Engineering*, 104, 158-164.
- Koike, S., Wilen, C., Raabe, R., McCain, A., & Grebus, M. (Mayo de 2019). *Fusarium Wilt*. Obtenido de <https://ipm.ucanr.edu/agriculture/floriculture-and-ornamental-nurseries/fusarium-wilt/#gsc.tab=0>.
- Kurtzman, C. P., Price, N. P., Ray, K. J., & Kuo, T. M. (2010). Production of

- sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella* (*Candida*) *bombicola* yeast clade. *FEMS microbiology letters*, 311(2), 140-146.
- Leslie, J., & Summerell, B. (2006). Laboratory manual for *Fusarium*. *Blackwell Publishing*. Iowa, USA, 288.
- Liu, X., Jia, J., Atkinson, S., Cámara, M., Gao, K., Li, H., & Cao, J. (2010). Biocontrol potential of an endophytic *Serratia* sp. G3 and its mode of action. . *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26, 1465-1471.
- Lodovica Gullino, M., Albajes, R., & Nicot, P. C. (2020). 5.1. 1 Plant-Parasitic Nematodes. *Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops*, 9, 148.
- Luna, J., Rufino, R., Campos, G., & Sarubbo, L. (2012). Properties of the biosurfactant produced by *Candida sphaerica* cultivated in low-cost substrates. *Chem. Eng*, 27, 67-72.
- Maheshwari, D. K., Shukla, S., Aeron, A., Kumar, T., Jha, C. K., Patel, D., & ... & Wahla, V. (2013). Rhizobacteria for management of nematode disease in plants. *Bacteria in agrobiolgy: disease management*, 379-404.
- Mahlen, S. D. (2011). *Serratia* infections: from military experiments to current practice. . *Clinical microbiology reviews*, 24(4), 755-791.
- Makkar, R. S., Cameotra, S. S., & Banat, I. M. (2011). Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. . *AMB express*, 1, 1-19.
- Mandal, A., Sarkar, B., Mandal, S., Vithanage, M., Patra, A. K., & Manna, M. C. (2020). Impact of agrochemicals on soil health. *In Agrochemicals detection, treatment and remediation*, 161-187. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103017-2.00007-6>.
- Manzanilla-López, R. (2010). Speciation within *Nacobbus*: consilience or controversy?. *Nematology*, 12(3), 321-334.
- Manzanilla-López, R. H., Costilla, M. A., Doucet, M., Franco, J., Inserra, R. N., Lehman, P. S., & Evans, K. (2002). The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica*, 149-228.
- Manzanilla-López, R. H., Halford, P., Russell, M., Evans, K., Cid Del Prado Vera, I.,

- & Rowe, J. (1997). Characterisation of *Nacobbus aberrans* from Mexico and South America. . In *Abstracts ONTA 29th Annual Meeting, Mexico, 29 June-4 July 1997*, 27:11.
- Manzanilla-López, R. H., Quénéhervé, P., Brito, J. A., Giblin-Davis, R., Franco, J., Román, J., & Inserra, R. N. (2008). Contributions by Latin American nematologists to the study of nematode plant disorders and related impact on crop production.
- Marban, N., Bess, M., & Bert, M. (1989). Evaluation of control of *Meloidogyne incognita* and *Nacobbus aberrans* on tomato by two leguminous plants. *Rev. Nématol*, 12, 409-412.
- Markande, A. R., Patel, D., & Varjani, S. (2021). A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresource Technology*, 330, 124963.
- Marques-Pereira, C., . Proença, D. N., & Morais, P. V. (2022). The role of serratomolide-like amino lipids produced by bacteria of genus *Serratia* in nematocidal activity. *Pathogens*, 11(2), 198.
- Marques-Pereira, C., Proença, D. N., & Morais, P. V. (2022). The role of serratomolide-like amino lipids produced by bacteria of genus *Serratia* in nematocidal activity. *Pathogens*, 11(2), 198.
- Martínez Valenzuela, C., Romano Casas, G., Cuadras Berrelleza, A. A., & Ortega Martínez, L. D. (2019). Plaguicidas, impacto en salud y medio ambiente en sinaloa (méxico): implicaciones y retos en gobernanza ambiental. *Trayectorias Humanas Trascontinentales*, 4, <https://doi.org/10.25965/trahs.1615>.
- Martínez-Checa, F., Toledo, F. L., El Mabrouki, K., Quesada, E., & Calvo, C. (2007). Characteristics of bioemulsifier V2-7 synthesized in culture media added of hydrocarbons: chemical composition, emulsifying activity and rheological properties. *Bioresource technology*, 98(16), 3130-3135.
- Martínez-Fuentes, R., Tovar-Soto, A., Torres-Coronel, R., & Brechú-Franco, A. E. (2009). Histopatología en cultivares de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) no hospedantes de *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne y Allen, 1944. .

Nematropica, 311-317.

- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., De Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., & Breitling, R. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic acids research*, 39(2).
- Mnif, I., Grau-Campistany, A., Coronel-León, J., Hammami, I., Triki, M. A., Manresa, A., & Ghribi, D. (2016). Purification and identification of *Bacillus subtilis* SPB1 lipopeptide biosurfactant exhibiting antifungal activity against *Rhizoctonia bataticola* and *Rhizoctonia solani*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 6690-6699.
- Mnif, I., Hammami, I., Triki, M. A., Azabou, M. C., Ellouze-Chaabouni, S., & Ghribi, D. (2015). Antifungal efficiency of a lipopeptide biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* SPB1 versus the phytopathogenic fungus, *Fusarium solani*. . *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 18137-18147.
- Mondragon Mora, L. A. (2011). Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas aerobias autóctonas de yacimientos petroleros productoras de biosurfactantes para su aplicación en técnicas de MEOR. *IPN*.
- Morikawa, M., Hirata, Y., & Imanaka, T. (2000). A study on the structure–function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1488(3), 211-218.
- Mukherjee, S., Das, P., & Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *TRENDS in Biotechnology*, 24(11), 509-515.
- Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. . *Environmental pollution*, 133(2), 183-198.
- Nabor-Romero, O., Rojas-Martínez, R. I., Ochoa-Martínez, D. L., Vega-Arreguin, J., Sánchez-Flores, F. A., & Zavaleta-Mejía, E. (2020). Avances en el conocimiento sobre el rompimiento de la resistencia de chile CM-334 (*Capsicum annuum* L.) a *Phytophthora capsici* por *Nacobbus aberrans*. *Nematropica*, 50(1), 45-58.
- Narváez-Montaño, M. D., Mendoza-López, M. R., Sánchez-Viveros, G., Almaraz-Suarez, J. J., & Argumedo-Delira, R. (2023). Actividad inhibitoria de extractos

- alcohólicos de hongos comestibles contra *Rhizoctonia solani*. *Revista mexicana de ciencias agrícola*, 14(4), 615-625.
- Nicol, J. M., Turner, S. J., Coyne, D. L., Nijs, L. D., Hockland, S., & Maafi, Z. T. (2011). Current nematode threats to world agriculture. *Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions.*, 21-43.
- OEPP/EPPO. (2001). Diagnostic Protocols for Regulated pests/protocoles de diagnostic pour les organismes reglementes: *Nacobbus aberrans*. . *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, 31: 71-77.
- Oliveira, J. S., Araujo, W., Lopes Sales, A. I., Brito Guerra, A. D., Silva Araújo, S. C., de Vasconcelos, A. T., & ... Freitas, A. T. (2015). BioSurfDB: knowledge and algorithms to support biosurfactants and biodegradation studies. . *Database*, 2015, .
- Pacwa-Płociniczak, M., Płaza, G. A., Piotrowska-Seget, Z., & Cameotra, S. S. (2011). Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *International journal of molecular sciences*, 12(1), 633-654.
- Pavón-Morano, M., Alonso, G., & Martin de Santos, R. (2012). The importance of genus *Alternaria* in mycotoxins production and human diseases. *Nutricion Hospitalaria*, 27(6), 1772-1781.
- Pearson, W. R. (1990). [5] Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA.
- Pérez-Agis, E., Vázquez-García, M., González-Eguiarte, D., Pimienta-Barrios, E., Nájera-Rincón, M. B., & Torres-Morán, P. (2004). Sistemas de producción de maíz y población de macrofauna edáfica. . *Terra Latinoamericana*, 22(3), 335-341.
- Pérez-Reyes, M. C., Sánchez-Hernández, G., Martínez-Flores, R., Garza-Rivera, J. L., & Espinosa-Rodríguez, J. (17 de 05 de 2024). *Mohos productores de micotoxinas*. Obtenido de Fusarium: https://masam.cuautitlan.unam.mx/mohos_toxigenos_unigras/
- Pérez-Rodríguez, L. R., Pérez-Moreno, L., Guzmán-Mendoza, R., Sanzón-Gómez, D., & Belmonte-Vargas, J. R. (2019). In vitro sensitivity of phytopathological fungi causing diseases in strawberry agents to biological control and

- fungicides, in the state of Guanajuato, México. *Acta universitaria*, 29.
- Perfumo, A., Smyth, T., Marchant, R., & Banat, I. (2010). Production and roles of biosurfactants and bioemulsifiers in accessing hydrophobic substrates. *Springer*, In Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology (pp. 1501-1512). .
- Phetrong, K., Aran, H., & Maneerat, S. (2008). Production and characterization of bioemulsifier from a marine bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7. *Songklanakarin Journal of science & technology*, 30(3).
- Polanco Florián, L. G., Alvarado Gómez, O. G., Pérez González, O., González Garza, R., & Olivares Sáenz, E. (2019). Hongos asociados con la muerte regresiva de los cítricos en Nuevo León y Tamaulipas, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(4), 757-764.
- Popova, A. A., Koksharova, O. A., Lipasova, V. A., Zaitseva, J. V., Katkova-Zhukotskaya, O. A., Eremina, S. I., & ... Khmel, I. A. (2014). Inhibitory and toxic effects of volatiles emitted by strains of *Pseudomonas* and *Serratia* on growth and survival of selected microorganisms, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. *BioMed Research International*, 2014(1), 125704.
- Pozo, Y. R., Flores, D. V., Romero, L. C., Pérez, E. G., & Álvarez-Rivera, V. P. (2007). Selección de cepas de *Bacillus* y otros géneros relacionados para el control biológico de hongos fitopatógenos. . *Fitosanidad*, , 11(1), 35-40.
- Quiroga-Madrigal, R., Rosales-Esquinca, M., Rincón-Espinosa, P., & Hernández-Gómez, E. &-R. (2007). Enfermedades Causadas por Hongos y Nematodos en el Cultivo de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Municipio de Villaflores, Chiapas, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 25(2), 114-119.
- Rahman, K. S., Rahman, T. J., McClean, S., Marchant, R., & Banat, I. M. (2002). Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. *Biotechnology progress*, 18(6), 1277-1281.
- Rahman, P. K., & Gakpe, E. (2008). Production, characterisation and applications of biosurfactants-Review. *Biotechnology*.
- Ramirez-Suarez, A. (2011). Biology, systematics, phylogenetic analysis and DNA

character-based species diagnosis of the false root-knot nematode *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen 1944 (Nemata: Pratylenchidae). *The University of Nebraska-Lincoln*.

- Reid, A., Manzanilla-López, R. H., & Hunt, D. J. (2003). *Nacobbus aberrans* (Thorne, 1935) Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae); region., a nascent species complex revealed by RFLP analysis and sequencing of the ITS-rDNA. *Nematology*, 5(3), 441-451.
- Reséndiz Ramírez, Z., Osorio Hernández, E., Estrada Drouaillet, B., Pecina Martínez, J. A., Mendoza Castillo, M., & Reyes Méndez, C. A. (2016). Importancia de la resistencia del maíz nativo al ataque de larvas de lepidópteros. *REPOSITORIO NACIONAL CONACYT*.
- Romano Casas, G. M. (2019). Plaguicidas, impacto en salud y medio ambiente en sinaloa (méxico): implicaciones y retos en gobernanza ambiental. *Trayectorias Humanas Trascontinentale*.
- Ron, E. Z., & Rosenberg, E. (2006). Production and stability studies of the bioemulsifier obtained from a strain of *Candida glabrata* UCO1002. *Journal of Biotechnology*, 9, 400-406.
- Rosas-Galván, N. S., Martínez-Morales, F., Marquina-Bahena, S., Tinoco-Valencia, R., Serrano-Carreón, L., Bertrand, B., & ... Trejo-Hernández, M. R. (2018). Improved production, purification, and characterization of biosurfactants produced by *Serratia mar*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 65(5), 690-700.
- Rosenberg, E., & Ron, E. Z. (1999). High-and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied microbiology and biotechnology*, 52, 154-162.
- Sáenz-Marta, C. I., de Lourdes Ballinas-Casarrubias, M., Rivera-Chavira, B. E., & Nevárez-Moorillón, G. V. (2015). Biosurfactants as useful tools in bioremediation. *Advances in bioremediation of wastewater and polluted soil*, 5, 94-109.
- Salazar González, C., Lagos Mora, L. E., Díaz Rodríguez, V., Mora Chaves, S., & Betancourth Garcia, C. (2020). Caracterización de *Fusarium* spp. asociado con la pudrición basal de la cebolla de rama. *Revista UDCA Actualidad &*

Divulgación Científica, 23(1).

- Sánchez Portillo, J. F. (2010). Efecto de quitina y quitosano sobre huevos y juveniles de nemátodos formadores de nódulos radiculares, *Nacobbus aberrans* y *Meloidogyne incognita* bajo condiciones de in vitro e in vivo (Master's thesis). *Colegio de posgraduados*.
- Santiago, E. (2020). Actividad nematicida de *Serratia* sp. contra el nematodo agallador *Nacobbus aberrans*. *UAEM*, <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/1261>.
- Santos-Goncalves, O. C. (2017). Detección e identificación de Biosurfactantes y/o Bioemulsificantes producidos por aislados bacterianos asociados a una Fosa petrolera de la Faja Petrolífera del Orinoco (Doctoral dissertation). *Universidad Central de Venezuela Facultad de Ciencias Escuelas Biológicas*.
- Saravanakumari, P., & Mani, K. (2010). Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. *Bioresource technology*, 101(22), 8851-8854.
- Sarwar, A., Hassan, M. N., Imran, M., Iqbal, M., Majeed, S., Brader, G., & ... Hafeez, F. Y. (2018). Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. *Microbiological research*, 209, 1-13.
- Satpute, S. K., Banpurkar, A. G., Dhakephalkar, P. K., Banat, I. M., & Chopade, B. A. (2010). Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 30(2), 127-144.
- Schmidt, R., Jager, V. D., Zühlke, D., Wolff, C., Bernhardt, J., Cankar, K., & ... Garbeva, P. (2017). Fungal volatile compounds induce production of the secondary metabolite Sodorifen in *Serratia plymuthica* PRI-2C. *Scientific Reports*, 7(1), 862.
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., & ... Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database*, 2020, baaa062.

- SENASICA. (2021). Ficha técnica para el diagnóstico de: Especies del género *Alternaria* que afectan brasicáceas (Brassicaceae). Tecámac, México: Autor.
- Sharma, A. S., Kaur, G., & Kaur, J. (2014). A study on biosurfactant production in *Lactobacillus* and *Bacillus* sp. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(11), 723-733.
- Sharma, A., Soni, J., Kaur, G., & Kaur, J. (2014). A study on biosurfactant production in *Lactobacillus* and *Bacillus* sp. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci*, 3(11), 723-733.
- Shekhar, S., Sundaramanickam, A., & Balasubramanian, T. (2015). Biosurfactant producing microbes and their potential applications: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 45(14), 1522-1554.
- SIAP. (2016). *panorama agroalimentario de tomate rojo*. Obtenido de servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP) : Disponible en <http://cort.as/-lw2V>
- Siegmund, I., & Wagner, F. (1991). New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. . *Biotechnology Techniques*, 5(4), 265-268.
- Soberón-Chávez, G., & Maier, R. M. (2011). Biosurfactants: a general overview. *Biosurfactants: from genes to applications*, 1-11.
- Somoza-Coutiño, G., Wong-Villarreal, A., Blanco-González, C., Pérez-Sariñana, B., Mora-Herrera, M., Mora-Herrera, S. I., & ...Yañez-Ocampo, G. (2020). A bacterial strain of *Pseudomonas aeruginosa* B0406 pathogen opportunistic, produce a biosurfactant with tolerance to changes of pH, salinity and temperature. *Microbial pathogenesis*, 139, 103869.
- Stenberg, J. A., Sundh, I., Becher, P. G., Björkman, C., Dubey, M., Egan, P. A., & ... Viketoft, M. (2021). When is it biological control? A framework of definitions, mechanisms, and classifications. *Journal of Pest Science*, 94(3), 665-676.
- Su, C., Xiang, Z., Liu, Y., Zhao, X., Sun, Y., Li, Z., & ... Zhao, F. (2016). Analysis of the genomic sequences and metabolites of *Serratia surfactantifaciens* sp. nov. YD25 T that simultaneously produces prodigiosin and serrawettin W2. . *BMC genomics*, 17, 1-19.
- Sumathi, R., & Yogananth, N. (2016). Isolation and identification of biosurfactant

- producing *Pseudomonas aeruginosa* from marine sediment samples and its antimicrobial properties. . *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci*, 3(12), 200-212.
- Team, R. C. (2023). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., & Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género *Bacillus* en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, , 42(3), 131-138.
- Trigos, Á., Ramírez, K., & Salinas, A. (2008). Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. *Revista mexicana de micología*, 28(SPE), 125-129.
- Tugrul, T., & Cansunar, E. (2005). Detecting surfactant-producing microorganisms by the drop-collapse test. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 851-853.
- Van Driesche, R., Hoddle, M., Center, T. D., Ruíz, C. E., Coronada, B. J., & Manuel, A. J. (2007). *Control de plagas y malezas por enemigas naturales* (No. 632.96 V33). US Department of Agriculture, US Forest Service, Forest Health Technology Enterprise Team.
- Van Houdt, R., Givskov, M., & Michiels, C. W. (2007). Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS microbiology reviews*, 31(4), 407-424.
- Veenanadig, N. K., Gowthaman, M. K., & Karanth, N. G. (2000). Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. *Bioprocess Engineering*, 22, 95-99.
- Venanzio, G. A. (2014). Mecanismos de patogénesis de *Serratia marcescens*. *Universidad Nacional de Rosario*, 12-37.
- Vijayakumar, S., & Saravanan, V. (2015). Biosurfactants-types, sources and applications. . *Res J Microbiol*, 10(5), 181-192.
- Villaverde, J. (14 de 06 de 2018). *Plantamus*. Obtenido de Todo sobre Fusarium: <https://plantamus.com/blog/todo-sobre-fusarium/>
- Von Graevenitz, A. (1980). Infection and colonization with *Serratia*. In *The Genus*

- Serratia*, (pp. 167-186). CRC Press, Inc. Boca Raton/Florida.
- Vovlas, N., Nico, A. I., De Luca, F., De Giorgi, C., & Castillo, P. (2007). Diagnosis and molecular variability of an Argentinean population of *Nacobbus aberrans* with some observations on histopathology in tomato. *Journal of Nematology*, 39(1), 17.
- Walter, V., Syltatk, C., & Hausmann, R. (2010). Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. *Biosurfactants*, 1-13.
- Wei, Y. H., Lai, C. C., & Chang, J. S. (2007). Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochemistry*, 42(1), 40-45.
- Wittgens, A. R. (2018). On the road towards tailor-made rhamnolipids : current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 102, 8175–8185. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9240-x> MINI-REVIEW On.
- Wong-Villarreal, A., Méndez-Santiago, E. W., Gómez-Rodríguez, O., Aguilar-Marcelino, L., García, D. C., García-Maldonado, J. Q., & ... Sanzón-Gómez, D. (2021). Nematicidal activity of the endophyte *serratia ureilytica* against *nacobbus aberrans* in chili plants (*Capsicum annuum* L.) and identification of genes related to biological control. *plants*, 10(12), 2655.
- Youssef, N. H., Duncan, K. E., Nagle, D. P., Savage, K. N., Knapp, R. M., & McInerney, M. J. (2004). Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. *Journal of microbiological methods*, 56(3), 339-347.

Anexos

13.1. Medios de cultivos utilizados

Condiciones de cultivo

La cepa *S. ureilytica* UTS se creció en medios de cultivo con la finalidad de crecimiento bacteriano, y producción de biosurfactante.

Medios de cultivos utilizados

Bacto-peptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L

Medio agar Luria-Bertani (LB)

Bacto-peptona	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L
Agar	15 g/L

Medio peptona-Glicerol (PG)

Peptona de caseína	4 g/L
Glicerol	14 g/L
$(NH_4)_2SO_4$	1.5 g/L

Medio agar azul de metileno (MBA)

$(NH_4)_2HPO_4$	1.5 g/L
KH_2PO_2	4 g/L
Extracto de levadura	0.4 g/L
CTAB	0.2 g/L
$MgSO_4$ 1M	8 ml
Azul de metileno 0.001g/L	15 ml
Agar	15



In Vitro Evaluation of the Biosurfactant Produced by *Serratia ureilytica* UTS with Antifungal and Nematicidal Activity Against *Nacobbus aberrans*

Carlos A. Zamorano-González¹ · José A. Ramírez-Trujillo¹ · Hugo Pilotzi-Xahuentitla² · Gustavo Yáñez-Ocampo³ · Emanuel Hernández-Nuñez⁴ · Ramón Suárez-Rodríguez¹ · María Laura A. Orea-Flores⁵ · Olga Gómez-Rodríguez⁶ · Saúl Espinosa-Zaragoza⁷ · José L. Rangel-Zaragoza⁸ · Liliana Aguilar-Marcelino⁹ · Javier Aguilar-Fuentes⁷ · Arnoldo Wong-Villarreal¹⁰

Received: 20 July 2024 / Accepted: 16 December 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2025

Abstract

In the present study, the nematicidal and fungicidal activity of the biosurfactant (BS) produced by the strain *Serratia ureilytica* UTS was evaluated. The highest mortality of J2 juveniles of the nematode *Nacobbus aberrans* was 92.3% at a concentration of 30 mg/mL. Among the phytopathogenic fungi, the concentration of 1.0% of the crude extract of the biosurfactant was the one that obtained the highest percentage inhibition against the phytopathogens *Fusarium oxysporum* 72.2%, *Fusarium* sp., 80.2% and *Alternaria solani* 100% at 168 h of incubation. Analysis of the BS by GC-MS revealed the presence of the three amino acids alanine, homocystine and valine in its composition. As well as the presence of fatty acids: stearic acid, lauric acid and palmitic acid. With nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrophotometry (MS) analysis, the crude extract was found to have the structure of a quaternary ammonium salt derived from stearic fatty acid, which is a component of the biosurfactant. Based on this evidence, it is suggested that the BS produced by *S. ureilytica* has a lipopeptide-like chemical structure and possesses nematicidal and fungicidal activity, and is therefore proposed for potential use and application as a biopesticide for the benefit of regenerative and sustainable agriculture.

✉ Arnoldo Wong-Villarreal
wova79@hotmail.com

¹ Centro de Investigaciones en Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, C.P. 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

² Unidad Mérida, Departamento de Recursos del Mar, CINVESTAV-IPN, Mexico, Mexico

³ Laboratorio de Exploración de Microbiología del Suelo, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma del Estado de Mexico, Campus El Cerrillo, Carretera Toluca-Ixtlahuaca Km 15.5, Piedras Blancas, C.P. 50200 Toluca de Lerdo, Mexico

⁴ Departamento de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico Superior del Calkiní en el Estado de Campeche (ITESCAM), Av. AH Canun S/N San Felipe, 24900 Calkiní, Campeche, Mexico

⁵ Centro de Química del Instituto de Ciencias, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Complejo de Ciencias, C.U, Puebla, Mexico

⁶ Colegio de Postgraduados, Carretera México-Texcoco, Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, México

⁷ Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Chiapas, 30660 Huehuetan, Mexico

⁸ Dirección General de Sanidad Vegetal, Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria, Km. 37.5, Carretera Federal México-Pachuca, Av. Centenario de la Educación, Col. Santa Ana, C.P. 55740 Tecamac, Mexico, Mexico

⁹ National Center for Disciplinary Research in Animal Health and Safety (INIFAP), Km 11 Federal Road Cuernavaca-Cuautla, 62550 Jiutepec, Mexico, Mexico

¹⁰ División Agroalimentaria, Universidad Tecnológica de la Selva, C.P. 29950 Ocosingo, Chiapas, Mexico

Introduction

Plant-parasitic nematodes are soil inhabitants that parasitize numerous plants, causing an estimated \$80 billion in crop losses worldwide [1]. More than 4000 species of plant parasitic nematodes have been reported that affect different plant tissues, including leaves, stems, flowers, and roots [2]. In agriculture, the false root-knot nematode *N. aberrans* affects crops of economic interest from 18 families with approximately 84 species, including crops and weeds [3]. Additionally, fungi are other phytopathogens that cause damage to the roots, stem, drowning of the seed, as well as a decrease in the quality of the fruits, and their destruction of up to 60% [4].

Pesticides are used to control these pathogens; however, they have generated resistance to agrochemicals [5, 6]. An alternative that gradually replaces pesticides is the application of secondary metabolites produced by microorganisms, such as biosurfactants, because they have antagonistic activity and can be used as agents for biocontrol. Biosurfactants are molecules of hydrophobic and hydrophilic nature, their interest in the environmental, health, cosmetics and agriculture areas has increased in the last two decades [7, 8]. In the agricultural area, studies have focused on molecules such as: surfactin, iturin, rhamnolipids, and fengycin that have been reported to have antifungal, antibacterial and anthelmintic activity [9]. Toral et al. [10] reported the effect of biosurfactants from the lipopeptide group when applied to seeds control *Botrytis cinerea*, as well as the biosurfactant from the rhamnolipid group controls the pathogen *F. verticillioides* [11]. Surfactin A produced by *Bacillus* NH-100 and NH-217 have antifungal activity against strains of *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, and *F. solani*.

In the *Serratia* genus it comprises 18 species, among which is *S. marcescens*, an opportunistic pathogen of nosocomial infections, another species of biotechnological interest is *S. ureilytica*, which is genetically related to *S. marcescens*, which can be differentiated metabolically because it only uses urea as the sole source of nitrogen [12–14]. Also, in the *Serratia* genus, the production of biosurfactants has been identified by some species such as: *S. marcescens*, *S. rubidaea*, and *S. surfactantfaciens*. These species produce two classes of biosurfactants: lipopeptides and glycolipids [15]. The *S. marcescens* strain produces serratamolides and has antifungal activity against pathogenic oomycetes [16]. *S. rubidaea* SNAU02 has also been reported to produce rhamnolipid with antifungal activity against *F. oxysporum* and *Colletotrichum gloeosporioides* at a concentration of 100 µg/mL [17]. Another activity that has been reported for biosurfactants is against nematodes. Hussain et al. [18] reported that the *Bacillus subtilis*

strain HussainT-AMU that the biosurfactant produced by this strain causes 90% of J2 mortality and significantly reduces the hatching of *Meloidogyne incognita* eggs. Gómez-Gutiérrez et al. [19] reported that the biosurfactant produced by *Bacillus* strains has activity against juveniles (J2) of the nematode *N. aberrans*. Reference [20], reported the nematicidal activity of *S. ureilytica* UTS at a concentration of 4×10^9 cells/mL, decreasing the number of galls, eggs and egg masses, as well as the penetration of the nematode *N. aberrans* into the roots of chili plants. With this background, the objective was to characterize and evaluate the in vitro effect of the biosurfactant secondary metabolite produced by the *S. ureilytica* UTS strain against the nematode *N. aberrans* and the phytopathogenic fungi *Fusarium* sp., *F. oxysporum* and *A. solani*, to be considered as an alternative for biocontrol.

Materials and Methods

Isolation and Identification of Bacterial Strain

The *Serratia* strain was isolated from nodules of *Mimosa pudica* in the Lacandon Jungle, Chiapas, Mexico, and preserved in 20% glycerol at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [21]. Taxonomic identification was performed by genome sequencing as *S. ureilytica* UTS, the genome was deposited in GenBank under accession number JAIQCT0000000000 [20, 22].

Obtaining Phytopathogenic Fungi

The strains of phytopathogenic fungi, *Fusarium* sp., *F. oxysporum*, and *A. solani* were provided courtesy of the LANGE BIO herbarium, CINVESTAV Irapuato, Mexico. They were grown for 7 days at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ in PDA medium (2% casein peptone, 2% dextrose, and 1% yeast extract) [21, 23].

Obtaining the *N. aberrans* Inoculum

The inoculum of *N. aberrans* was obtained from galled roots of tomato grown in naturally infested soil at Colegio de Postgraduados, Montecillo campus, State of Mexico, Mexico, and kept in greenhouse tomato plants (cv. Rio Grande). Nematode eggs extraction was carried out following the methodology described by Vrain [24], and they were incubated at $28 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Petri dishes with sterile distilled water, until hatching of the second-stage juveniles (J2) [20, 25].

Biosurfactant Production

A 40 mL pre-culture was carried out in LB medium of the *S. ureilytica* UTS strain for 24 h at $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 140 rpm. The inoculum was added at 10% (v/v) in 400 mL of sterile

PG medium (casein peptone 4 g/L, glycerol 14 g/L and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.50 g/L) and was incubated at 30 °C for 168 h at 140 rpm [26].

Recovery of Crude Biosurfactant

After 168 h of incubation, the culture medium was centrifuged at 6000 rpm for 25 min at 4 °C. The cell-free supernatant obtained was acidified to pH 2 with a 1 M HCl solution [27], subsequently, 2 volumes of cold ethanol were added [28], the solution ethanol was stirred for 30 min, and kept at 4 °C for 72 h. The sediments formed were eliminated by centrifugation at 6000 rpm for 20 min at 4 °C, the solution free of impurities was evaporated in a rotary evaporator, until obtaining a brown solution with a viscous appearance [29].

In Vitro Evaluation of Antifungal Activity

The antifungal activity of the biosurfactant from the *S. ureilytica* UTS strain was evaluated against the phytopathogenic fungi *F. oxysporum*, *A. solani*, and *Fusarium* sp., in Potato-Dextrose-Agar (PDA) medium. PDA medium was prepared and concentrations of the crude biosurfactant at 0.02, 0.04, 0.1, 0.5, and 1% were added. Subsequently, a circle of approximately 4 mm² of medium with fungus incubated for five days was placed in the PDA boxes treated with the biosurfactant and the control (PDA without biosurfactant). The circles were placed in the center of the box and incubated at 28 °C for 168 h. The diameter of the micellar growth was measured every 24 h until 168 h. To obtain the percentage of inhibition, the following formula was used: Mycelial inhibition (%) = $[1 - (\text{Da}/\text{Db})] \times 100$, where Da = the diameter of the growth zone in the treated plates, Db = the diameter of the growth zone on the control plate [30–32]. Three repetitions were performed for each test.

In Vitro Evaluation of Biosurfactants Against *Nacobbus aberrans*

The biological activity of the biosurfactant produced by the *S. ureilytica* UTS strain was evaluated at concentrations of 10, 20, and 30 mg/mL, for which a 96-well microtiter plate was used, negative (water) and positive (nematrol 6 mg/mL; Organic nematicide derived from chitin and plant extracts.) controls were also placed on each plate. In each well, 50 µL of distilled water containing 100 *N. aberrans* J2 was mixed with 50 µL of the corresponding biosurfactant treatment, each of the treatments and control groups, consisted of five repetitions. Subsequently, they were incubated in a humidity chamber at 28 °C for 72 h, J2 mortality was evaluated, adding 10 µL of NaOH to 1N to stimulate the juveniles 2 and the response to the chemical stimulus was observed under a

stereoscope with 4× and 10× objectives (VelaQuin Model VE-S6) [33].

The percentage results of the different bioassays and mortality experiments were estimated based on the following formula [34]:

$$\% \text{Mortality} = (\text{treated group} - \text{negative control}) / (100 - \text{negative control}) \times 100$$

$$\% \text{Mortality} = \left(\frac{\text{number of dead juvenile}}{\text{number of dead juvenile} + \text{number of live juvenile}} \right) \times 100$$

Biosurfactant Characterization

Three tests were carried out to detect the surfactant activity of the biosurfactant produced by the *S. ureilytica* UTS strain.

Dispersion Test

The oil dispersion test consisted of adding 20 mL of water to a Petri dish and then adding 200 µL of burned engine oil to the center of the Petri dish. Finally, 20 µL of the crude extract was gently added to the middle of the drop of oil. The presence of the biosurfactant in the crude extract is visualized by the formation of a transparent halo, the diameter of the transparent halo correlates with the surfactant activity [35, 36].

Determination of Surface Tension

The surface tension measurements of the supernatant were carried out with an Easy Dine KRÜSS K20® tensiometer, using the Wilhelmy Plate method [37], which consists of measuring the surface tension (mN/m) between a liquid and a solid, measuring the force acting on a submerged vertical plate. For measurements, distilled water was used as a control with a surface tension of 66–67 mN/m.

Emulsification Index

The emulsification rate of the culture samples was determined by adding 2 mL of cell-free supernatant to 2 mL of soybean oil in a test tube, vortexing for 2 min, and letting it sit for 24 h at room temperature. The emulsion formed was compared with that formed by sodium dodecyl sulfate (SDS) and 0.5% Tween 80 as a positive control. The emulsification index was calculated by dividing the height of the emulsion layer (HE) by the total height of the mixture (HT) and multiplying by 100, as follows: EI24 (%) = $(\text{HE}/\text{HT}) \times 100$ [38, 39].

Biosurfactants Characterization by GC-MS Analysis

Analysis of gas-mass chromatography was performed on a Thermo Scientific brand TRACE GC with an ITQ900 ion trap mass detector (Thermo Electron Corporation, Milan, Italy). The carrier gas was helium with a flow of 1 mL/min. The column used was TRACE-5MS (30 m, 0.25 μ m of film, and 0.25 mm internal diameter). The GC was equipped with a split-splitless injector that was held at 270 °C. In method the oven was programmed as follows: initially 50 °C by 1 min, then the temperature was ramped in three steps: from 50 to 300 °C at 7 °C/min and finally held at 300 °C by 5 min, giving a total chromatographic time of 56 min. The mass spectra were acquired by electron impact ionization at 70 eV and the detector was set in TIC/Scan (Total Ion Current) mode from 50 to 650 m/z with 0.2 scan s⁻¹ (Dwell) of scanning rate. The transfer line and ion source temperatures were held at 270 and 200 °C, respectively. The raw data were processed using XcaliburTM software version 4.0 (Thermo Scientific, USA).

Extract Purification

500 mg of the extract was purified by chromatography in an open column packed with SiO₂ (Merck® Silica gel 60 (0.063–0.2 mm, 70–230 mesh ATSM), and with a mixture of AcOEt (previously distilled): MeOH (J.T. Baker, HPLC grade) (90:10). Thin Layer Chromatography (TLC) was used to monitor the progress of column chromatography (Merck® silica gel 60 F₂₅₄ plates) From this purification process, seven fractions were obtained, however, only one of them presented an acceptable purity, with a yield of 25%, to be able to carry out the corresponding analyzes and their characterization by mass spectrometry and NMR (¹H, ¹³C, COSY, HSQC and APT).

Structural Analysis of the Pure Fraction

Mass Spectrometry (MS)

For MS analysis, the dry extract was analyzed on a JEOL The JM-Station JMS-700 mass spectrometer at a voltage of 70 eV.

Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

Analysis of approximately 50 mg of the purified fraction was conducted using a 500 MHz Bruker Avance spectrophotometer. As the solvent, 500 μ L of MeOD-d₄ (Sigma-Aldrich, 99 atom % D) was used to dissolve the sample in a 5 mm NMR tube (Wilmad®). The performed analyses were ¹H, ¹³C, APT, COSY, and HSQC. The spectra were processed in the MestReNova® software.

AntiSMASH Analysis

In the analysis of the *S. ureilytica* UTS genome, genes related to the biosynthesis of biosurfactants were identified using the AntiSMASH bioinformatics tool from its server <https://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start> [40], the default parameters were used and additional features were added such as, MiBiG cluster comparison, Pfam cluster analysis, cluster explosion, Pfam-based GO term annotation and TIGRFam.

Statistical Analysis

Mortality data for nematodes *N. aberrans* (J2) and were normalized using the square root and analyzed as a completely randomized design. The means were compared using the Tukey test, considering a statistical significance value of $\alpha=0.05$. The tests were analyzed using R software version 4.1.1 [41].

Results

In Vitro Evaluation of Antifungal Activity

The biosurfactant was evaluated in the mycelial growth inhibition test against phytopathogenic fungi. In the 0.02 and 0.04% treatments, a significant difference was found with the 1.0% treatment in the percentage of inhibition of mycelial growth against the fungus *F. oxysporum* at 168 h of incubation. The biosurfactant concentration at 1.0% had 72.2% inhibition, this value being the highest percentage. Concerning the phytopathogen *Fusarium* sp., the treatments of 0.02, 0.04, and 0.1%, a significant difference was found with the treatment of 1.0% of the biosurfactant, while between the concentrations of 0.5 and 1.0% there is no significant difference, the highest percentage of inhibition was 80.2 at the 1.0% concentration (Table 1). In the evaluation of the fungus

Table 1 Inhibition of mycelial growth of the biosurfactant produced by *S. ureilytica* UTS at different concentrations against phytopathogenic fungi

Concentration (%)	Pathogen growth inhibition (%)		
	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Alternaria solani</i>
0.02	33.5 ± 6.97 ^b	45.6 ± 3.76 ^b	49.4 ± 5.06 ^c
0.04	36.8 ± 6.64 ^b	46.9 ± 3.81 ^b	52.8 ± 4.92 ^c
0.1	44.3 ± 4.43 ^{ab}	52.3 ± 3.45 ^b	55.9 ± 3.74 ^c
0.5	47.1 ± 0.30 ^{ab}	61.2 ± 4.34 ^{ab}	81.9 ± 1.09 ^b
1.0	72.2 ± 1.03 ^a	80.2 ± 2.62 ^a	100.0 ± 0 ^a

Average with different letters indicates that there are significant differences (Tukey, $P < 0.05$)

A. solani, a significant difference was found between the treatment at 1.0% of the biosurfactant with respect to the treatments 0.02, 0.04, 0.1, and 0.5, with the concentration of 1.0% being the best treatment with 100% inhibition of mycelial growth (Table 1). In the evaluation of the three phytopathogenic fungi, the greatest effect was observed in the treatment of 1% of the biosurfactant against *A. solani*, the percentage of inhibition was 100%, while, for *Fusarium* sp., it was 80.2% and for *F. oxysporum* it was of 72.2%. We can also observe in the macroscopic morphology of the fungi in the different concentrations that the biosurfactant was evaluated that from the concentration of 0.1% changes are observed in the morphology of the growth of the fungi with respect to the control and the concentrations of 0.02 and 0.04 (Fig. 1), starting from a concentration of 0.1%, a white color is observed in the mycelium of the phytopathogenic fungi (Fig. 1).

In Vitro Evaluation of Biosurfactants Against *N. aberrans*

In the in vitro evaluation of the three concentrations of the biosurfactant against *N. aberrans* (J2) at 72 h we can observe that the concentration of 10 mg/mL the mortality percentage was 90.6%, while in the concentration of 20 mg/mL

Table 2 In vitro evaluation of the biosurfactants produced by the *S. ureilytica* UTS strain at different concentrations against the false root-knot nematode *N. aberrans* (J2)

Treatment	Concentration mg/mL	%Mortality
Biosurfactant	10	90.6 ± 5.76 ^b
Biosurfactant	20	87.0 ± 3.65 ^b
Biosurfactant	30	92.3 ± 4.28 ^{ab}
Water	—	2.90 ± 0.79 ^c
Nematrol	6	96.0 ± 2.58 ^a

Average with different letters indicates that there are significant differences (Tukey, $P < 0.05$)

was 87.0% and that of 30 mg/mL was 92.3%, although a difference is observed in the percentage values at the different concentrations, statistically there is no significant difference between them (Table 2), while in the concentration of 30 mg/mL there is no significant difference with respect to the control that is nematrol (Table 2).

Genes Related to Biosurfactant Synthesis

Analysis of the *S. ureilytica* UTS genome with the Anis-MASH program predicted 14 groups of genes involved in the

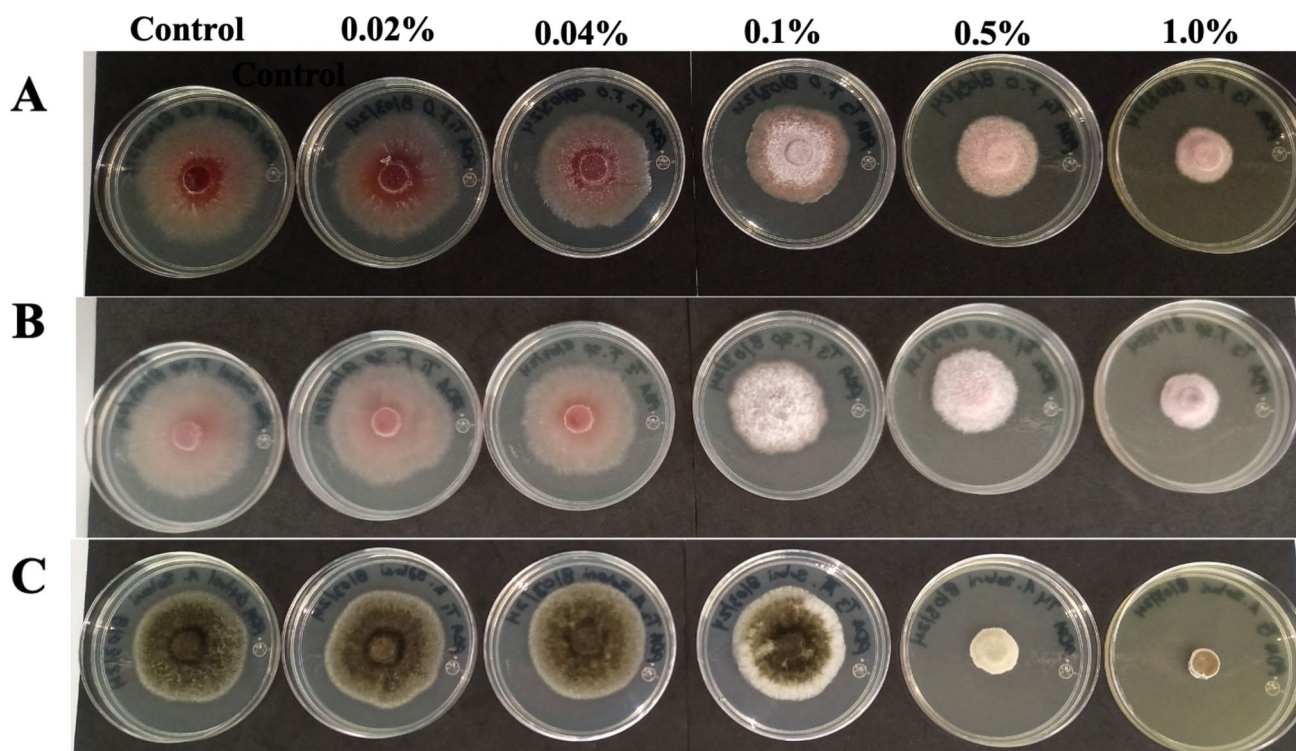


Fig. 1 Antagonist activity of different concentrations of the biosurfactant produced by *S. ureilytica* UTS, against phytopathogenic fungi. The control columns mean the phytopathogenic fungus without the

presence of biosurfactant. Row **a** *Fusarium oxysporum*; row **b** *Fusarium* sp., row **c** *Alternaria solani*

Table 3 Results of secondary metabolite synthesis region identification in *S. ureilytica* UTS

Genomic sites		Product types	Most similar known gene clusters	
Start site	Ending site		Most similar products	Similarity (%)
185,895	231,603	NRPS	Prodigiosin	12
22,715	42,993	RRE-containing	Lankacidin C	13
55,816	126,324	T1PKS, NRPS	Viobactin	46
44,923	71,365	Thiopeptide	O-antigen	14
49,059	71,156	Opine-like-metallophore	Yersinopine	100
98,489	124,157	Betalactone	—	—
1	30,126	NRPS	5-dimethylallylindole-3-acetonitrile	22
39,030	39,704	Hserlactone	—	—
1	26,213	NRPS	Xenotetrapeptide	100
68,210	93,533	NRPS	Rizomide A/rizomide B/rizomide C	100
1	50,947	NRP-metallophore, NRPS	Trichrysobactin/cyclic trichrysobactin/chrysobactin/dichrysobactin	46
6335	46,367	NRPS, Thiopeptide, LAP	Microcin E492	12
629	34,899	NRPS	—	—
1	2393	NRPS	Kolossin	100

Table 4 Screening of the surfactant activity of the *S. ureilytica* UTS strain

Strain	Drop collapse	Oil diffusion (mm)	Surface tension (mN/m)	Emulsification index; E_{24} (%)
<i>S. ureilytica</i> UTS	+	53.03	48 ± 4	40.7

Positive test +

syntheses of secondary metabolites, 9 non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) were found, of which three have 100% similarity with xenotetrapeptide, rhizomide A/rhizomide B/rhizomide C and Kolossin (Table 3), while another NRPS has 46% similarity with viobactin and trichrysobactin/cyclic trichrysobactin/chrysobactin/dichrysobactin (Table 3), the other NRPS have below 22% similarity with prodigiosin, 5-dimethylallylindole-3-acetonitrile and microcin E492; while for an NRPS, no similarity was found with reported gene groups (Table 3).

Table 5 Isoforms detected by GC-MS of crude biosurfactant extracted from bacteria *S. ureilytica* UTS

Chemical name	RT (min)	MW
Alanine, N-acetyl-3-phenyl-N-(trifluoroacetyl)-, methyl ester	11.19	317.26
4,7-Octadecadienoic acid methyl ester	15.17	294.50
DL-Homocystine	17.05	268.35
L-Valine, N-[2-(chloroimino)-3-methyl-1-oxobutyl]	17.69	248.70
Dodecanoic acid, 2,3-bis(acetyloxy)propyl ester	16.59	358.46
Hexadecanoic acid, methyl ester	18.93	270.45

¹National Center for Biotechnology Information (2024). PubChem Compound Summary. Retrieved November 18, 2024

Biosurfactant Activity

The crude extract of the *S. ureilytica* UTS strain decreased the surface tension from 66 to 48 (mN/m) at 24 h at a concentration of 100 mg/L; the extract was also positive in the droplet collapse test. As well as the oil diffusion test with 53.0 (mm), with an emulsification index at 24 h of 40.7% (Table 4).

Characterization of Biosurfactants by GC-MS

In the crude extract produced by the *S. ureilytica* UTS strain, analyzed by GC-MS, three signals were detected at 11.19, 17.05 and 17.69 min RT, which corresponds to the metabolites Alanine, N-acetyl-3-phenyl-N-(trifluoroacetyl) methyl ester, DL-Homocystine and L-Valine, N-[2-(chloroimino)-3-methyl-1-oxobutyl]-, respectively (Table 5). Signals were also detected at 15.17, 16.59 and 18.93 min RT, which corresponds to the metabolites 4,7-Octadecadienoic acid methyl ester (stearic acid), dodecanoic acid (lauric acid) and hexadecanoic acid (palmitic acid), respectively, which are fatty acids (Table 5).

Chemical Analysis

500 mg of extract were purified, being fraction number 4 with which we worked in the analysis to be able to elucidate if it was a biosurfactant. Pure fraction 4 was analyzed using, ^{13}C (Fig. 2a), ^1H (Fig. 2b), APT (Fig. 3S), COSY (Fig. 2S), and HSQC (Fig. 4S) NMR. Table 1S presents the number of peaks observed in the ^{13}C NMR spectrum of purified fraction 4. The spectrum DEPT-135 reveals the presence of double bonds, with signals at 130.16 and 134.98 ppm. Additionally, several CH_2 groups were observed in the range of 10.77–58.72 ppm, corresponding to CH_2 bonds. No signals corresponding to CH_3 groups are observed in the APT spectrum. No evidence of resonances near 95–105 ppm (C1 sugar carbon) were found, ruling out the presence of a sugar group. The ^{13}C NMR spectrum of purified Fraction displayed peaks around 172 ppm and 173, typical of carbonyl groups (Fig. 2a).

The ^1H NMR spectrum of fraction 4 provides further evidence, showing the presence of various methylene protons. Consistent with fatty acid structures, the spectrum also highlights β -protons and α -protons (at 1.58 ppm and 2.25 ppm, respectively), along olefinic protons at 5.45 ppm. This data supports the presence of fatty acid chains (Fig. 2b).

The chemical shifts for all proton and carbon couplings were determined using the HSQC spectrum and are listed in Table 2S. Figure 4S illustrates the HSQC spectrum, which shows that the proton at 0.88 ppm is coupled with carbons at 22.94 ppm and 32.21 ppm (CH_2 region) as well as with carbons in the carbonyl region (177.07 ppm and 177.16 ppm). Proton couplings were further validated using the COSY spectrum, with the data consistently indicating the presence of fatty acids in this purified fraction (Fig. 2S).

Table 2S shows the correlation of peaks in the HSQC spectrum, in the NMR experiments, no signals are observed for CH_3 , only signals that can be assigned to both aliphatic and vinyl CH_2 groups are observed, therefore, it was determined that there is a terminal double bond in a 18 C chain. In addition, many signals corresponding to CH_2 groups are observed. At 170 ppm a signal is observed that is typical of a carbonyl group. After carrying out the analyzes to characterize the pure fraction, it was proposed that it is a quaternary ammonium salt, in this case possibly the compound N, N, N-tris(2-(hexadec-15-enoyloxy) ethyl) but- 3-in-1-aminium (Fig. 2c).

Discussion

The use of biosurfactants to control diseases and pests is an alternative that can reduce the use of agrochemicals. Some bacteria of different genera produce metabolites that may have biocontrol activity against some phytopathogenic fungi

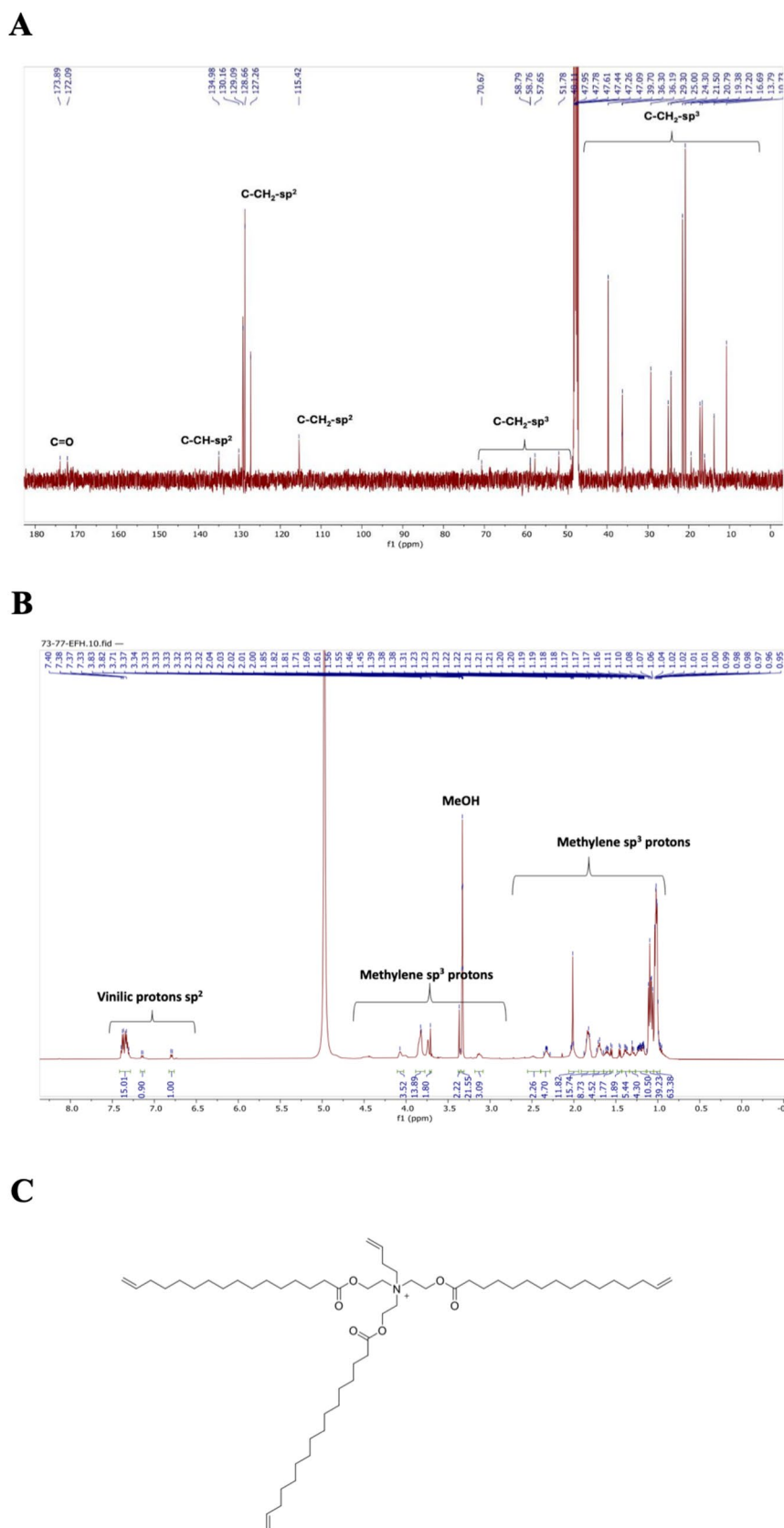
and nematodes that cause diseases and pests on different crops. In this study, a crude extract was obtained from the strain *S. ureilytica* UTS, which reduced surface tension, emulsification capacity and oil displacement. These properties are indicators of surfactant activity and indicate characteristic parameters of the biosurfactants (Table 4).

The highest antifungal activity of the biosurfactant against the phytopathogenic fungi *Fusarium* sp., *F. oxysporum*, and *A. solani* was with the 1.0% crude extract. Sarwar et al. [32] reported antagonistic activity against the phytopathogens *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Trichoderma atroviride*, and *T. reesei*, of the biosurfactant Surfactin A produced by the *Bacillus* strains NH-100 and NH-217, obtaining 84% inhibition at a concentration of 2000 ppm, this percentage of inhibition of Surfactin A is similar to that produced by the crude extract of the biosurfactant produced by *S. ureilytica* UTS against *F. oxysporum* and *Fusarium* sp., but lower than that of *A. solani*. The highest antifungal activity of the biosurfactant against the phytopathogenic fungi *Fusarium* sp., *F. oxysporum* and *A. solani* was obtained with the 1.0% crude extract. Sarwar et al. [32] reported antagonistic activity against the phytopathogenic fungi *F. oxysporum*, *F. moniliforme*, *F. solani*, *Trichoderma atroviride*, and *T. reesei*, of the biosurfactant Surfactin A produced by *Bacillus* strains NH-100 and NH-217, obtaining 84% inhibition at a concentration of 2000 ppm. This percentage of inhibition of Surfactin A is similar to that produced by the crude extract of the biosurfactant produced by *S. ureilytica* UTS against *F. oxysporum* and *Fusarium* sp., but lower than that of *A. solani*.

It has also been reported that strain *B. mojavensis* A21 produces a biosurfactant of the lipopeptides class, which at a concentration of 3 mg/mL has an antifungal effect against *Fusarium* sp., and inhibits sporulation. This effect of antifungal activity is observed with the crude extract of the biosurfactant of the strain *S. ureilytica* UTS, in which mycelial growth of *F. oxysporum*, *Fusarium* sp. and *A. solani* was evaluated at a concentration of 1.0%. This concentration of the biosurfactant of *S. ureilytica* UTS is higher than that evaluated with the lipopeptide produced by *B. mojavensis* A21 [42]. In strain *B. velenzis* PW192, the production of lipopeptides fengycin A and B was detected. This biosurfactant showed antifungal activity against *C. gloeosporioides* and *C. musae* strains at concentrations of 500 and 1000 μg . The antifungal activity of lipopeptides produced by a marine strain of *B. subtilis* subsp. *spizizenii* MC6B-22 against the phytopathogens *C. gloeosporioides* and *Monilophthora roreri* of tropical crops at a concentration of 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ has also been reported [43]. This fungal activity was also detected in the crude extract of the biosurfactant produced by the strain *S. ureilytica* UTS evaluated in this work [44].

The production of biosurfactants has been reported in species of the genus *Serratia*; As is the case of *S.*

Fig. 2 NMR characterization of fraction 4 obtained from the crude extract produced by *S. ureilytica*: **a** ^{13}C -NMR spectrum (125 MHz) in MeOD- d_4 . **b** ^1H -NMR spectrum (500 MHz) in MeOD- d_4 . **c** The proposed structure corresponds to the *N,N,N*-tris(2-(hexadec-15-enyloxy)ethyl)but-3-en-1-aminium, MW = 912.8 g/mol



marcescences produces serratamolide, a biosurfactant with antifungal activity against pathogenic oomycetes.

S. rubidaea SNAU02 also produces rhamnolipid with antifungal activity against *F. oxysporum* and *C. gloeosporioides* [16, 17]. Granada et al. [45] reported the antifungal activity of serratamolide A, prodigiosin and haterumalide NC against the avocado pathogens *Phytophthora cinnamomi* and *C. gloeosporioides*. The antifungal activity of lipopeptides has been reported in different species of the genus *Bacillus* and *Serratia*. However, in this work, the production of biosurfactant is reported in *S. ureilytica*, a species in which there is no report of production of this metabolite. Furthermore, this biosurfactant exhibits antifungal activity, with the percentage of inhibition of mycelial growth being comparable to that reported for biosurfactant-producing *Bacillus* and *Serratia* species.

Another important group of organisms that attack crops are nematodes, as they damage the roots of plants. The false root-knot nematode *N. aberrans* causes losses in potato (*Solanum tuberosum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), chili (*Capsicum annum*) and bean (*Phaseolus vulgaris*) crops [3, 25]. The crude biosurfactant of the *S. ureilytica* strain caused 92.3% mortality in juveniles (J2). The same effect was observed with other biosurfactant-producing bacteria such as *B. subtilis* HussainT-AMU, where the filtrate obtained from the culture of this strain caused 90% mortality in second-stage juveniles (J2) and reduced the hatching of *Meloidogyne incognita* eggs by 97–99% under in vitro conditions. It also reduced the number of root galls by 58.79% when evaluated in tomato plants [18, 18], this percentage reported in *Bacillus* is similar to that reported in this work for the biosurfactant produced by *S. ureilytica* UTS, which is 92.3% mortality in J2 of the nematode *N. aberrans*. Gómez-Gutiérrez et al. [19] reported that the biosurfactant produced by *Bacillus* strains causes a mortality of 39% in the Juveniles (J2) of *N. aberrans*, this percentage of mortality produced by *Bacillus* strains being lower than the mortality obtained with the biosurfactant produced by *S. ureilytica* UTS. It is important to emphasize that this is the first report on the nematicidal activity of the biosurfactant produced by the *S. ureilytica* UTS strain.

To determine the type of biosurfactant produced by *S. ureilytica* UTS, the crude extract was analyzed by GC-MS, three amino acids, Alanine, N-acetyl-3-phenyl-N-(trifluoroacetyl), DL-Homocystine and L-Valine, N-[2-(chloroimino)-3-methyl-1-oxobutyl], were detected (Table 5). The presence of the fatty acids 4,7-octadecadienoic acid (stearic acid), dodecanoic acid (lauric acid) and hexadecanoic acid (palmitic acid) was also detected (Table 5). This is consistent with the reports of [46], who also detected palmitic acid and oleic acid as part of the characterization of a lipopeptide produced by *Wickerhamomyces anomalus* strain CCMA 0358.

The crude extract was also fractionated by chromatography to elucidate its chemical composition. A fraction with acceptable purity (fraction 4) was obtained, which was analyzed by Mass Spectrophotometry and a fragmentation pattern was obtained, which was confirmed by Nuclear Magnetic Resonance (^1H , ^{13}C , APT, COSY and HSQC) [47]. The evaluation of these spectra and the interpretation of the fragmentation pattern suggest that the signals from both analytical techniques could be N, N, N-tris-(2-(hexadec-15-enoyloxy)-ethyl)-but-3-en-1-aminium, a quaternary ammonium salt derived from the fatty acid stearic acid. Furthermore, these results are consistent with the results of the GC-MS analysis, which also detected stearic acid. Thus, with these results, we can propose that *S. ureilytica* UTS produces a biosurfactant derived from stearic acid and could be a lipopeptide, since the presence of amino acids and fatty acids, which form the structure of these molecules, was also detected. These results of identification of fatty acids and amino acids by GC-MS, MS and NMR correlate with the presence of the genes involved in the synthesis of lipopeptides detected by analysis with the Antimash program in the genome of *S. ureilytica* UTS, where two possible lipopeptides were found, such as rhizomide A/rhizomia B/rhizomide C and Kolossin, which could be produced by this strain.

Conclusion

The production of biosurfactants by *S. ureilytica* UTS was evidenced, the crude BS had antifungal activity against *Fusarium* sp., *F. oxysporum* and *A. solani*, as well as nematicidal activity against J2 of *N. aberrans*. According to the analyzes carried out on the extract and fraction four by GC-MS, MS and NMR, it was found that said BS are derivatives of stearic acid. This biosurfactant can be an alternative for the biocontrol of diseases and pests caused by these phytopathogens.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00284-024-04042-8>.

Acknowledgments Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnología (CONAHCyT) for the scholarship with registration number 825516 to the student Carlos Andrés Zamorano González of the Master's Program in Biotechnology of the CEIB-UAEM.

Declarations

Conflict of interests On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

References

- Palomares-Rius JE, Hasegawa K, Siddique S, Vicente CSL (2021) Editorial: protecting our crops—approaches for plant parasitic nematode control. *Front Plant Sci* 1(12):726057. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.726057>
- Decraemer W, Hunt DJ (2006) Structure and classification. *Plant nematology*. CABI, Wallingford, pp 3–32
- Manzanilla-López RH, Costilla MA, Doucet M, Franco J, Inserra RN, Lehman PS, Evans K (2002) The genus *Nacobbus* Thorne & Allen, 1944 (Nematoda: Pratylenchidae): systematics, distribution, biology and management. *Nematropica* 32:149–228
- Narváez-Montaño MD, Mendoza-López MR, Sánchez-Viveros G, Almaraz-Suarez JJ, Argumedo-Delira R (2023) Actividad inhibitoria de extractos alcohólicos de hongos comestibles contra *Rhizoctonia solani*. *Rev Mex Cienc Agríc* 14(4):615–625. <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i4.1665>
- Hernández-Trejo A, Estrada Drouaillet B, Rodríguez-Herrera R, García Giron JM, Patiño-Arellano SAA, Osorio-Hernández E (2019) Importancia del control biológico de plagas en maíz (*Zea mays* L.). *Rev Mex Cienc Agríc* 10(4):803–813. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i4.1665>
- Martínez Valenzuela C, Romano Casas G, Cuadras Berrelleza AA, Ortega Martínez LD (2019) Plaguicidas, impacto en salud y medio ambiente en sinaloa (México): implicaciones y retos en gobernanza ambiental. *Trajectorias Humanas Trascontinentales*. <https://doi.org/10.25965/trahs.1615>
- Marcelino PR, Gonçalves F, Jimenez IM, Carneiro BC, Santos BB, da Silva SS (2020) Sustainable production of biosurfactants and their applications. In: Avinash PI, Anuj KC, Silvio SS (eds) *Lignocellulosic biorefining technologies*. Wiley, New Jersey, pp 159–183
- Varjani SJ, Upasani VN (2017) Critical review on biosurfactant analysis, purification and characterization using rhamnolipid as a model biosurfactant. *Bioresour Technol* 232:389–397. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.02.047>
- Markande AR, Patel D, Varjani S (2021) A review on biosurfactants: properties, applications and current developments. *Bioresour Technol* 330:124963. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.124963>
- Toral L, Rodríguez M, Béjar V, Sampedro I (2018) Antifungal activity of lipopeptides from *Bacillus* XT1 CECT 8661 against *Botrytis cinerea*. *Front Microbiol* 9:1315. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01>
- Borah SN, Goswami D, Sarma HK, Cameotra SS, Deka S (2016) Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium verticillioides* to control stalk and ear rot disease of maize. *Front Microbiol* 21:1505. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01505>
- Cao X, Ye Y, Li P (2023) Genome sequence resource of *Serratia ureilytica* HNU47: a strain with biocontrol potential against bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Plant Dis* 107(3):919–921. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-22-1339-A>
- Filippidou S, Junier T, Wunderlin T, Kooli WM, Palmieri I, Al-Dourobi A, Molina V, Lienhard R, Spangenberg JE, Johnson SL, Chain PSG, Dorador C, Junier P (2019) Adaptive strategies in a poly-extreme environment: differentiation of vegetative cells in *Serratia ureilytica* and resistance to extreme conditions. *Front Microbiol* 5(10):102. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00102>
- Khanna A, Khanna M, Aggarwal A (2013) *Serratia marcescens*-a rare opportunistic nosocomial pathogen and measures to limit its spread in hospitalized patients. *J Clin Diagn Res* 7(2):243. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5010.2737>
- Clements T, Ndlovu T, Khan S, Khan W (2019) Biosurfactants produced by *Serratia* species: classification, biosynthesis, production and application. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:589–602. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9520-5>
- Strobel GA (2005) Protecting plants from oomycete pathogens by treatment with compositions containing serratamolide and oocydin A from *Serratia marcescens*. U.S. Patent No 6,926,892
- Nalini S, Parthasarathi R (2014) Production and characterization of rhamnolipids produced by *Serratia rubidaea* SNAU02 under solid-state fermentation and its application as biocontrol agent. *Bioresour Technol* 173:231–238. <https://doi.org/10.1016/j.biortech>
- Hussain T, Haris M, Shakeel A, Ahmad G, Ahmad Khan A, Khan MA (2020) Bio-nematicidal activities by culture filtrate of *Bacillus subtilis* HussainT-AMU: new promising biosurfactant bioagent for the management of root galling caused by *Meloidogyne incognita*. *Vegetos* 33:229–238. <https://doi.org/10.1007/s42535-020-00099-5>
- Gómez-Gutiérrez JA, Wong-Villarreal A, Aguilar-Marcelino L, Yañez-Ocampo G, Hernández-Núñez E, Caspeta-Mandujano JM, Gomez-Rodríguez O (2023) *In vitro* nematicidal and acaricidal effect of biosurfactants produced by *Bacillus* against the root-knot nematode *Nacobbus aberrans* and the dust mite *Tyrophagus putrescentiae*. *Braz J Microbiol* 54(2):1127–1136. <https://doi.org/10.1007/s42770-023-00981-9>
- Wong-Villarreal A, Méndez-Santiago EW, Gómez-Rodríguez O, Aguilar-Marcelino L, García DC, García-Maldonado JQ, Hernández-Velázquez VM, Yañez-Ocampo G, Espinosa-Zaragoza S, Ramírez-González SI, Sanzón-Gómez D (2021) Nematicidal activity of the endophyte *Serratia ureilytica* against *Nacobbus aberrans* in chili plants (*Capsicum annum* L.) and identification of genes related to biological control. *Plants* 10(12):2655
- Sanchez-Cruz R, Vázquez IT, Batista-García RA, Méndez-Santiago EW, del Rayo SC, Leija A, Lira-Ruan V, Hernández G, Wong-Villarreal A, Folch-Mallol JL (2019) Isolation and characterization of endophytes from nodules of *Mimosa pudica* with biotechnological potential. *Microbiol Res* 218:76–86. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.09.008>
- Espinosa-Zaragoza S, Domínguez-Liévano A, Gómez-Gutiérrez JA, Wong-Villarreal A, Aguilar-Marcelino L, Cerqueda-García D, Rangel-Zaragoza JL, Sanzón-Gómez D, Mireles-Arriaga AI, Sachman-Ruiz B (2024) *In vitro* Acaricidal activity of *Serratia ureilytica* against the Dust Mite *Tyrophagus Putrescentiae* and identification of genes related to biocontrol. *Curr Microbiol* 81(7):199. <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03728-3>
- Carrillo-Morales M, Wong-Villarreal A, Aguilar-Marcelino L, Castañeda-Ramírez GS, Pineda-Alegria AJ, Hernández-Núñez E (2023) Chemical composition and antifungal and nematicidal activities of the hexanic and methanolic extracts of *Syzygium aromaticum*. *ScienceAsia*. <https://doi.org/10.2306/scienceasia1513-1874.2022.143>
- Vrain TC (1977) A technique for the collection of larvae of *Meloidogyne* spp. and a comparison of eggs and larvae as inocula. *J Nematol* 9:249–251
- Méndez-Santiago EW, Gómez-Rodríguez O, Sánchez-Cruz R, Folch-Mallol JL, Hernández-Velázquez VM, Villar-Luna E, Aguilar-Marcelino L, Wong-Villarreal A (2021) *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematicidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. *Arch Microbiol* 203:549–559. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02051-2>
- Rosas-Galván NS, Martínez-Morales F, Marquina-Bahena S, Tinoco-Valencia R, Serrano-Carreón L, Bertrand B, Trejo-Hernández MR (2018) Improved production, purification, and characterization of biosurfactants produced by *Serratia marcescens* SM3 and its isogenic SMRG-5 strain. *Biotechnol Appl Bio* 65(5):690–700. <https://doi.org/10.1002/bab.1652>

27. Mukherjee S, Das P, Sen R (2006) Towards commercial production of microbial surfactants. *TRENDS in Biotechnol* 24(11):509–515. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.09.005>
28. Phetrong K, Kittikun AH, Maneerat S (2008) Production and characterization of bioemulsifier from a marine bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. anitratus SM7. *Songklanakarin J Sci Technol* 30(3):297–305. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1683-y>
29. García-Reyes S, Yáñez-Ocampo G, Wong-Villarreal A, Rajaretnam RK, Thavasimuthu C, Patiño R, Ortiz-Hernández ML (2018) Partial characterization of a biosurfactant extracted from *Pseudomonas* sp. B0406 that enhances the solubility of pesticides. *Environ Technol* 39(20):2622–2631. <https://doi.org/10.1080/21622515.2017.1363295>
30. Ben Khedher S, Boukedi H, Laarif A, Tounsi S (2020) Biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* V26: a potential biological control approach for sustainable agriculture development. *Org Agri* 10:117–124. <https://doi.org/10.1007/s13165-020-00316-0>
31. Mnif I, Hammami I, Triki MA, Azabou MC, Ellouze-Chaabouni S, Ghribi D (2015) Antifungal efficiency of a lipopeptide biosurfactant derived from *Bacillus subtilis* SPB1 versus the phytopathogenic fungus, *Fusarium solani*. *Environ Sci Pollut Res* 22:18137–18147. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5005-6>
32. Sarwar A, Hassan MN, Imran M, Iqbal M, Majeed S, Brader G, Sessitsch A, Hafeez FY (2018) Biocontrol activity of surfactin A purified from *Bacillus* NH-100 and NH-217 against rice bakanae disease. *Microbiol Res* 209:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.01.006>
33. Hahn M, De Mio L, Kuhn O, Duarte H (2019) Nematophagous mushrooms can be an alternative to control *Meloidogyne javanica*. *Biol Control* 138:104024. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104024>
34. Pineda-Alegría JA, Sánchez-Vázquez JE, Gonzalez-Cortazar M, Zamilpa A, López-Arellano ME, Cuevas-Padilla EJ, Aguilar-Marcelino L (2017) The edible mushroom *Pleurotus djamor* produces metabolites with lethal activity against the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *J Med Food* 20(12):1184–1192. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0031>
35. García-Reyes S, Yáñez-Ocampo G (2016) Microbial biosurfactants: methods for their isolation and characterization. *J Microbiol Biotech Food Sci* 6(1):641–648. <https://doi.org/10.15414/jmbfs.2016.6.1.641-648>
36. Sharma A, Soni J, Kaur G, Kaur J (2014) A study on biosurfactant production in *Lactobacillus* and *Bacillus* sp. *Int J Curr Microbiol App Sci* 3(11):723–733
37. Abbasi H, Hamed MM, Lotfabad TB, Zahiri HS, Sharafi H, Masoomi F, Moosavi Movahedi AA, Ortiz A, Amanlou M, Noghabi KA (2012) Biosurfactant-producing bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* MA01 isolated from spoiled apples: physico-chemical and structural characteristics of isolated biosurfactant. *J Biosci Bioeng* 113(2):211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2011.10.002>
38. Ayed HB, Jemil N, Maalej H, Bayoud A, Hmidet N, Nasri M (2015) Enhancement of solubilization and biodegradation of diesel oil by biosurfactant from *Bacillus amyloliquefaciens* An6. *Int Biodeter Biodegr* 99:8–14. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2014.12.009>
39. Dubey KV, Charde PN, Meshram SU, Shendre LP, Dubey VS, Juwarkar AA (2012) Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanesis* strain-J at extreme environmental conditions. *Bioresour Technol* 126:368–374. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.05.024>
40. Medema MH, Blin K, Cimermancic P, De Jager V, Zakrzewski P, Fischbach MA, Breitling R (2011) antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr466>
41. Team RC (2021) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. Accessed 27 May 2024
42. Ayed HB, Azabou MC, Hmidet N, Triki MA, Nasri M (2019) Economic production and biocontrol efficiency of lipopeptide biosurfactants from *Bacillus mojavensis* A21. *Biodegradation* 30:273–286. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9864-7>
43. Guillén-Navarro K, López-Gutiérrez T, García-Fajardo V, Gómez-Cornelio S, Zarza E, De la Rosa-García S, Chan-Bacab M (2023) Broad-spectrum antifungal, biosurfactants and bioemulsifier activity of *Bacillus subtilis* subsp. spizizenii-a potential biocontrol and bioremediation agent in agriculture. *Plants* 12:1374. <https://doi.org/10.3390/plants12061374>
44. Jumpathong W, Intra B, Euanorasetr J, Wanapaisan P (2022) Biosurfactant-producing *Bacillus velezensis* PW192 as an antifungal biocontrol agent against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae*. *Microorganisms* 10(5):1017. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10051017>
45. Granada SD, Ramírez-Restrepo S, López-Luján L, Peláez-Jaramillo CA, Bedoya-Pérez JC (2018) Screening of a biological control bacterium to fight avocado diseases: from agroecosystem to bioreactor. *Biocatal Agric Biotechnol* 14:109–115. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.02.005>
46. de Andrade Teixeira Fernandes ND, Simões LA, Dos Reis GM, Souza KT, Schwan RF, Dias DR (2020) Eco-friendly biosurfactant from *Wickerhamomyces anomalus* CCMA 0358 as larvicidal and antimicrobial. *Microbiol Res* 241:126571. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126571>
47. Méndez-Santiago EW, Gómez-Rodríguez O, Sánchez-Cruz R, Folch-Mallol JL, Hernández-Velázquez VM, Villar-Luna E, Aguilar-Marcelino L, Wong-Villarreal A (2020) *Serratia* sp., an endophyte of *Mimosa pudica* nodules with nematocidal, antifungal activity and growth-promoting characteristics. *Arch Microbiol* 203(2):549–559. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02051-2>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

Maestría en Biotecnología

Cuernavaca, Morelos, 22 de enero del 2024.

VOTOS APROBATORIOS DE TESIS

Los integrantes de la Comisión Revisora de la tesis titulada: **“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL BIOSURFACTANTE PRODUCIDO POR *SERRATIA UREILYTICA* UTS”**, que presenta el **C. Carlos Andres Zamorano Gonzalez**, del Programa de Posgrado Maestría en Biotecnología, bajo la dirección del DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO y codirección del DR. ARNOLDO WONG VILLAREAL, han determinado que el documento reúne los requisitos académicos para su defensa oral en el examen de grado, por lo que emiten su **VOTO APROBATORIO**.

Comisión Revisora de tesis (firma electrónica)

DR. JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO (director de tesis, CEIB UAEM)

DR. ARNOLDO WONG VILLARREAL (codirector de tesis, UT SELVA)

DR. RAMON SUAREZ RODRIGUEZ (CEIB UAEM)

DRA. LILIANA AGUILAR MARCELINO (CENID INIFAP)

DR. VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ (CEIB UAEM)





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2025-02-24 10:09:23 | FIRMANTE

EzlkjasHPf3HIQCYSYiuZhCy5VtMRb1Md/Qa68TQSiFEGaS96MeX4bsC6q4eqeG2jAohwuu+9E4WmvoBUA/sWj6mcJoRLOhp1FT93qzIIYPoRIFEj5amcTjm2QppqUsto7sRKND2aB77RKOzkTzK2LtuZzMras+QkOVj5asorGwiuwucmxcFYx7NGygxcRNTWAK8VwF1YL+ISuSxRj3Nm3F8YUyEbEwWjkyz5WYs4caM9drS1LLKYz7xiurnH1HSeSc7sW118BK0rNH92sFPHTBa4qR3xkj+R0G6Ef9wCL6bSpCtMzV3osQh9CU8H+f5itC+jsC7IJ3bAw6lhAVElw==

VICTOR MANUEL HERNANDEZ VELAZQUEZ | Fecha:2025-02-24 10:39:52 | FIRMANTE

jinVSQVHJdBjEeSammNDnB2x8UKU6SL2dC19+3nLGlRyXAgMAWPmfAF7QP6S3wnirW1ttlkMeGO6+12DEEnd2zzohGqaNv3QXmu+qrmQPbOhsNg4gieeKDfAzEW1X+1tkpoon1S3jlfJAaVA+vhGna9lwNwQ7yhG3NpbwzbzrTlghpQfGGE6/mKFQGRBKBTJcRLHY7qn+hpRg1Mw2ruw+Q8bpyyYbZ7Ktlfzj0Spcm3y/K863TctT1ZUXBVneNwh4vWdzWuqc9GiVbOp7oygP4MK4heJ1F3yEsErhtZXu1GhgeoGmEg6GKXLxC19m/CtsKrlj/RrMvuXJKU4N7g==

ARNOLDO WONG VILLARREAL | Fecha:2025-02-24 10:47:26 | FIRMANTE

S3si0eNPHw6l248yazDJ5oaS1dheuDzJp0kt0JTbx1rvXydG+w9iEPgtUL+3EqaqHRmUxkWunDD8rnLHUZQWUHj6WOuu6oovZL4n7mJ0x9JG0c3juxvPY2Rp+JMipFnXgm07rgaVFZJJoF6J9VK1af5H7H6a9tBu1w/mJmPmIR856P4J1eXg/W64Bv2PPgaycl6a/FxYzHZiHALRT6oquctkt0FEmLVUY9smkb93O2P9kGX9/6SoDI7e/ZEZM9InGTT5iR66VuV7y5m28e2AHITRo63G/SWKuXtDa/+Hmt5WL6kSgt85o7oJbVljHje4WHxKSA7bepN03NelQKilg==

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2025-02-24 11:16:54 | FIRMANTE

aE//+KOR+2zaFsYslw+IGil5UFiKYplDf94oP4JD+ScWbJXBhfEfHJZ6npR+oe3OrSH9X7BWCQuqH0TqcxfoUvGwSUpriw/4IFjn9OZle3ap/xM6cPSfkj4Nuaprs8eoiYdksv4NLJENK2CdjLDOLR+jf1XhfbwimjGv196oJmvbs3ODsXRxG0/dwmhejTdexOGM95n1MP9IElMr5dVg3SER4loBasgrtvBcmhUjqRL7dcZ12GheEqJ4dzgh5TRbSD8m953qnpkig8UUXTU+Q0SXOrY1Dx5Wo+5RDqH5T68jz+nqsfMa40lyDLzrLjb64KrgqherOLTNamc3rd0yw==

LILIANA AGUILAR MARCELINO | Fecha:2025-02-24 14:18:18 | FIRMANTE

a6f9d2uKA2Qd4TYhaBQJCGNk8i5gC0HbFX02V31KXqmYjWbfpgrhYjYpcwviyfCOKiRZ9ZthsV6NaTzDx7OCdxlPcsJVipItARxKk2jRP0vDaPFNVWwMheLYTAYB4YcD5tvx0HXySHtq0XhdHuXUx3hByHRXmb0Cx1mAgMkIXDYMtTjArAQGqLunmRgEPjx/Umn+wJ7exCHL2vBLriDW156iRtNWU/0DR8OIoqqD9M6SxaTbo4Yb99KmlBpr3uU7u2aFtvRi4J0drM3KMOOFx90G7UR8t/Xnx9ZWwM9/qCfie1UOf4pQZ1NDiUmEVY6rW7mngHgu/mPkWxAnzm+A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



p5zx7Swhb

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/j3LmP1Qvtcli4osM3Brj2YL7BHftwzf>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029