

# IBCIENCIAS IBCIENCIAS IBCIENCIAS



# IBCIENCIAS



[www.biociencias.unach.mx/ibciencias](http://www.biociencias.unach.mx/ibciencias)



Volumen 3 · Número 1 · Junio · 2020

Revista científica electrónica

*Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas, México*



Volumen 3 · Número 1 · Junio · 2020

[www.biociencias.unach.mx/ibciencias](http://www.biociencias.unach.mx/ibciencias)

IBCIENCIAS, volumen 3, número 1, Enero-Junio 2020, es una revista científica digital de publicación semestral editada por la Universidad Autónoma de Chiapas, a través del Instituto de Biociencias, Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México. Tel. (962) 64 2 7972, [www.biociencias.unach.mx/ibciencias](http://www.biociencias.unach.mx/ibciencias), [ibciencias.revista@gmail.com](mailto:ibciencias.revista@gmail.com). Editor responsable: Dr. Alfredo Vázquez Ovando. Reserva de Derechos al Uso Exclusivo No. 04-2019-053014202300-01, ISSN en trámite, ambos otorgados por el Instituto Nacional del Derecho de Autor. Responsable de la última actualización de este número Dr. Alfredo Vázquez Ovando; Boulevard Príncipe Akishino sin número, Col. Solidaridad 2000, Tapachula, C.P. 30798, Chiapas, México.

# CONTENIDO

---

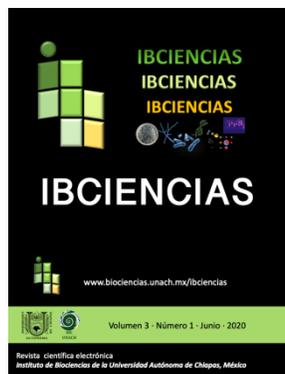
Junio de 2020 / Vol 3 / Num 1

- 1-6** **Influencia de los parámetros del biorreactor de inmersión temporal sobre el desarrollo de plántulas de *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae).** Jorge Ochoa-Bonilla, Sonia Ruiz-González, Gemelli López-Martínez, Isidro Ovando-Medina.
- 7-16** **Detoxificación de la torta residual de *Jatropha curcas* L. mediante hongos endófitos.** Teresa de Jesús Flores-Chilel, María de Lourdes Adriano-Anaya, Isidro Ovando-Medina, Sonia Ruiz-González.
- 17-23** **Aves del Jardín Botánico Rey Nezahualcóyotl de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, México.** Achtli Avilés-Piña, Daniel Alexander Carrillo-Martínez, Manuel Higinio Sandoval-Ortega, Moisés Arellano-Delgado, Hugo Noé Araiza-Arvilla.
- 24-31** **Optimización de la viabilidad de bacterias ácido lácticas incorporadas en películas de quitosán.** Zurisadai Maldonado-Alvarado, Alfredo Vázquez-Ovando, Gamaliel Velázquez-Ovalle, Rito Coronel-Niño.
- 32-36** **Aislamiento de bacterias antagónicas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y promotores de crecimiento en banano (*Musa AAA*).** Luis Ángel Cruz-Ortiz, Mariana Flores-Méndez, Kimberly Rosa Escobar-Ventura, Benjamín Moreno-Castillo.



Volumen 3 · Número 1 · Junio · 2020

[www.biociencias.unach.mx/ibciencias](http://www.biociencias.unach.mx/ibciencias)



## Influencia de los parámetros del biorreactor de inmersión temporal sobre el desarrollo de plántulas de *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae)

Jorge Ochoa Bonilla, Sonia Ruiz González, Gemelli López Martínez, Isidro Ovando Medina\*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

### Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto de 3 frecuencias (8, 12 y 24 h) y 3 tiempos de inmersión (7, 14 y 21 min) en un biorreactor de inmersión temporal (BIT®) y un sistema convencional (medio semisólido) sobre la morfología de plántulas de *Guarianthe skinneri*, utilizando 10 plántulas por tratamiento con una altura de 4 a 6 cm, 2 hojas y sin raíces. Se obtuvo mayor altura con la frecuencia y tiempo de inmersión de 24 h y 21 min respectivamente, mayor formación de brotes con la frecuencia y tiempo de inmersión de 12 h y 21 min respectivamente y mayor formación de cutícula con la frecuencia y tiempo de inmersión de 8 h y 14 min respectivamente. El biorreactor de inmersión temporal fue el mejor sistema de micropropagación para el desarrollo de plántulas de *G. skinneri* con mayor altura, tasa de multiplicación y formación de cutícula que un sistema semisólido.

## Influence of the parameters of the temporary immersion bioreactor on the development of *Guarianthe skinneri* plantlets

### Abstract

In this work we evaluated the effect of three frequencies (8, 12 and 24 h) and three times of immersion (7, 14 and 21 min) in a temporary immersion bioreactor (BIT®) on the plantlet morphology of *Guarianthe skinneri* and was compared to conventional system (semi-solid medium). Ten plantlets of 4 to 6 cm height, with two leaves and without roots by treatment were used. Higher plantlet height was obtained with the frequency and time of immersion of 24 h and 21 min, respectively. More shoots were formed with the frequency and immersion time of 12 h and 21 min, respectively, and greater cuticle thickness was obtained with the frequency and immersion time of 8 h and 14 min, respectively. The BIT® was the best micropropagation system for the development of *G. skinneri* plantlets with higher height, multiplication rate and cuticle formation compared with a semi-solid system.

### Palabras clave:

Frecuencia de inmersión  
Micropropagación  
Tiempo de inmersión  
Tasa de multiplicación

### Keywords:

Immersion frequency  
Immersion time  
Micropropagation  
Multiplication rate

### \* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,  
Universidad Autónoma de  
Chiapas.  
Boulevard Príncipe Akishino  
sin número. Colonia  
Solidaridad 2000, CP.  
30798.  
Tapachula, Chiapas, México.  
Teléfono: + 52 9626427972.  
Correo-electrónico:  
isidro.ovando@unach.mx

## 1. Introducción

*Guarianthe skinneri* es una planta epífita perteneciente a la familia Orchidaceae, es nativa de la región mesoamericana con distribución natural desde México a Panamá (Coello et al., 2010; Coutiño-Cortes et al., 2018). El uso ornamental de esta orquídea ha producido un aumento en su demanda (Coello et al., 2010), siendo objeto de extracción y comercio ilícito; por esta razón es catalogada como “amenazada”, bajo la sinonimia *Cattleya skinneri*, dentro de la norma oficial mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (Coello et al., 2010; Coutiño-Cortes et al., 2018). Una de las causas de que *G. skinneri* se encuentre en dicha categoría de amenaza es su baja tasa de reproducción natural, ya sea por medios vegetativos o por germinación de las semillas.

De forma natural, las semillas de las orquídeas requieren de un hongo micorrízico para germinar, debido a que carecen de reservas y cotiledones funcionales, con lo cual, tan solo de 2 a 5% de germinación para los miles de semillas que se producen en cada fruto (Pineda, 2018).

Para aumentar el porcentaje de germinación de las semillas se ha utilizado la micropropagación debido a que utiliza medios de cultivo que proveen los nutrientes necesarios de manera asimbiótica, logrando aumentar el porcentaje de germinación hasta 80% (Menchaca-García et al., 2012). Sin embargo, cuando las plántulas son llevadas a condiciones *ex vitro* en la etapa de aclimatación, disminuyen su desarrollo y rendimiento fotosintético debido a los cambios repentinos en las condiciones ambientales, causando altos porcentajes de plántulas perdidas o dañadas (Francisco-Nava et al., 2011). Lo anterior se debe a que durante el cultivo *in vitro* las plántulas permanecen en recipientes cerrados, con humedad relativa cercana al 100%, ocasionando que las hojas no se desarrollen correctamente y que los estomas no sean funcionales (Orellano et al., 2017). Bajo estas condiciones es fácil que una planta se deshidrate y muera al salir del recipiente. Para evitar lo anterior, se han desarrollado procesos de cultivo donde la plántula no está en contacto permanente con el medio de cultivo. Existen diferentes métodos disponibles, entre los que destacan el cultivo biorreactor de inmersión temporal (BIT®).

El sistema de inmersión temporal (SIT) es aquel en el que se realizan inmersiones periódicas de los explantes en el medio de cultivo, lo que permite el intercambio gaseoso dentro del recipiente (Zúñiga et al., 2009). Los SIT pueden ser semi-automatizados o automatizados, basados en frecuencias y tiempos de inmersión de las plantas en medio de cultivo líquido, seguido del drenado del mismo, logrando que las plantas se encuentren en un ambiente renovado de gases y eviten el estrés por oxidación y vitrificación (Orellano et al., 2017).

El BIT® o recipientes gemelos de inmersión temporal, es un sistema que consiste en dos recipientes conectados entre sí mediante tubos de silicona. Uno se utiliza como contenedor del material vegetal y el otro como contenedor de medio de cultivo. Para la ventilación se conecta un filtro hidrofóbico de aire de 0.22  $\mu\text{m}$  esterilizable en cada recipiente. Las

inmersiones temporales se regulan mediante un programa computarizado conectado a válvulas solenoides. Al abrir una de las válvulas el medio de cultivo fluye desde el recipiente que lo contiene al recipiente que contiene el material vegetal, al abrirla nuevamente, el medio de cultivo fluye de regreso a su recipiente. Mediante este sistema, el material vegetal es inmerso en medio de cultivo por un tiempo definido, permitiendo la absorción de nutrientes en toda la superficie del material vegetal. La renovación del ambiente gaseoso en el recipiente del material vegetal se lleva a cabo cuando el medio de cultivo fluye de regreso al recipiente que lo contiene (Vilchez y Albany, 2014).

En función de lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar la influencia de los parámetros del biorreactor de inmersión temporal sobre el desarrollo de plántulas de *G. skinneri*.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Material vegetal

Se utilizaron plántulas de *G. skinneri* cultivadas *in vitro* mediante organogénesis, proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Biociencias de la Universidad Autónoma de Chiapas, ubicado en el municipio de Tapachula, Chiapas, México. Las *in vitro* plantas fueron subcultivadas en frascos de vidrio de 250 mL con 25 mL de medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin suplementos hormonales. Para llevar a cabo los experimentos en biorreactor de inmersión temporal (BIT®) se utilizaron plántulas de 4 a 6 cm de altura, con dos hojas y sin raíces.

### 2.2. Biorreactor de inmersión temporal

Los BIT® se conformaron por dos frascos de vidrio de 400 mL, el primero contenía 250 mL de medio de cultivo MS y el segundo frasco 10 vitroplantas, sin ningún tipo de soporte. Los filtros consistieron en frascos de vidrio empacados con algodón quirúrgico que contenían dos tubos de cobre de 6.35 mm de diámetro interno, el primero de 13 cm de altura se utilizó para conducir el aire a la parte inferior del frasco el segundo de 5 cm se utilizó para la salida de aire. Los frascos de los BIT® y los filtros se sellaron con tapones de goma número 11 y número 10, respectivamente.

La conexión de los frascos fue mediante mangueras SURTEK® de PVC de 6.35 mm de diámetro interno conectados con conectores de cobre. El medio MS fluyó de un frasco a otro mediante la presión que se ejerció con una bomba de aire (SAP-300 SUNNY®) conectada al filtro de aire del frasco con medio MS. Para regresar el medio de cultivo se invirtió el flujo de aire (Figura 1).

### 2.3. Frecuencia y tiempo de inmersión

Con la finalidad de determinar la influencia de la frecuencia y tiempo de inmersión sobre el crecimiento de *G. skinneri* en los BIT®, se diseñó un experimento factorial de dos factores y tres niveles, obteniendo un total de nueve tratamientos. Se

utilizó un tratamiento adicional con medio semisólido con fines comparativos (Cuadro 1).



Figura 1. Biorreactores de inmersión temporal.

**Cuadro 1. Tratamientos obtenidos del diseño factorial.**

Tratamientos	Frecuencia de inmersión (h)	Tiempo de Inmersión (min)
1	24	7
2	24	14
3	24	21
4	12	7
5	12	14
6	12	21
7	8	7
8	8	14
9	8	21
10	Semisólido	Semisólido

**2.4. Evaluación de variables morfológicas**

Se evaluaron variables morfológicas sobre el crecimiento de plántulas de *G. skinneri*. Las variables consistieron en: altura de la plántula (cm), número de brotes (núm.), tamaño de brotes (mm), número de raíces (núm.), tamaño de raíces (mm), número de hojas nuevas (núm.) peso fresco (g), peso seco (mg) y contenido de humedad (%). Las mediciones para la variable humedad se hicieron siguiendo la norma oficial mexicana NMXF083-1986. Adicionalmente se evaluó semanalmente la posible presencia de contaminación y oxidación, basado en observación visual con los siguientes porcentajes: 0, 25, 50 y 100%.

**2.5. Evaluación de la cutícula**

Con la finalidad de observar el efecto de los tratamientos sobre el grosor de la cutícula de *G. skinneri* se realizaron cortes histológicos de las hojas siguiendo las técnicas de preparación y corte en micrótopo para especies vegetales (Adriano-Anaya et al., 2014), modificando los tiempos en la deshidratación y en la inclusión de parafina. La fijación e infiltración se realizó con formaldehído: alcohol etílico: agua (5:3:1:1) por 72 h. Posteriormente, las hojas se deshidrataron 2 h en una serie de soluciones de alcohol etílico de 10, 25,

50, 75 y 96 °Gay-Lussac. Las hojas se sumergieron en una serie de soluciones de xilol diluido en alcohol etílico en concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 %, con un tiempo de sumersión de 1.5 h por concentración. Posteriormente se infiltró parafina histológica (Paraplast®) en los tejidos mediante inmersión por 24 h a 60 °C.

Se realizaron cortes histológicos de 10 µm en un micrótopo Microm HM 315® y posteriormente se realizó la tinción con safranina durante 1 min. Las observaciones y registro de las microfotografías se realizaron con un microscopio Axiolab® (CarlZeiss®) acoplado a un analizador de imágenes AxioVisionLE® (CarlZeiss®).

**2.6. Análisis estadístico**

Para ver diferencias estadísticas entre los tratamientos se realizó un análisis de varianzas (ANOVA), donde se encontraron diferencias estadísticas se realizó una prueba de comparación de medias (Tukey  $\alpha=0.05$ ). Los datos fueron procesados con el programa estadístico XL-STAT® ver. 2013.

**3. Resultados y Discusión**

**3.1. Frecuencia y tiempo de inmersión sobre el desarrollo de *G. skinneri***

El análisis de la variable altura de las plántulas reveló diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $P<0.05$ ). En el Cuadro 2 se muestran todos los tratamientos, se observó que el tratamiento de 24 h y 21 min de tiempo de inmersión presentó el valor más alto para la variable altura de las plántulas (6.9 cm). Se encontraron diferencias estadísticas en el medio semisólido, el cual presentó los valores más bajos en la altura de las plántulas (5.2 cm, Figura 2), y en los tratamientos donde la frecuencia de inmersión fue de 8 h (Cuadro 2). Para la variable número de brotes el análisis reveló diferencias estadísticas en los tratamientos ( $P<0.05$ ). En el Cuadro 2. El tratamiento con mayor formación de brotes (Figura 2) fue el de 12 y 24 h con 21 min de tiempo de inmersión.



Figura 2. Plántulas de *G. skinneri* obtenidas de un biorreactor de inmersión temporal BIT® (a) y sistema convencional semisólido (b) a los 21 días de cultivo.

Tratamiento	Frecuencia de inmersión (h)	Tiempo de inmersión (min)	Altura (cm)	Brotos (núm.)
1	24	7	6.7ab	1.2ab
2	24	14	6.5ab	0.7ab
3	24	21	<b>6.9a</b>	<b>1.8ab</b>
4	12	7	6.0ab	1.4ab
5	12	14	6.4ab	1.0ab
6	12	21	6.3ab	1.8a
7	8	7	5.4b	0.9ab
8	8	14	5.8ab	1.5ab
9	8	21	5.5b	0.6b
10	Semisólido	Semisólido	5.2b	0.4b

Para todas las variables presentadas en el Cuadro 3, no existió diferencias estadísticas entre los tratamientos ( $P > 0.05$ ).

Nuestros resultados fueron similares a lo reportado por Aguilar-Hernández et al. (2013) quienes evaluando sistemas de inmersión temporal obtuvieron mayor longitud de plántulas de *Gmelina arborea* Roxb después de 30 días de cultivo con una frecuencia de inmersión de 24 h y un tiempo

de inmersión de 1 min. Así mismo, encontraron que el tratamiento en cultivo semisólido fue que presentó los valores más bajos para esta variable. De igual forma, Castaños-Flores et al. (2017) observaron que utilizando un BIT® en semillas de *Vanilla planifolia* Jacks, obtuvo una altura de 4.10 cm y de 2.10 cm en plántulas cultivadas con medio semisólido a los 30 días de cultivo.

F.I (h)	T.I (min)	T.B (mm)	Raíces (núm.)	T.R (mm)	Hojas (núm.)	Peso Fresco (g)	Peso seco (mg)	Humedad (%)
24	7	0.56a	0.40a	0.47a	0.77a	0.15a	0.01a	92.12a
24	14	0.42a	0.52a	0.49a	0.66a	0.12a	0.01a	93.23a
24	21	0.57a	0.43a	0.23a	0.77a	0.14a	0.01a	91.39a
12	7	0.60a	0.97a	0.39a	0.78a	0.16a	0.01a	89.81a
12	14	0.72a	0.47a	0.32a	0.80a	0.13a	0.01a	91.38a
12	21	0.45a	1.14a	0.37a	0.79a	0.15a	0.01a	92.58a
8	7	0.43a	0.28a	0.23a	0.35a	0.10a	0.01a	90.13a
8	14	0.54a	0.80a	0.34a	0.65a	0.12a	0.02a	85.58a
8	21	0.47a	0.79a	0.35a	0.53a	0.10a	0.01a	89.88a
Semisólido	Semisólido	0.21a	1.29a	0.31a	0.29a	0.17a	0.02a	86.29a

Este resultado posiblemente se debe a que en los sistemas BIT®, las plántulas se encuentran en contacto intermitente con el medio de cultivo reduciendo el nivel de toxinas presentes, ya que se mantienen limpias de sus propios exudados, lo cuales pueden perjudicar su crecimiento, al igual de que existe una renovación constante de atmósfera y una alta tasa de aireación dentro de los sistemas, lo que provoca que no exista acumulación de gases tóxicos como el etileno (Etienne y Berthouly, 2002). Uno de los efectos negativos del etileno *in vitro* es la estimulación de la generación de fenoles que al oxidarse causan oscurecimiento de los tejidos (Biddington, 1992).

Por otro lado, aunque no hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos evaluados con sistemas BIT®, la diferencia existió cuando se comparó con el medio semisólido. Este resultado es congruente con los reportes de muchos estudios. Aguilar-Hernández et al. (2013) obtuvieron mayor coeficiente de multiplicación de *Gmelina arborea* Roxb a los 30 días de cultivo utilizando un SIT (5.0) en comparación a las cultivadas en un medio semisólido (2.35). Igualmente, Vilchez y Albany (2014) obtuvieron mayor formación de

brotos de *Psidium guajava* L. en BIT® (2.17) que en un cultivo semisólido (1.78). Del mismo modo, Castaños-Flores et al. (2017) observaron que a los 30 días de cultivo se formó mayor número de brotes en un BIT® (2.23) respecto a un cultivo semisólido (2.04).

Este comportamiento puede deberse a la aireación constante que existe dentro de los sistemas BIT®, lo cual produce una disminución y ruptura de la dominancia apical debido a que la producción de auxinas en el meristemo apical se ve interrumpida, con lo cual las yemas axilares de las plántulas empiezan a desarrollarse, logrando que se vea favorecida una mayor formación de brotes y aumente el coeficiente de multiplicación (De Feria et al., 2003), de igual manera puede deberse a que la auxina es fotosensible, con lo cual, en el periodo de luz, exista una fotodegradación de la auxina, disminuyendo la concentración de la auxina (Erst et al., 2018). Lorenzo et al. (1998) mencionan que cuando las plántulas tienen mayor área de contacto con el medio, existe mayor disponibilidad de nutrientes, lo que provoca un aumento en la multiplicación de brotes y rápido crecimiento de las plantas (Levin et al., 1996).

Que el medio semisólido haya sido menos eficiente quizás se deba a que a este se le agrega un agente gelificante, haciendo que el explante se mantenga estático sobre el medio donde se lleva a cabo la absorción de nutrimentos (George et al., 2008; Lorenzo et al., 1998). Además de que las plántulas se encuentran en recipientes de cultivo cerrados, esto provoca como consecuencia también, una disminución en la turbulencia del aire, lo que conlleva a un aumento en las capas límite de las hojas y limita la entrada de CO<sub>2</sub> (Pospíšilová et al., 1999) no obstante, en el cultivo *in vitro* las plantas no son totalmente dependientes de CO<sub>2</sub> si no que utilizan el carbono en forma de sacarosa en el medio de cultivo (Dahal y Vanlerbergh, 2018)

Los diferentes parámetros dentro de los SIT pueden tener efectos específicos sobre el desarrollo del material vegetal, la frecuencia y tiempo de inmersión son parámetros decisivos para que exista un efecto positivo en la proliferación de brotes, de igual forma mejora la calidad del material vegetal (Etienne y Berthouly, 2002). Debido a esto, es posible que no se encuentren diferencias estadísticas en variables de respuesta como el tamaño y número de raíces, peso fresco, peso seco y contenido de humedad.

### 3.2. Grosor de la cutícula

Para el grosor de la cutícula a los 21 días de la siembra el análisis arrojó diferencias estadísticas en todos los tratamientos ( $P < 0.05$ ). En el Cuadro 4 se observa que las plántulas de *G. skinneri*, obtenidas del tratamiento con una frecuencia de inmersión de 8 h y un tiempo de inmersión de 14 min, el diámetro del grosor de la cutícula fue mayor (21.33  $\mu\text{m}$ ). Para esta variable, el tratamiento en medio semisólido de igual forma fue el que presentó el grosor más bajo de la cutícula comparado con todos los tratamientos (9.09  $\mu\text{m}$ ).

**Cuadro 4.** Efecto de la frecuencia y tiempo de inmersión sobre el grosor de la cutícula en las plántulas de *G. skinneri*.

Tratamiento	Frecuencia de inmersión (h)	Tiempo de inmersión (min)	Cutícula ( $\mu\text{m}$ )
1	24	7	16.128d
2	24	14	13.818e
3	24	21	17.641c
4	12	7	17.105cd
5	12	14	10.495f
6	12	21	20.124b
7	8	7	14.683e
8	8	14	<b>21.331a</b>
9	8	21	14.552e
10	Semisólido	Semisólido	9.091g

El mayor grosor de la cutícula se presentó en el tratamiento fue el de 8 h y 14 min de tiempo de inmersión temporal, este resultado puede deberse a una mayor actividad fotosintética en las plántulas de *G. skinneri* en los BIT®. La biosíntesis de cutícula se lleva a cabo en tres etapas: síntesis de *novo* de ácidos grasos, elongación de los ácidos grasos y transporte de monómeros hacia el exterior de la pared celular (Tafolla-Arellano et al., 2013). Siendo la síntesis de *novo* de ácidos

grasos uno de los aspectos que pueden inducir a un mayor grosor de cutícula, ya que la síntesis de los ácidos grasos que confirman la cutina se lleva a cabo en los cloroplastos (Byers y Gong, 2007). Las plantas *ex vitro* con cutículas gruesas tienen mayor posibilidad de adaptación ya que regulan la transpiración (Lakshanthi y Seran, 2019). Así mismo, Roels et al. (2006) y Vilchez y Albany. (2014) mencionan que la renovación del ambiente del recipiente que contiene el medio de cultivo, elimina compuestos volátiles como el etileno, promoviendo la recirculación de CO<sub>2</sub> necesaria para la fotosíntesis, mejorando el metabolismo del carbono del carbono en las hojas. Además, Muñiz (2018) menciona que las condiciones de renovación periódica de la atmósfera interna del recipiente de cultivo logran en las plantas cultivadas una mejor relación fotosintética. Georgiev et al. (2014) reportan que los altos niveles de CO<sub>2</sub> pueden tener efectos positivos en la actividad fotosintética. Del mismo modo Roels et al. (2006) obtuvieron actividad fotosintética en las plántulas de (*Musa* AAB) cultivadas en BIT® que en un cultivo en medio semisólido que no tienen actividad fotosintética, debido a la renovación del oxígeno del BIT® produciendo que las plántulas realicen dicha actividad fotosintética.

### 4. Conclusión

El uso del sistema BIT® en la micropropagación de plántulas de *G. skinneri* mejoró su desarrollo en altura, número de brotes nuevos y mayor grosor de cutícula en comparación con el medio convencional semisólido, sin embargo, no se apreciaron diferencias marcadas entre los tiempos y frecuencias de inmersión, excepto para la variable grosor de cutícula, donde el tratamiento de inmersión cada 8 horas durante 14 minutos tuvo valores significativamente mayores.

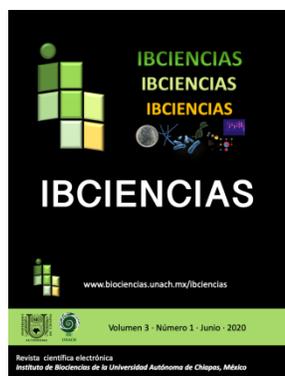
### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Referencias

- Adriano-Anaya ML, Gómez-Pérez JA, Ruiz-González S, Vázquez-Ovando JA, Salvador-Figueroa M, Ovando-Medina I. 2014. Oleosomas de semillas de *Jatropha curcas* L. como estimadores de diversidad en poblaciones del Sur de México. *Grasas y Aceites* 65(3): e031.
- Aguilar-Hernández A, Vargas-Rojas A, Hine A, Daquinta M. 2013. Multiplicación *in vitro* de *Gmelina arborea* Roxb en Sistemas de Inmersión Temporal. *Biocología Vegetal* 13(3): 153-159.
- Biddington NL. 1992. The influence of ethylene in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation* 11: 173-187.
- Byers DM, Gong H. 2007. Acyl carrier protein: structure-function relationships in a conserved multifunctional protein family. *Review/Synthesis. Biochemistry and Cell Biology* 85: 649-662.
- Castaños-Flores O, Cuéllar-Zometa F, Monde de Godoy ME, Gámez-Pastrana MR, Gonzáles-Arno MT, Guevara-Valencia M, Aguilar-Rivera N. 2017. Germinación *in*

- in vitro* de senekas de *Vanilla planifolia* Jacks y comparación de métodos de micropropagación. Avances en Investigación Agropecuaria 21(2): 69-83.
- Coello Y, Miceli C, Orantes C, Dendooven L, Gutiérrez F. 2010. Plant growth regulators optimization for *in vitro* cultivation of the orchid *Guarianthe skinneri* (Bateman) Dressier & W.E. Higgins. Gayana Botanica 67(19): 19-26.
- Coutiño-Cortes AG, Bertolini V, Morales FA, Valle-Mora J, Iracheta-Donjuan L, García-Bautista M, Ruiz-Montoya L. 2018. El uso ornamental de *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae), en Chiapas y Guatemala, determina parcialmente su diversidad y estructura genética. Acta Botanica Mexicana: 124: 35-48.
- Dahal K, Vanlerberghe GC. 2018. Growth at elevated CO<sub>2</sub> requires acclimation of the respiratory chain support photosynthesis. Plant Physiology 178: 82-100.
- De Feria M, Chávez M, Quiala E, Jiménez E. 2003. Efecto de la densidad de inóculo y la frecuencia de inmersión en la propagación *in vitro* de *Psidium guajava* cv. enana roja en Sistemas de Inmersión Temporal. Biotecnología Vegetal 3(3): 149-154.
- Erst A, Gorbunov A, Erst AS. 2018. Effect of concentration, method of auxin application and cultivation conditions on *in vitro* rooting of bog blueberry (*Vaccinium uliginosum* L.). Journal of Berry Research 8: 41-53.
- Etienne H, Berthouly M. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 215-231.
- Francisco-Nava JJ, Ruperto-Jiménez A, Antonia De Jesús-Sánchez A, Arenas-Ocampo ML, Ventura-Zapata E, Evangelista-Lozano S. 2011. Estudio de la morfología y aclimatación de plantas de *Laelia eyermaniana* RBCHB. f. generadas *in vitro*. Polibotánica 32: 107-117.
- George EF, Hall MA, Klerk GD. 2008. Planta propagation by tissue culture. 3rd. Edition. Springer. Pp. 19-41.
- Georgiev V, Schumann A, Pavlov A, Bley T. 2014. Temporary immersion system in plant biotechnology. Engineering in Life Sciences 1: 2-47.
- Lakshanthi JMT, Seran TH. 2019. Survival rate and growth performance of *in vitro* raised plantlets of orchid (*Dendrobium* sp.) in different hardening substrates. International Journal of Advanced Research and Review 4(3): 1-9.
- Levin R, Stav R, Alper Y, Watad AA. 1996. *In vitro* multiplication in liquid culture of *Syngonum* contaminated with *Bacillus* spp. and *Rathayibacter tritici*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 45: 277-280.
- Lorenzo JC, Gonzáles BL, Escalona M, Teisson C, Espinosa P, Borroto C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 54: 197-200.
- Menchaca-García RA, Lozano-Rodríguez MA, Sánchez-Morales L. 2012. Estrategias para el aprovechamiento sustentable de las orquídeas de México. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 3(13): 9-16.
- Muñiz R. 2018. La propagación *in vitro* de plantas con Sistemas de Inmersión Temporal. Una tecnología apropiada para la agricultura sustentable. Revista Tekhné 21(3): 43-50.
- Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.
- NMX-F-083-1996. Alimentos. Determinación de humedad en productos alimenticios.
- Orellano J, Dellagiovanna A, Imanishi L, Mazzone V, Faedo NE. 2017. Sistema de Inmersión Temporal: Automatización de propagación *in vitro* de plantas utilizando herramientas libres. AADECA: 1-6
- Pineda J. 2018. Determinación de las condiciones de encapsulamiento que maximicen la germinación de *Guarianthe skinneri* (Orchidaceae). Tesis de licenciatura en Ingeniero Biotecnólogo. Instituto de Biociencias Universidad Autónoma de Chiapas, México. 12-19 Pp.
- Pospišilová J, Tichá I, Kadleček P, Haisel D, Plzánková Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. Biologia Plantarum 42(2): 481-497.
- Roels S, Noceda CM, Escalona M, Sandoval J, Canal MJ, Rodríguez R, Debergh P. 2006. The effect of headspace renewal in a temporary immersion bioreactor on plantain (*Musa AAB*) shoot proliferation and quality. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 84: 155-163.
- Tafolla-Arellano JC, González-León A, Tiznado-Hernández ME, García-Zacarias L, Sañudo-Báez R. 2013. Composición, fisiología y biosíntesis de la cutícula en plantas. Revista Fitotecnica Mexicana 36(1): 3-12.
- Vilchez J, Albany N. 2014. *In vitro* multiplication of *Psidium guajava* L. in temporary immersion systems. Revista Colombiana de Biotecnología 16(2): 96-103.
- Zúñiga M, Paredes MO, Henzi X, Ascencio S, Becerra V, Baasch V. 2009. Sistema de inmersión temporal en especies anuales, frutales y vides. Fundación para la Innovación Agraria: 7-38.



## Detoxificación de la torta residual de *Jatropha curcas* L. mediante hongos endófitos

Teresa de Jesús Flores-Chilel, María de Lourdes Adriano-Anaya, Isidro Ovando-Medina, Sonia Ruiz-González\*

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

### Resumen

En este trabajo se diseñó un proceso de fermentación en estado sólido para la detoxificación de la torta residual de la planta *Jatropha curcas* utilizando hongos endófitos. Para esto, harinas (desgrasadas con hexano) con testa y sin testa se mezclaron (40 g) con  $1 \times 10^9$  esporas de hongo, al 50% de humedad, y se incubaron durante 10 días a 28 °C y 80% de humedad relativa, en un ambiente oscuro. Se siguió un diseño factorial completo  $2^k$  (presencia/ausencia de 4 hongos=16 tratamientos) para cada tipo de pasta residual. Para evaluar la capacidad detoxificante, se hicieron extractos hexánicos y metanólicos de los fermentados, y se realizaron pruebas de letalidad sobre *Artemia salina* calculando las  $CL_{50}$  mediante análisis de regresión. Los fermentados que contuvieron la testa de la semilla mostraron mayor toxicidad ( $CL_{50}=36.1 \pm 2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que aquellos preparados con harina de la almendra sin testa ( $CL_{50}=126.6 \pm 6.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los extractos hexánicos del tratamiento 1 sin testa (control, T1) presentaron alta toxicidad ( $CL_{50}=9.2 \pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) comparados los del tratamiento 11 sin testa (T11: *Penicillium* sp. CDCU-3 y *Nigrospora* sp. CHIC-1) que presentó un fenómeno de detoxificación con  $CL_{50}$  de  $803.7 \pm 50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , es decir, 87 veces menos tóxico que el T1. Además, el T11 presentó más contenido de proteína soluble que el resto de los fermentados ( $F=8.006$ ,  $P<0.001$ ).

### Palabras clave:

$CL_{50}$   
Antinutrientes  
*Artemia salina*  
Ésteres de forbol

### Keywords:

$LC_{50}$   
Antinutrients  
*Artemia salina*  
Phorbol esters

## Detoxification of *Jatropha curcas* L. seed cake using endophytic fungi

### Abstract

In this work, a solid-state fermentation process was designed for the detoxification of the residual cake of the *Jatropha curcas* plant using endophytic fungi. For this, flour (defatted with hexane) with and without seed coat were mixed (40 g) with  $1 \times 10^9$  fungal spores, at 50% humidity, and incubated for 10 days at 28 °C and 80% relative humidity, in a dark environment. A complete  $2^k$  factorial design (presence / absence of 4 fungi=16 treatments) was followed for each type of residual paste. To evaluate the detoxifying capacity, hexane and methanolic extracts were made from the ferments, and lethality tests were performed on *Artemia salina* calculating the  $LC_{50}$  by means of regression analysis. Those ferments that contained the seed coat showed higher toxicity ( $LC_{50}=36.1 \pm 2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) than those prepared with almond flour without seed coat ( $LC_{50}=126.6 \pm 6.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Hexane extracts from treatment 1 without seed coat (control, T1) presented high toxicity ( $LC_{50}=9.2 \pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) compared to treatment 11 without seed coat (T11: *Penicillium* sp. CDCU-3 and *Nigrospora* sp. CHIC-1) which presented a detoxification phenomenon with  $LC_{50}$  of  $803.7 \pm 50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , that is, 87 times less toxic than T1. Furthermore, T11 had more soluble protein content than the rest of the treatments ( $F=8.006$ ,  $P<0.001$ ).

### \* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,  
Universidad Autónoma de  
Chiapas.  
Boulevard Príncipe Akishino  
sin número. Colonia  
Solidaridad 2000, CP. 30798.  
Tapachula, Chiapas, México.  
Teléfono: + 52 9626427972  
ext. 106.  
Correo-electrónico:  
[sony.ruizgonzalez@gmail.com](mailto:sony.ruizgonzalez@gmail.com)

## 1. Introducción

La planta *Jatropha curcas*, que pertenece a la familia Euphorbiaceae se ha caracterizado por ser un nuevo cultivo industrial (Kalam et al., 2012; Lim-Meng-Hon, 2010; Pandey et al., 2012), donde sus semillas son utilizadas como fuente principal de aceites para la producción de biocombustibles (Behera et al., 2010; Dharma et al., 2016). Sin embargo, la naciente industria agroenergética genera una serie de co-productos con bajo valor comercial (Becker y Makkar, 2008; Makkar y Becker, 2009), que incluso pueden convertirse en un problema ambiental. Los dos co-productos más abundantes son la torta residual de la semilla (Rodríguez-Calle et al., 2016) y el glicerol derivado de la transesterificación del aceite (Díaz, 2013), de tal manera que el incremento en la utilización de los derivados, en especial de la torta residual, puede aumentar el valor de la cadena de producción (Becker y Makkar, 2008; Devappa et al., 2010b; Ovando-Medina et al., 2009).

Además de su importancia como agroenergético, *J. curcas* tiene características nutrimentales que le confieren potencial para la alimentación de animales, por lo que es cultivada en diversos países y ha sido objeto de numerosos estudios para el aprovechamiento de su proteína y aceite (Bueso et al., 2016; Martínez-Herrera, 2008; Valdés-Rodríguez et al., 2013).

La torta residual de las semillas de *J. curcas* se destaca por su alto contenido de proteína (23-28%) y de lípidos residuales (2-5%); (Castillo et al., 1991; Martínez et al., 2010; Martínez-Herrera et al. 2006; Rodríguez-Calle et al., 2016). Sin embargo, su uso para tal fin se ve limitado por la presencia de compuestos tóxicos (ésteres de forbol) y antinutrientes (lectinas, curcinas, saponinas) (Devappa et al., 2012; Harry-Asobara y Samson, 2014; Makkar et al., 2008; Osorio, 2016; Pecina-Quintero et al., 2014; Rakshit et al., 2008).

El consumo de la torta residual sin detoxificar causa daños en animales (Berenchtein et al., 2014). Makkar y Becker (2009) publicaron que en ovinos y caprinos alimentados durante 14 días manifestaron síntomas de intoxicación con dosis tan bajas como 0.025 g kg<sup>-1</sup>, mientras que con dosis altas (0.25 g kg<sup>-1</sup>) el deceso ocurre en menos de 19 h después de su consumo. Entre los daños que ocasiona la ingesta de la torta sin detoxificar se encuentran la promoción tumoral, proliferación celular, dificultad respiratoria, postración y muerte (Devappa et al., 2010a; Jiménez et al., 2015; Martínez-Herrera et al., 2006).

Como alternativa se ha propuesto la detoxificación de la torta residual (López et al., 2012; Molina, 2016; Zhang et al., 2016), obteniéndose resultados parcialmente exitosos con métodos físicos y químicos. Asimismo, se han desarrollado procesos de detoxificación biológica, como los estudios de Joshi et al. (2011), que utilizando cepas de *Pseudomonas*, lograron disminuir la concentración de ésteres de forbol. En el mismo sentido, Phengnuam y Suntornsuk (2013) observaron la degradación de compuestos tóxicos y antinutricionales en la torta de

semillas con aplicación de *Bacillus licheniformis* en fermentación sumergida.

También se ha evaluado el uso de cepas de hongos del grupo de los deuteromicetos aislados del suelo o de otras plantas para la detoxificación de la fracción rica en ésteres de forbol y los antinutrientes en medio líquido (Najjar et al., 2014), logrando la detoxificación hasta en un 50%. Incluso, se evaluó el crecimiento del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* sobre la torta residual de *J. curcas*, encontrando que puede degradar los factores antinutricionales con reducciones de 95% del ácido fítico y 85% de taninos (Da Luz et al., 2013).

Por otra parte, hongos endófitos aislados de distintas partes de *J. curcas*, por ejemplo de la hoja (Kumar y Kaushik, 2013), del tallo (Li et al., 2005) y de la semillas (Hedge et al., 2009; Jayaraman et al., 2011; Tiwari et al., 2012) han demostrado tener actividades biológicas potencialmente útiles. Los hongos endófitos pueden aumentar el crecimiento, acelerar el desarrollo o mejorar la resistencia a estrés ambiental de la planta hospedadora. Además, pueden reducir la incidencia y proteger de infecciones causadas por microorganismos patógenos (Arnold, 2007; Rodríguez-Calle et al., 2016). Estos hongos por ser simbioses podrían ser capaces de metabolizar las moléculas tóxicas de la planta.

A la fecha no se han reportado estudios sobre detoxificación de la torta residual con hongos de la misma planta, por lo cual, el objetivo de este trabajo fue determinar la capacidad de hongos endófitos de *J. curcas* para detoxificar la torta residual del proceso de extracción de aceite de las semillas de dicha planta.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Materia prima

Se obtuvieron frutos de *Jatropha curcas* de la acesión MAP-08 del Banco de Germoplasma del Instituto de Biociencias (BG-IBC) de la Universidad Autónoma de Chiapas. El BG-IBC está ubicado en Tapachula Chiapas, en el sur de México (14.4976° N, 92.4774° O, 58 msnm; temperatura promedio anual de 30.7 °C, humedad relativa media anual de 80%, precipitación media anual de 2,600 mm). A partir de los frutos se obtuvieron 10 kg de semillas secas, que fueron divididas en dos porciones: 6 kg sin testa (quedando solamente la almendra sin la envoltura de la semilla) y 4 kg completas (sin remoción de la testa).

#### 2.1.1. Obtención y desgrasado de la torta residual de *J. curcas*

Las semillas con y sin testa fueron trituradas utilizando un procesador de alimentos hasta obtener las harinas correspondientes. Posteriormente se hicieron tres extracciones secuenciales sólido-líquido, usando hexano en proporción 1:4, descartando la fase hexánica por decantación. La torta residual se expuso al aire durante 8 h para eliminación del solvente.

2.2. Material biológico

Se utilizaron cuatro hongos endófitos (*Nigrospora* sp. cepa CHIC-1, *Trichoderma* sp. cepa MAP-7, *Penicillium* sp. cepa ARR-15, *Penicillium* sp. cepa CDCU-3; Figura 1), que fueron aislados de tallos de cuatro accesiones de *J. curcas* del BG-IBC que producen semillas tóxicas. Las colonias se reactivaron inoculando fracciones de micelio en medio de cultivo ADP (agar-dextrosa-papa) en placa de Petri, permitiendo el crecimiento durante 7 d a 28 °C. Posteriormente, se indujo la esporulación en botellas de

Roux con medio ADP, sembrando un fragmento de 0.5 mm<sup>2</sup> de medio con micelio y esporas en 1 mL de solución Ringer con cinco perlas de ebullición. Se incubaron durante 15 d a 28 °C, después de este tiempo, se lavaron las esporas con 50 mL de solución Ringer. A partir de las suspensiones se tomaron alícuotas representativas, se cuantificaron las esporas en cámara de Neubauer y se estimó la concentración total. Las suspensiones de esporas se guardaron en frascos de vidrio en refrigeración hasta su uso.

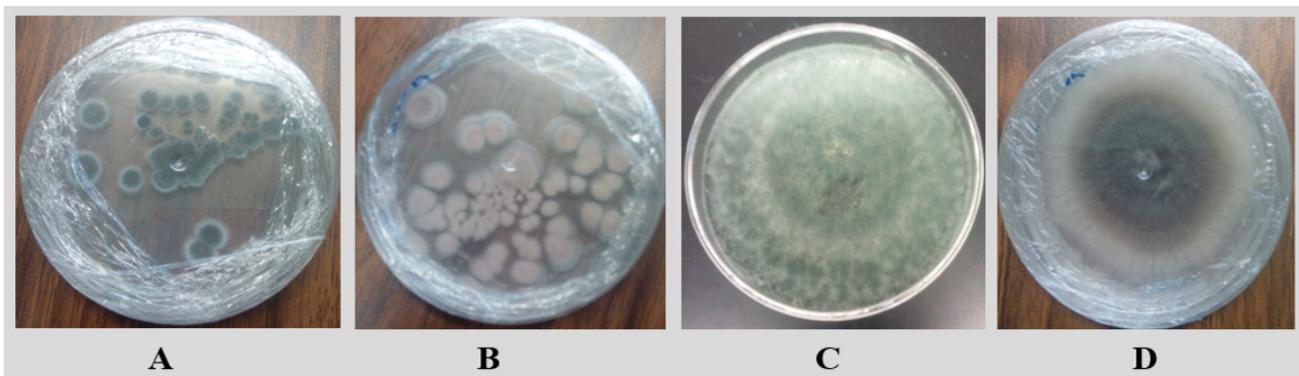


Figura 1. Cepas de hongos utilizadas para la fermentación en estado sólido de la torta residual de *Jatropha curcas*. A) *Penicillium* sp. cepa ARR-15, B) *Penicillium* sp. cepa CDCU-3, C) *Trichoderma* sp. cepa MAP-7 y D) *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1.

2.3. Fermentación en estado sólido de la torta residual de *J. curcas*

Se prepararon pasteles con la torta residual (40 g) mezcladas con 1x10<sup>9</sup> esporas de hongo en agua estéril, suficiente para alcanzar 50% de humedad (p/p), colocadas en bolsas de polipapel, selladas y moldeadas (10 x 10 cm por lado y 1 cm de grosor). Los pasteles fueron incubados en oscuridad durante 10 d a 28 °C, y 80% H.R. Se verificó

el crecimiento fúngico al inicio y al final, y se guardaron los fermentados en refrigeración hasta su evaluación.

Para determinar el efecto de los cuatro hongos endófitos se utilizó un diseño factorial completo 2<sup>k</sup> (dos niveles: presencia o ausencia del hongo; cuatro factores: cuatro hongos), dando un total de 2<sup>4</sup>=16 tratamientos (Cuadro 1). Se tuvieron cuatro repeticiones, consistentes en un pastel.

Cuadro 1. Diseño de tratamientos para la fermentación sólida de la torta residual de *Jatropha curcas* (factorial completo 2<sup>4</sup>).

Tratamientos	Cepa de hongo endófito			
	<i>Penicillium</i> sp. ARR-15	<i>Penicillium</i> sp. CDCU-3	<i>Trichoderma</i> sp. MAP-7	<i>Nigrospora</i> sp. CHIC-1
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

Presencia (+), ausencia (-).

## 2.4. Evaluación de la capacidad detoxificante de los hongos

### 2.4.1. Obtención de extractos de los fermentados

Se realizaron dos tipos de extractos, hexánico y metanólico, de cada repetición de los fermentados, tomando 0.5 g de muestra que fueron macerados en 4.5 mL de solvente en un mortero. La suspensión obtenida se transfirió a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm con tapa de rosca y se refrigeró (4 °C) por 48 h. Enseguida se extrajo con una pipeta el sobrenadante, que fue centrifugado a 2320 g por 5 min. El nuevo sobrenadante se transfirió a microtubos de 2 mL previamente puestos a peso constante. Los tubos se colocaron en un horno a 50 °C durante 24 h para evaporar el solvente y obtener el extracto seco, el cual se pesó en balanza analítica y, por diferencia, se determinó el rendimiento. Los extractos secos se re-disolvieron en 100 µL de dimetil-sulfóxido y se hicieron diluciones con agua de mar a concentraciones conocidas.

### 2.4.2. Obtención de nauplios de *Artemia salina*

Para la prueba de letalidad se usaron nauplios del microcrustáceo *A. salina*. Para esto, se eclosionaron 0.5 g de quistes de *A. salina* procedentes del Great Salt Lake (Utah, E.U.A.). El procedimiento consistió en el lavado e hidratación de los quistes con agua corriente durante 30 min para posterior decapsulación en una mezcla de 32 mL de NaClO (6% de cloro libre), 3 mL de NaOH (35%) y 120 mL de agua de mar hasta la obtención de un color naranja. Los quistes decapsulados fueron lavados con agua corriente e incubados durante 24 h en un litro de agua de mar en un eclosionador cilíndrico, con iluminación ( $7.9 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), 28 °C y aireación (1 vvm). Se tomaron muestras a las 24 h y 48 h para verificar la obtención de nauplios, bajo el estereoscopio.

### 2.4.3. Determinación de la concentración letal media ( $CL_{50}$ )

Se utilizaron placas de 24 pozos con capacidad de 3 mL por pozo para evaluar el efecto de distintas concentraciones de extracto hexánico o metanólico (0.1, 1, 10, 100 y 1000 µg mL<sup>-1</sup>) en la sobrevivencia de nauplios de primer estadio. En cada pozo individual se colocaron 50 µL de extracto a la concentración deseada, 400 µL de agua de mar y 50 µL de la suspensión de eclosión con 10 nauplios vivos de primer estadio. Como control se tuvieron pozos a los que se agregaron 50 µL de una mezcla de agua de mar con dimetil-sulfóxido en lugar del extracto. Después de 24 h de incubación bajo iluminación ( $7.9 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a 28 °C, se contó bajo el estereoscopio el número de nauplios muertos (inmovilidad por al menos 10 s) y sobrevivientes. Se calcularon las  $CL_{50}$ , por tratamiento y por tipo de extracto.

## 2.5. Caracterización química de los fermentados detoxificados

Se realizó la caracterización química de los fermentados correspondientes a los tratamientos T1 sin testa (sin hongo), T1 con testa (sin hongo), T11 sin testa (*Penicillium* sp. cepa CDCU-3 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1) y T13 con testa (*Trichoderma* sp. cepa MAP-7 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1).

### 2.5.1. Determinación de humedad

Se determinó el contenido por gravimetría usando el secado en horno. Para esto, se calculó el peso constante de los crisoles y se les agregó  $1 \pm 0.05$  g de muestra. Después se colocaron los crisoles en el horno a 105 °C durante 24 h, transcurrido ese tiempo, se enfriaron en el desecador y se tomó el peso del crisol con la muestra seca (NOM-116-SSA1-1994).

### 2.5.2. Cenizas

Se determinó el contenido de cenizas por calcinación en mufla, para lo cual se utilizaron las muestras secas provenientes del análisis de humedad. Se calcinaron las muestras a 550 °C, durante 4 h, se enfriaron en desecador y se pesaron (NMX-F-066-S-1978).

### 2.5.3. Contenido de saponinas

Se utilizó la metodología descrita por Makkar et al. (2007) para la extracción de saponinas de las muestras (1 g), mezclando 10 mL de metanol al 80% con 1 g de muestra y llevadas a un agitador orbital HZ-300 Luzeren, durante 20 min y a centrifugación a 1340 g durante 10 min en el equipo Eppendorf Centrifuge 5403. Una vez centrifugado, se tomaron 20 µL del sobrenadante que fueron mezclados con 230 µL de metanol, 250 µL de vainillina (1.6 g de vainillina diluido en 20 mL de metanol) y 2.5 mL de ácido sulfúrico (72%). Se midió la absorbancia a 544 nm con el espectrofotómetro Genesys 20 y se estimó la concentración a partir de una curva de calibración usando diosgenina (Sigma, EUA) a concentraciones de 0 a 250 µg mL<sup>-1</sup>. Los resultados fueron expresados en porcentaje de diosgenina.

### 2.5.4. Proteína total

Se determinó el contenido de proteína total de los fermentados utilizando el método de Kjeldahl para nitrógeno. Inicialmente se pesó 0.5 g de muestra, se colocó la muestra en un tubo donde se añadió 2 g de catalizador y 8 mL de ácido sulfúrico concentrado para digestión a 420 °C durante 60 min. Posteriormente se añadió 80 mL de agua destilada y 50 mL de NaOH al 40%. A continuación se destiló la muestra recibiendo el destilado en 25 mL de ácido bórico al 4% hasta que viró a color verde. Finalmente, se titularon las muestras con una solución de HCl valorada hasta viraje a color violeta claro (NOM-F-068-S-1980). Con los resultados se calculó el porcentaje de nitrógeno total y para obtener el contenido de proteína se multiplicó por el factor 6.25.

### 2.5.5. Proteína soluble

Se determinó el contenido de proteína soluble en los fermentados por el método de Bradford (1976). Para ello, se maceró 1 g de fermentado en 9 mL de buffer de fosfatos (pH 7.0), se filtró la suspensión y se tomaron 20 µL del filtrado. Se añadieron 780 µL de agua destilada y 200 µL de reactivo de Bradford y se midió la absorbancia a 595 nm. Se estimó el contenido de proteína en porcentaje a partir de una curva patrón de albúmina (0-20 µg mL<sup>-1</sup>).

### 2.5.6. Carbohidratos totales

Para determinar el contenido de carbohidratos totales se siguió el método de Dubois et al., (1956), para ello, se

maceraron 50 mg de fermentado en 50 mL de agua destilada, de esta mezcla se transfirió 1 mL de la suspensión a un tubo de ensayo de 13 x 100 mm y se adicionaron 0.6 mL de una solución acuosa de fenol al 5%. Se mezcló y se añadieron 3.6 mL de ácido sulfúrico concentrado. Dicha mezcla se dejó 30 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 480 nm. Se estimó el contenido de carbohidratos, en porcentaje, a partir de una curva patrón de glucosa preparada en el intervalo 0-50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

### 2.5.7. Lectinas y curcinas

La determinación del contenido de lectinas y curcinas se realizó mediante el ensayo de hemaglutinación reportado por Makkar et al. (1997). Antes de realizar la extracción la muestra se desgrasó en frío con solución de cloroformo: metanol (2:1) de la siguiente manera: se agregaron 4 mL de solución por gramo de muestra, se agitó durante 30 min y se filtró, esta operación se repitió 3 veces, una vez que se concluyeron los lavados, la muestra se dejó secar a temperatura ambiente para su posterior utilización. Para obtención del extracto se maceró 1 g de muestra desgrasada en 5 mL de buffer Tris-HCl (50 mM, pH 8.0), se agitó durante 12 h a 28 °C en un agitador orbital HZ-3000 Luzeren, seguido de un filtrado. Se transfirieron 100  $\mu\text{L}$  de extracto a un pozo de una placa de microtitulación y se hicieron diluciones seriadas 1: 2 con buffer fosfato salino (PBS 1X, pH 7.0), para lo cual a 50  $\mu\text{L}$  de buffer se le agregaban 50  $\mu\text{L}$  de la dilución previa. Las concentraciones de los pozos variaron desde 66.6 hasta 0.0020  $\text{mg mL}^{-1}$ . Posteriormente, se agregó a cada pozo 50  $\mu\text{L}$  de una solución de eritrocitos en PBS al 0.05%. Se incubaron las placas durante 2 h a 37 °C y se observó bajo el microscopio para determinar si había o no aglutinación de eritrocitos. El contenido de lectina se determinó indirectamente al medir la actividad hemaglutinante expresada como la cantidad mínima del material del estudio (en  $\text{mg mL}^{-1}$  del medio de ensayo) que produce aglutinación. Para conocer el contenido de curcina se utilizó la siguiente fórmula: Curcina ( $\text{mg mL}^{-1}$ ) =  $2^n / \text{mg}$  de proteína soluble en la muestra; donde n: es el número del pozo en el cual no se presenta la aglutinación.

### 2.6. Análisis estadístico

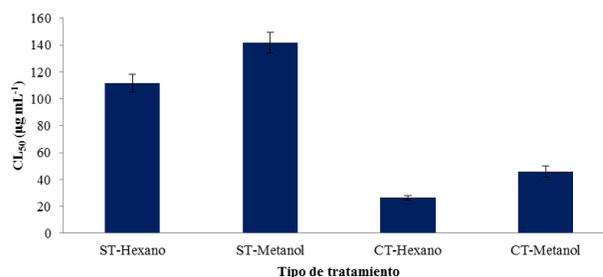
Para determinar las  $\text{CL}_{50}$  de cada uno de los tratamientos se hicieron análisis de regresión donde se utilizó un software BioStat© v. 2009. Los datos de composición de los fermentados se procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y donde hubo diferencias significativas se compararon las medias de los tratamientos (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

## 3. Resultados y Discusión

### 3.1. Toxicidad de los extractos de los fermentados

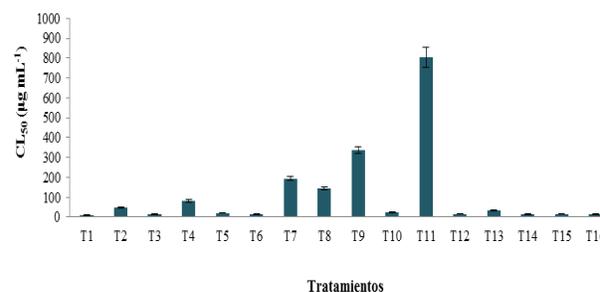
Se encontró que los extractos de fermentados que contuvieron la testa de la semilla son más tóxicos ( $\text{CL}_{50}=36.1\pm 2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que los preparados con harina de la almendra sin testa ( $\text{CL}_{50}=126.6\pm 6.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). En la Figura 2 se muestran las medias globales de las  $\text{CL}_{50}$  de los

tratamientos fermentados con o sin testa, de acuerdo al tipo de extracto, donde se observa que los extractos hexánicos presentan ligeramente mayor toxicidad que los metanólicos ( $\text{CL}_{50}$  1.2 veces menor en el caso de los fermentados sin testa y  $\text{CL}_{50}$  1.7 veces menor en el caso de los fermentados con testa).



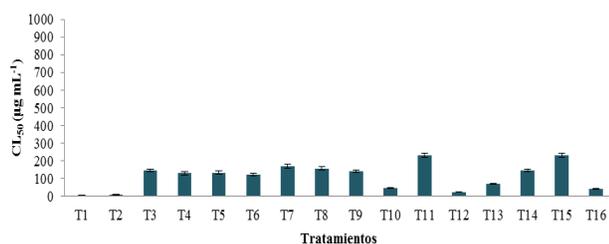
**Figura 2.** Toxicidad ( $\text{CL}_{50}$ ) de los extractos hexánicos y metanólicos de fermentados con (CT) y sin testa (ST).

El análisis por tipo de solvente y de materia prima mostró que los extractos hexánicos de fermentados sin testa difirieron en toxicidad de acuerdo a los inóculos utilizados en la fermentación. En la Figura 3 se observa que el extracto del T1 (sin inóculo fúngico) tiene muy alta toxicidad ( $\text{CL}_{50}=9.2\pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), la cual se mantuvo en la mayoría de los tratamientos, sin embargo, en cuatro de ellos (T7, T8, T9 y T11) se presentó un fenómeno de detoxificación, siendo T11 (*Penicillium* sp. cepa CDCU-3 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1), con valor de  $\text{CL}_{50}$  de  $803.7\pm 50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , el que presentó menor toxicidad (87 veces menos que el T1).



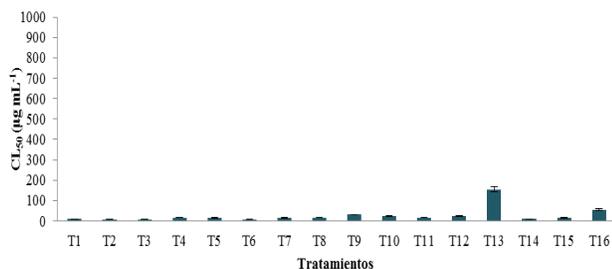
**Figura 3.** Toxicidad ( $\text{CL}_{50}$ ) de los extractos hexánicos de fermentados sin testa.

Los extractos metanólicos de fermentados sin testa también difirieron en toxicidad de acuerdo a los inóculos utilizados en la fermentación. En la Figura 4 se observa que el extracto del T1 (sin inóculo fúngico) tiene alta toxicidad ( $\text{CL}_{50}=6.4\pm 1.9 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) en comparación con los tratamientos fermentados. El T11 (*Penicillium* sp. cepa CDCU-3 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1) y el T15 (*Penicillium* sp. cepa CDCU-3, *Trichoderma* sp. cepa MAP-7 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1), con valores de  $\text{CL}_{50}$  de  $231.3\pm 10.7 \mu\text{g mL}^{-1}$  y de  $232.0\pm 10.8 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente, presentaron menor toxicidad (36 veces menos que el T1).



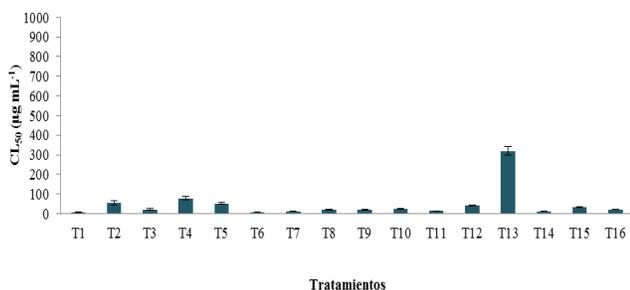
**Figura 4.** Toxicidad (CL<sub>50</sub>) de los extractos metanólicos de fermentados sin testa.

Respecto a los extractos hexánicos de fermentados con testa, se observó que la mayoría de los tratamientos fúngicos fueron tan tóxicos como el T1 (sin inóculo fúngico), el cual tuvo una CL<sub>50</sub> de  $9.3 \pm 0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 5), sin embargo, el T13 (*Trichoderma* sp. cepa MAP-7 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1) presentó un fenómeno de detoxificación, con valor de CL<sub>50</sub> de  $155.0 \pm 12.8 \mu\text{g mL}^{-1}$  (16 veces menos que el T1).



**Figura 5.** Toxicidad (CL<sub>50</sub>) de los extractos hexánicos de fermentados con testa.

Por su parte, los extractos metanólicos de fermentados con testa presentaron CL<sub>50</sub> bajas (alta toxicidad), excepto los del T13 (*Trichoderma* sp. cepa MAP-7 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1), donde se encontró un valor de CL<sub>50</sub> de  $319.4 \pm 23.2 \mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 6). Esto representa una toxicidad 53 veces menor que la del T1.



**Figura 6.** Toxicidad (CL<sub>50</sub>) de los extractos metanólicos de fermentados con testa.

La toxicidad de los fermentados puede deberse a los ésteres de forbol presentes en las semillas de *J. curcas*, ya contienen entre  $0.60$  y  $3.56 \text{ mg g}^{-1}$  (Jiménez-Ocampo et al.,

2015) y a otros compuestos tóxicos presentes en *J. curcas*, como las jatrolonas A y B, curculatiranos A y B, y las curcusonas A-D (Ahirrao et al., 2008; Baraguey et al., 1998; Boateng y Kusi, 2008; Correa y Penna, 1974; Igbinsola et al., 2009; Jaikumar et al., 2010; Ravindranath et al., 2004; Yan et al., 2008).

Por otra parte, fue evidente que los fermentados preparados con harina de la almendra sin testa se detoxificaron en comparación con los fermentados que incluyeron la testa de la semilla. Esto es contrario a lo que se conoce de la ubicación de los compuestos tóxicos en la semilla de *J. curcas*, ya que la almendra es varias veces más tóxica que la testa (Abou-Arab y Abou-Salem, 2010). Esta última es un material leñoso fabricado a base de celulosa y lignina que requiere de hidrólisis para su degradación y metabolización por parte de los hongos. Es probable que en los tratamientos sin testa los inóculos fúngicos cubrieran toda la torta residual detoxificándola, mientras que en los tratamientos con testa los hongos fermentaron la materia prima con mayor lentitud al tener que degradar la materia lignificada resultando insuficiente el periodo experimental para la degradación. A lo anterior se añade el hecho de que los tratamientos con testa eran heterogéneos (mezcla de la torta de la almendra con fragmentos de testa), lo cual pudo provocar que los inóculos fúngicos no cubrieran totalmente la torta a fermentar.

No obstante, hubo algunos tratamientos con testa que fueron detoxificados, en particular el tratamiento 13 (*Trichoderma* sp. cepa MAP-7 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1), el cual tuvo altos valores de CL<sub>50</sub> tanto en los extractos hexánicos (Figura 5), como en los metanólicos (Figura 6). Los fermentados de este tratamiento arrojaron bajo contenido de saponinas ( $0.67 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ), comparado con los valores reportados para la semilla de *J. curcas* ( $1.51 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) reportados por Abou-Arab y Abou-Salem (2010); sin embargo, se detectaron lectinas y curcinas en este tratamiento (Cuadro 2).

Los tratamientos que indujeron detoxificación fueron fermentados con el hongo *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1 (tratamientos 9, 11 y 13), por lo que es posible que dicha cepa sea la responsable del proceso de degradación de las sustancias tóxicas (probablemente los ésteres de forbol). La evidencia señala que su acción detoxificante se potencia cuando el hongo está combinado con otras cepas (Belew y Sam, 2010), probablemente porque la degradación de las moléculas tóxicas se haga en varias etapas usando las maquinarias metabólicas de varios microorganismos.

### 3.2. Caracterización química de los fermentados detoxificados

Se encontró que la fermentación en estado sólido influyó significativamente ( $F=10.957$ ,  $P<0.001$ ) en el contenido de humedad, siendo el tratamiento 11 sin testa el que presentó mayor humedad (57.04%). En el contenido de cenizas se encontraron diferencias significativas en los tratamientos ( $F=9.889$ ,  $P<0.001$ ), resultando que los tratamientos sin

testa tienen mayor contenido de cenizas que los tratamientos con testa, independientemente del inóculo para la fermentación (Cuadro 2).

Con respecto a la proteína soluble el tratamiento 11 sin testa fue estadísticamente superior al resto de los tratamientos ( $F=8.006$ ,  $P<0.001$ ), con valor de  $40.71 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ . Sin embargo, en el contenido de proteína total no se encontraron diferencias entre los tratamientos ( $F=0.242$ ,  $P=0.865$ ).

Con relación al contenido de carbohidratos totales, el tratamiento 11 sin testa fue estadísticamente superior al

resto de los tratamientos ( $F=11.328$ ,  $P<0.001$ ) con valor de 4.99%.

Para el contenido de saponinas se encontró que el tratamiento sin inóculo fúngico (11 sin testa) tuvo valores mayores ( $2.29 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ ) a los fermentados detoxificados ( $F=46.367$ ,  $P<0.0001$ ). Con respecto a las lectinas y curcinas, los tratamientos con testa presentaron dichos compuestos tóxicos, mientras que en los tratamientos sin testa no se detectaron (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Caracterización de los tratamientos fermentados con y sin testa de pasta residual de *J. curcas*.

Tratamientos	Humedad (%)	Cenizas (%)	Proteína soluble (mg 100 g <sup>-1</sup> )	Proteína total (%)	Carbohidratos totales (%)	Saponina (%)	Lectina (mg mL <sup>-1</sup> )	Curcina (mg mL <sup>-1</sup> )
T1ST	52.47 B*	9.27 A	32.50 B	32.75 A	2.07 B	2.29A	ND	ND
T1CT	49.56 B	7.77 B	35.13 B	36.72 A	3.51 AB	0.65 C	33.3	0.108
T11ST	57.04 A	8.96 A	40.71 A	36.66 A	4.99 A	1.85 B	ND	ND
T13CT	52.19 B	7.51 B	34.17 B	31.11 A	3.33 B	0.67 C	33.3	0.128

T1ST: Tratamiento 1 sin testa, T1CT: Tratamiento 1 con testa, T11ST: Tratamiento 11 sin testa, T13CT: Tratamiento 13 con testa, ND: No detectado, \*Letras distintas en cada columna indican medias estadísticamente distintas (Tukey  $\alpha=0.05$ ).

El contenido de humedad de la torta residual de *J. curcas* oscila entre 3% y 10% (Rodríguez-Calle et al., 2016). Montes et al. (2011), encontraron que las pastas de semillas procedentes de Paraguay y Argentina contienen  $6.50\pm 0.10\%$  y  $7.20\pm 0.10\%$ , respectivamente. En otro estudio reportaron valores de 3.8% de humedad en la torta residual (Rodríguez-Calle et al., 2016). Sin embargo, en los fermentados obtenidos en el presente estudio se encontraron valores más altos (por encima de 50%), lo cual se debe al 50% de humedad que se adicionó a la torta residual para que se llevara a cabo el proceso de incubación. El hecho de que los fermentados del tratamiento 11 sin testa presentaran mayor humedad (57%) puede deberse a que el micelio de los hongos crecieron más que en los otros tratamientos, formando una red que retuvo la humedad.

Por su parte, el contenido de cenizas en los tratamientos con testa fue similar a lo reportado por Rodríguez-Calle et al. (2016), quienes mencionan que la torta residual de *J. curcas* contiene 7.02% de cenizas. No obstante, algunos autores reportan valores ligeramente menores, como Makkar et al. (1998) y Martínez-Herrera et al. (2006), quienes encontraron contenidos de ceniza que oscilaron entre 4.4% y 4.8%. El hecho de que los tratamientos con testa tuvieran estadísticamente menor cantidad de cenizas se debe a que la testa está hecha de un material poroso (paredes celulares lignificadas de baja densidad) que rinde baja cantidad de cenizas.

Por otro lado, la proteína soluble de los fermentados arrojaron valores inferiores a los reportados por Jarma et al. (2014) para la torta residual de *J. curcas* ( $1208 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ ). Sin embargo, el tratamiento 11 sin testa fue superior al resto de tratamientos, lo cual le confiere potencial para usos posteriores como alimento animal.

Por su parte, el contenido de proteínas totales en los tratamientos osciló entre 31.11%-36.72%, valores inferiores

a los reportado por Makkar et al. (1998) en la torta residual de *J. curcas* (56.4%), pero superior a lo reportado por Martínez et al. (2010), (23-28%). No obstante, Martínez-Herrera et al. (2006), reportaron valores en la harina de las semillas entre 31-34.5%, coincidiendo con los encontrados en este estudio.

Con respecto al contenido de carbohidratos, el valor más alto encontrado en los tratamientos fue de 4.99%, inferior a estudios realizados por Makkar et al. (1998) y Peralta-Flores et al. (2012), quienes reportaron valores de 15.1% y 35%, respectivamente. Rodríguez-Calle et al. (2016) reportaron valores de 51.9% en la pasta residual de *J. curcas*.

Con lo que respecta al contenido de saponinas de los tratamientos fue similar a lo reportado por Abou-Arab y Abou-Salem (2010), quienes reportaron que la semilla integral de *J. curcas* tiene  $1.51 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  de saponinas,  $2.63 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  en la almendra y  $0.65 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$  en la cáscara.

Respecto al contenido de lectinas ( $33.3 \text{ mg mL}^{-1}$ ), los tratamientos fermentados con testa fueron menos tóxicos a lo reportado por Martínez-Herrera et al. (2006) en semillas sin tratar, quienes encontraron valores de tan solo  $1.46 \text{ mg mL}^{-1}$ .

#### 4. Conclusión

Los fermentados que mantuvieron la testa de la semilla fueron más tóxicos ( $CL_{50}=36.1\pm 2.9 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ) que los preparados con harina de la almendra sin testa ( $CL_{50}=126.6\pm 6.9 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Los extractos hexánicos del tratamiento 1 sin testa (control) presentaron alta toxicidad ( $CL_{50}=9.2\pm 0.6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ ), que fue mantenida en la mayoría de los tratamientos. Sin embargo, el tratamiento 11 sin testa (*Penicillium* sp. cepa CDCU-3 y *Nigrospora* sp. cepa CHIC-1) presentó 87 veces menos toxicidad que el tratamiento control sin hongos endófitos ( $CL_{50}=803.7\pm 50.0$

$\mu\text{g mL}^{-1}$ ); Además, este tratamiento presentó más contenido de proteína soluble que el resto de los fermentados ( $F=8.006$ ,  $P<0.001$ ), lo que representa un potencial en el desarrollo futuro de alimentos balanceados para animales.

### Conflicto de intereses

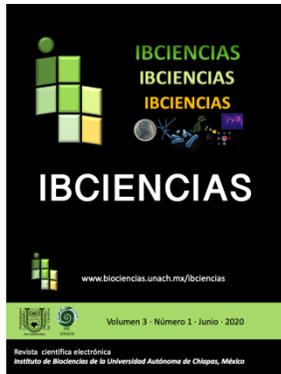
Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Referencias

- Abou-Arab AA, Abu-Salem FM. 2010. Nutritional quality of *Jatropha curcas* seeds and effect of some physical and chemical treatments on their antinutritional factors. *African Journal of Food Science* 4(3): 93-103.
- Ahirrao RA, Pawar SP, Borse LB, Borse SL, Desai SG, Muthu AK. 2008. Anthelmintic activity of leaves of *Jatropha curcas* Linn and *Vitex negundo* Linn. *Pharmacology Online Newsletters* 1: 279-293.
- Arnold AE. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges, and frontiers. *Fungal Biology Reviews* 21(2-3): 51-66.
- Baraguey C, Auvin-Guette C, Blond A, Cavelier F, Levenzen F, Pousset JL, Bodo B. 1998. Isolation, structure and synthesis of chevalierins A, B and C, cyclic peptides from the latex of *Jatropha chevalieri*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 1998(18): 3033-3040.
- Becker K, Makkar HPS. 2008. *Jatropha curcas*: A potential source for tomorrow's oil and biodiesel. *Lipid Technology* 20(5): 104-107.
- Behera SK, Srivastava P, Tripathi R, Singh JP, Singh N. 2010. Evaluation of plant performance of *Jatropha curcas* L. under different agro-practices for optimizing biomass—a case study. *Biomass and Bioenergy* 34(1): 30-41.
- Belewu MA, Sam R. 2010. Solid state fermentation of *Jatropha curcas* kernel cake: Proximate composition and antinutritional components. *Journal of Yeast Fungal Research* 1(3): 44-46.
- Berenchtein B, Abdalla AL, Do Prado PT, Sbardella M, Louvandini H, Filho ALA, Dhanasekaran D, dos Santos PP. 2014. Effects of detoxified *Jatropha curcas* kernel meal in finishing pig diets on their performance, carcass traits, meat quality and intoxication. *Livestock Science* 165: 100-103.
- Boateng BA, Kusi F. 2008. Toxicity of *Jatropha* seed oil to *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and its parasitoid, *Dinarmus basalis* (Hymenoptera: Pteromalidae). *Journal of Applied Sciences Research* 4(8): 945-951.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2): 248-254.
- Bueso F, Sosa I, Chun R, Pineda R. 2016. Phorbol esters seed content and distribution in Latin American provenances of *Jatropha curcas* L: potential for biopesticide, food and feed. *SpringerPlus* 5(1): 445.
- Castillo HL, Arenas OM, Jiménez A. 1991. Composición química y aspectos nutricionales de la harina desgrasada del piñón mexicano *Jatropha curcas*. *Acta de Ciencia y Tecnología* 40: 73-74.
- Correa MP, Penna LDA. 1974. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Volume 5. Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. Rio de Janeiro.
- Da Luz JMR, Paes SA, Torres DP, Nunes MD, da Silva JS, Mantonavi HC, Kasuya MCM. 2013. Production of edible mushroom and degradation of antinutritional factors in *Jatropha* biodiesel residues. *LWT-Food Science and Technology* 50(2): 575-580.
- Devappa RK, Becker K, Makkar HPS. 2012. Phytochemicals in *Jatropha* seeds and potential agro-pharmaceutical applications of *Jatropha curcas* phorbol esters. En Carels N, Sujatha M, Bahadur B. (eds.). *Jatropha*, challenges for a new energy crop: Volume 1: Farming, economics and biofuel. Springer. New York. Pp. 383-402.
- Devappa RK, Maes J, Makkar HPS, Greyt WD, Becker K. 2010a. Quality of biodiesel prepared from phorbol Ester extracted *Jatropha curcas* oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87(6): 697-704.
- Devappa RK, Makkar HPS, Becker K. 2010b. Biodegradation of *Jatropha curcas* phorbol esters in soil. *Journal of the Science Food and Agriculture* 90(12): 2090-2097.
- Dharma S, Masjuki HH, Ong HC, Sebayang AH, Silitonga AS, Kusumo F, Mahlia TMI. 2016. Optimization of biodiesel production process for mixed *Jatropha curcas-Ceiba pentandra* biodiesel using response surface methodology. *Energy Conversion and Management* 115: 178-190.
- Díaz MBH. 2013. Optimización de la producción de biodiesel a partir de aceite vegetal usado a nivel laboratorio y a nivel planta piloto. Tesis. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PT, Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3): 350-356.
- Harry-Asobara JL, Samson EO. 2014. Comparative study of the phytochemical properties of *Jatropha curcas* and *Azadirachta indica* plant extracts. *Journal of Poisonous and Medicinal Plants Research* 2(2): 20-24.
- Hedge YR, Chavhan T, Patil SJ. 2009. *Jatropha curcas*-a new host for *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Plant Disease Sciences* 4(2): 230.
- Igbinosa OO, Igbinosa EO, Aiyegoro OA. 2009. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 3(2): 58-62.
- Jaikumar S, Ramaswamy S, Asokan BR, Mohan T, Gnanavel M. 2010. Antiulcer activity of methanolic extract of *Jatropha curcas* (Linn.) on aspirin-induced gastric lesions in Wistar stains rats. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 1(4): 886-897.
- Jarma AB, Vanegas OY, Pompelli MF, Garrido PC, Bezerra Neto E, Jarma Orozco A. 2014. Desintoxicación de la torta de *Jatropha curcas* L. como posible alternativa de alimento para ganado bovino en el caribe colombiano. *Revista UDCA Actualidad y Divulgación Científica* 17(1): 171-178.
- Jayaraman P, NesaPriya S, Parameshwari S, Shyamala S, Jawahar N, Sekar H. 2011. Occurrence of storage fungi in

- Jatropha* (*Jatropha curcas* L.) seeds. African Journal of Microbiology Research 5(5): 474-480.
- Jiménez-Ocampo R, Rosales-Serna R, Rodríguez-González JA, Domínguez-Martínez PA. 2015. Harina de *Jatropha* para la alimentación animal. En: Osuna FJ, Atkinson CJ, Vázquez JMP, Barrios EJ, Hernández M, Rangel SE, Cruz E. Estado del arte en la ciencia y tecnología para la producción y procesamiento de *Jatropha* no tóxica. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, México. Pp. 74-82.
- Jiménez OR, Rosales RS, Rodríguez JAG, Martínez HJ. 2015. Riesgos del uso alimenticio, industrial y agropecuario de la *Jatropha*. Desplegable para productores Núm. 66 INIFAP-CIRNOC- Campo Experimental Valle del Guadiana, Durango, Méx. 2 Pp.
- Joshi C, Mathur P, Khare SK. 2011. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. Bioresource Technology 102(7): 4815-4819.
- Kalam MA, Ahamed JU, Masjuki HH. 2012. Land availability of *Jatropha* production in Malaysia. Renewable and Sustainable Energy Reviews 16(6): 3999-4007.
- Kumar S, Kaushik N. 2013. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. PloS one 8(2): e56202.
- Li H, Qing C, Zhang Y, Zhao Z. 2005. Screening for endophytic fungi with antitumour and antifungal activities from Chinese medicinal plants. World Journal of Microbiology and Biotechnology 21(8-9): 1515-1519.
- Lim-Meng-Hon J. 2010. *Jatropha* in South East Asia. SEGI Review 3(2): 118-134.
- López A, Gil AG, Bello J. 2012. Alimentos con sustancias tóxicas de origen natural: Plantas superiores alimenticias. En: Cameán A, Repeto M. (eds.) Toxicología alimentaria. Ediciones Diaz-Santos. Madrid, España. Pp. 191-209.
- Makkar HP, Becker K. 2009. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. European Journal of Lipid Science and Technology 111(8): 773-787.
- Makkar HP, Martínez-Herrera J, Becker K. 2008. Variations in the seed number per fruit, seed physical parameters and contents of oil and phorbol ester in toxic and non-toxic genotypes of *Jatropha curcas*. Plant Science 3(4): 260-265.
- Makkar HP, Siddhuraju P, Becker K, Harinder PS. 2007. Plant secondary metabolites. Methods in Molecular Biology 393: 1-122.
- Makkar HPS, Becker K, Sporer F, Wink M. 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45: 3152-3157.
- Makkar HPS, Becker K, Schmook B. 1998. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. Plant Foods for Human Nutrition 52(1): 31-36.
- Martínez J, Martínez AL, Makkar HPS, Francis G, Becker K. 2010. Agroclimatic conditions, chemical and nutritional characterization of different provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. European Journal of Scientific Research 39(3): 396-407.
- Martínez-Herrera J. 2008. El piñón mexicano: fuente de energía renovable en el estado de Morelos. Memorias del Foro nacional sobre cultivos productores de biodiesel (*Jatropha curcas*, *Ricinus communis*). Aguascalientes, México. Pp. 13-23.
- Martínez-Herrera J, Siddhuraju P, Francis G, Dávila-Ortiz G, Becker K. 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from México. Food Chemistry 96(1): 80-89.
- Molina PC. 2016. Evaluación de varias fuentes de proteína vegetal en dietas para camarón *Litopenaeus vannamei*. Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Valencia, España.
- Montes JM, Rodríguez J, Vaca J, Guzmán C, Calandri E. 2011. Characterization of *Jatropha curcas* L. seed and its oil, from Argentina and Paraguay. The Journal of the Argentine Chemical Society 98: 1-9.
- Najjar A, Abdullah N, Saad WZ, Ahmad S, Oskouean E, Gherbawy Y. 2014. Removal of phorbol esters present in *Jatropha curcas* kernel by fungal isolates. International Journal of Agriculture and Biology 16(5): 871-878.
- NMX-F-066-S-1978. 1978. Determinación de cenizas en alimentos. Recuperado de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4721127&fecha=04/08/1978](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4721127&fecha=04/08/1978).
- NOM-F-68-S-1980. 1980. Alimentos determinación de proteínas. Recuperado de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4858024&fecha=04/08/1980](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4858024&fecha=04/08/1980).
- NOM-116-SSA1-1994. 1995. Bienes y servicios. Determinación de humedad en alimentos por tratamiento térmico. Método por arena o gasa. Recuperado de [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4868300&fecha=02/02/1995](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4868300&fecha=02/02/1995).
- Osorio RA. 2016. Evaluación de propiedades mecánicas, físicas y estructurales de películas de concentrados proteínicos de *Jatropha curcas* L. y de *Glycine max* L., adicionadas con montmorillonita. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Yautepec de Zaragoza, Morelos, México.
- Ovando-Medina I, Espinosa-García F, Núñez-Farfán J, Salvador-Figueroa M. 2009. Does biodiesel from *Jatropha curcas* represent a Sustainable Alternative Energy Source? Sustainability 1(4): 1035-1041.
- Pandey VC, Singh KS, Kumar A, Singh RP. 2012. *Jatropha curcas*: A potential biofuel sustainable environmental development. Renewable and Sustainable Energy Reviews 16(5): 2870-2883.
- Pecina-Quintero V, Anaya-López JL, Zamarripa-Colmenero A, Núñez-Colín CA, Montes-García N, Solís-Bonilla JL, Jiménez-Becerril MF. 2014. Genetic structure of *Jatropha curcas* L. in México and probable centre of origin. Biomass and Bioenergy 60: 147-155.
- Peralta-Flores L, Gallegos-Tintoré S, Solorza-Feria J, Dávila-Ortiz G, Chel-Guerrero L, Martínez-Ayala A. 2012. Biochemical evaluation of protein fractions from physic nut (*Jatropha curcas* L.). Grasas y Aceites 63(3): 253-259.
- Phengnuam T, Suntornsuk W. 2013. Detoxification and anti-nutrients reduction of *Jatropha curcas* by *Bacillus* fermentation. Journal of Bioscience and Bioengineering 2: 168-172.
- Rakshit KD, Darukeshwara J, Raj KR, Narasimhamurthy K, Saibaba P, Bhagya S. 2008. Toxicity studies of

- detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. Food and Chemical Toxicology 46(12): 3621-3625.
- Ravindranath N, Ravinder-Reddy M, Ramesh C, Ramu R, Prabhakar A, Jagadeesh B, Das B. 2004. New lathyrane and podocarpane diterpenoids from *Jatropha curcas*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 52(5): 608-611.
- Rodríguez-Calle RM, Suárez-Hernández J, Támara-Hernández Y. 2016. Caracterización de la torta obtenida del prensado del fruto de *Jatropha curcas*. Pastos y Forrajes 39(1): 72-75.
- Tiwari P, Kannoja P, Pandey A. 2012. *Jatropha* seed borne fungi in the Haryana. International Journal of Advanced Biological Research 2(1): 83-85.
- Valdés-Rodríguez OA, Sánchez-Sánchez O, Pérez-Vázquez A, Caplan J. 2013. The Mexican non-toxic *Jatropha curcas* L., food resource or biofuel? Ethnobotany Research and Applications 11: 1-7.
- Yan R, Gao S, Yang W, Cao M, Wang S, Chen F. 2008. Nickel toxicity induced antioxidant enzyme and phenylalanine ammonia-lyase activities in *Jatropha curcas* L. cotyledons. Plant Soil Environmental 54(7): 294-300.
- Zhang X, Yang Z, Liang J, Tang L, Chen F. 2016. Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake in solid-state fermentation of newly isolated endophytic strain and nutrition assesment for its potential utilizations. International Biodeterioration and Biodegradation 109: 202-210.



## ARTÍCULO CORTO

## Aves del Jardín Botánico Rey Nezahualcóyotl de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, México

Achtlí Avilés-Piña, Daniel Alexander Carrillo-Martínez, Manuel Higinio Sandoval-Ortega\*, Moisés Arellano-Delgado, Hugo Noé Araiza-Arvilla

Departamento de Biología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Aguascalientes, México.

### Resumen

Los jardines botánicos cumplen un rol importante como refugio para la fauna silvestre y representan áreas ideales para la conservación de la avifauna. El objetivo del presente trabajo fue generar un listado de aves presentes en el Jardín Botánico Rey Nezahualcóyotl (JBRN) de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, en Aguascalientes, México. Para lograrlo, se realizaron 44 muestreos de observación de aves desde febrero de 2015 a septiembre de 2019 y se elaboró un inventario de las especies que habitan en el área. La avifauna del lugar está representada por 30 familias, 55 géneros y 60 especies. Las familias mejor representadas son Tyrannidae con nueve especies, seguida por Columbidae, Parulidae y Passerellidae, con cuatro cada una. Entre las aves registradas se encuentra aguillilla aura (*Buteo albonotatus*) y el halcón peregrino (*Falco peregrinus*), enlistadas como sujetas a protección especial y el pato mexicano (*Anas diazi*) como amenazada. El JBRN es un área importante no sólo por su valor como colección científica sino por su papel como refugio para varias especies de aves.

### Palabras clave:

Área verde urbana  
Avifauna  
Biodiversidad  
Conservación

### Keywords:

Urban Green area  
Avifauna  
Biodiversity  
Conservation

## Birds of the Botanical Garden 'Rey Nezahualcóyotl' of the Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico

### Abstract

Botanical gardens play an important role as a refuge for wildlife and represent ideal areas for birdlife conservation. The objective of the present work was to generate a list of birds present in the botanical garden 'Rey Nezahualcoyotl' of the Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, in Aguascalientes City, Mexico. To achieve this, 44 bird observation samplings were carried out from February 2015 to September 2019 and an inventory of the species that inhabit the area was prepared. The local birdlife is represented by 30 families, 55 genera and 60 species. The best represented families are Tyrannidae with nine species, followed by Columbidae, Parulidae and Passerellidae with four each. Of the registered birds, the Zone-tailed Hawk (*Buteo albonotatus*) and the Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*), are listed as subject to special protection, and the Mexican Duck (*Anas diazi*) as threatened. The botanical garden 'Rey Nezahualcoyotl' is an important area not only for its value as a scientific collection but for its role as a refuge for various species of birds.

### \* Autor para correspondencia:

Departamento de Biología,  
Centro de Ciencias Básicas,  
Universidad Autónoma de  
Aguascalientes. Av.  
Universidad # 940, Ciudad  
Universitaria, CP. 20131,  
Aguascalientes,  
Aguascalientes, México.  
Teléfono: +52 449 9107400  
ext. 334.  
Correo-electrónico:  
m.higinio.s@hotmail.com

## 1. Introducción

México es considerado uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo, ocupando el onceavo lugar en riqueza de aves (Navarro-Sigüenza et al., 2014), ya que al menos 1,117 especies habitan en el país (Berlanga et al., 2019), de las cuales 240 residen en el estado de Aguascalientes (De la Riva-Hernández y Franco Ruiz-Esparza, 2008).

Hasta donde tenemos conocimiento, en Aguascalientes hay pocos estudios publicados donde se haya evaluado la riqueza de especies de aves en ambientes alterados por el humano. Los registros comprenden una guía de aves de un parque urbano (Lozano-Román, 2007) y una investigación realizada en una zona rural al sur del municipio de Aguascalientes (Arellano-Delgado et al., 2018), por lo que es notable la falta de estudios que involucren a la avifauna estatal, en especial dentro de zonas urbanas. Aunque la información existente se ve parcialmente cubierta gracias a las plataformas de ciencia ciudadana como eBird (2019) y Naturalista (2019), que funcionan para generar listas base de especies, es necesario realizar investigaciones específicas con metodología estandarizada.

Es sabido que, conforme las ciudades se amplían, también lo hacen los ecosistemas urbanos, los cuales integran la superficie total de la mancha urbana (MacGregor-Fors, 2019), esto incluye también a las múltiples áreas verdes, como parques y jardines, las cuales se convierten en sitios donde diversos organismos pueden habitar, forrajear e incluso reproducirse (Macías y Equihua, 2018). El Jardín Botánico Rey Nezahualcóyotl (JBRN) de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes (BUAA), surgió en 1989 con la iniciativa de contar con un espacio que pudiera representar la vegetación existente en el estado (Sigala-Rodríguez et al., 2014) y desde sus inicios, ha estado adscrito a la Asociación Mexicana de Jardines Botánicos.

Debido a que el JBRN es una colección que alberga diversas especies de plantas principalmente nativas y es un posible refugio para la fauna local, es necesario conocer la avifauna que ocurre de manera natural en esta área verde. El objetivo del presente trabajo fue generar un listado de las especies de aves que pueden observarse en el JBRN y aportar de esta forma al conocimiento de la biodiversidad que alberga el campus central de la BUAA, en la ciudad de Aguascalientes, México.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Área de estudio y muestreo

El JBRN se encuentra ubicado en la parte occidente del Campus central de la BUAA, dentro de la ciudad de Aguascalientes, en el estado del mismo nombre (Figura 1), cubre una superficie de poco más de 10,000 m<sup>2</sup> y cuenta con una mezquitera [zona en la que se conserva la vegetación original del sitio en la que predomina *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M.C. Johnst., conocido como

mezquite] y seis áreas de exhibición: arboreto, helechos, plantas medicinales, frutales, desérticas y tóxicas.

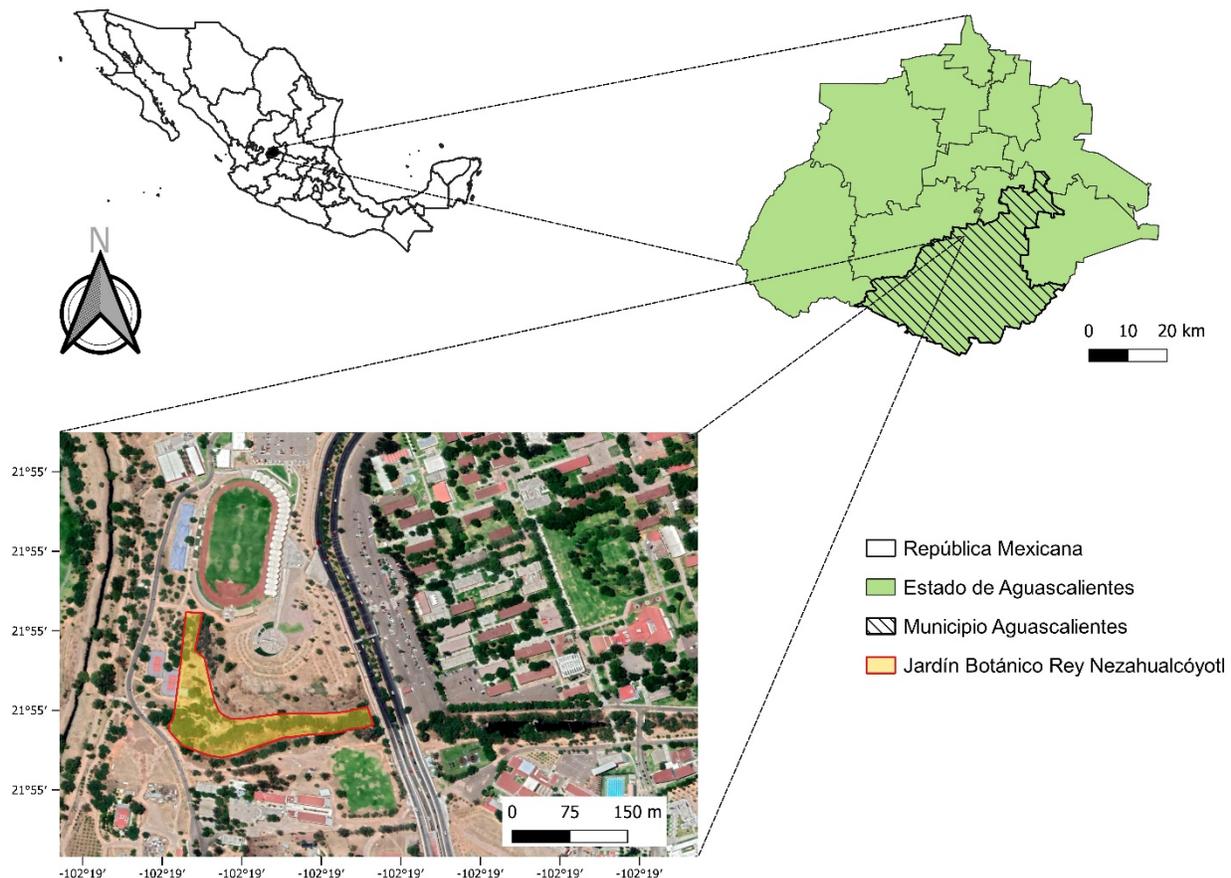
### 2.2. Observación e identificación de aves

Se realizaron 44 muestreos de observación de aves entre febrero de 2015 y septiembre de 2019, las observaciones desde 2015 hasta febrero de 2019 se realizaron en horarios matutinos tardíos y vespertinos poco después del mediodía, mientras que los muestreos de marzo a septiembre de 2019 se realizaron durante las mañanas, a las 7:30 horas. La duración de cada muestreo fue de tres horas en promedio. Para realizar las observaciones, se utilizó el seguimiento de ruta simple (Bibby et al., 1992), avanzando sobre el sendero principal del jardín botánico, registrando a todas las especies posibles.

El registro se realizó de forma directa (al observar a los individuos) e indirecta (al escuchar vocalizaciones u otros sonidos). Las especies fueron identificadas mediante guías de campo impresas (Alderfer, 2006; Del Olmo y Roldán, 2013; Lozano-Román, 2007; Pérez-Chávez et al. 1996; Peterson y Chalif, 2008; Van-Perlo, 2006) así como una guía digital (Merlin Bird ID, 2018). Se siguió la nomenclatura propuesta por Clements et al. (2019) y se determinó la estacionalidad de las especies en la zona con los mapas e información de la plataforma *Birds of the World* (Billerman et al., 2020). Además, se revisaron e incorporaron los registros de eBird (2019) y Naturalista (2019) para complementar la lista.

## 3. Resultados y Discusión

Dentro del listado de aves, se registraron 30 familias, 55 géneros y 60 especies en el JBRN (Cuadro 1), de las cuales 59 fueron observadas durante los muestreos. La familia mejor representada fue Tyrannidae con nueve especies, le siguen en importancia las familias Columbidae, Parulidae y Passerellidae, con cuatro cada una, mientras que el resto están representadas por tres a una solamente. La estacionalidad de las especies se encuentra dominada por las aves residentes, con 44 especies, seguidas de 11 que son migratorias de invierno y cinco migratorias de verano. Comparado con las 240 especies mencionadas por De la Riva-Hernández y Franco Ruiz-Esparza (2008), en el JBRN se representa el 25% de la avifauna reportada a nivel estatal. Las aves más representativas, debido a que fueron avistadas en más muestreos, son *Columbina inca* (Figura 2A), *Cyananthus latirostris* (Figura 2B), *Pyrocephalus rubinus* (Figura 2C), *Tyrannus vociferans* (Figura 2D), *Sporophila torqueola* (Figura 2E), *Haemorhous mexicanus* (Figura 2F), *Spinus psaltria* (Figura 2G), *Quiscalus mexicanus* (Figura 2H) y *Passer domesticus* (Figura 2I).



**Figura 1.** Ubicación del Jardín Botánico Rey Nezahualcóyotl de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, del municipio Aguascalientes, en el estado de Aguascalientes, México.

Por otro lado, algunos registros destacables, que han sido avistados solo una vez durante los muestreos y que han podido ser fotografiados, son el aguililla aura (*Buteo albonotatus*, Figura 3A) y el chinito (*Bombycilla cedrorum*, Figura 3B). Esta última, es un ave migratoria de invierno que ya había sido reportada para el campus de la BUAA (Pérez-Chávez et al., 1996) y otro sitio dentro de la ciudad (Lozano-Román, 2007) y que en la actualidad es cada vez menos común en México, donde puede ser avistada en intervalos de tres o cuatro años en ciertas localidades (Witmer et al., 2020). Por otro lado, *Buteo albonotatus* es una rapaz que puede observarse en Aguascalientes (eBird, 2019), probablemente debido a que el Estado se encuentra en un punto medio entre los territorios de invierno y verano de esta especie (Johnson et al., 2020) y que además se enlista como sujeta a protección especial en la NOM-059-SEMARNAT (SEMARNAT, 2010), al igual que el halcón peregrino (*Falco peregrinus*), que a diferencia de *B. albonotatus* ha sido registrada en varias ocasiones.

Otro avistamiento raro en el sitio es el del carpintero bellotero (*Melanerpes formicivorus*), para el que se cuenta

con un solo registro, correspondiente a un individuo probablemente en tránsito o vagante, ya que tanto el JBRN como las zonas aledañas carecen de bosques de *Quercus* L. (Siqueiros-Delgado et al., 2017), los cuales son fundamentales para la presencia de esta ave, debido a que se alimenta de las bellotas producidas por las especies de este género (Koenig et al., 2020).

Hasta el momento, el pato mexicano (*Anas diazi*) es la única especie bajo categoría de amenazada que puede encontrarse en el JBRN, donde no es raro observarla, al igual que en otras áreas verdes con cuerpos de agua permanentes presentes en el campus. Esta ave ha sido registrada también en un parque dentro de la ciudad (Lozano-Román, 2007) y en una zona rural del municipio de Aguascalientes (Arellano-Delgado et al., 2018), por lo que es posible que sea beneficiada por la presencia humana, que les proporciona sitios con cuerpos de agua permanentes como presas, estanques y abrevaderos.

**Cuadro 1.** Especies de aves registradas en el Jardín Botánico Rey Nezahualcóyotl de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, de la ciudad de Aguascalientes, México.

Familia	Especie	Presente estudio	Naturalista	eBird	<sup>1</sup> Est.	<sup>2</sup> Categoría de Protección
Anatidae	<i>Anas diazi</i>	X		X	R	A
Columbidae	<i>Columba livia</i>	X		X	R	
	<i>Columbina inca</i>	X	X	X	R	
	<i>Zenaida asiatica</i>	X		X	R	
	<i>Z. macroura</i>	X		X	R	
Cuculidae	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	X		X	R	
Trochilidae	<i>Cyanthus latirostris</i>	X	X	X	R	
	<i>Amazilia violiceps</i>	X		X	R	
Charadriidae	<i>Charadrius vociferus</i>	X		X	R	
Ardeidae	<i>Ardea alba</i>	X		X	R	
	<i>Egretta thula</i>	X		X	R	
	<i>Nycticorax nycticorax</i>		X		R	
Cathartidae	<i>Cathartes aura</i>	X	X	X	R	
Accipitridae	<i>Buteo albonotatus</i>	X			MI	Pr
Tytonidae	<i>Tyto alba</i>	X		X	R	
Picidae	<i>Melanerpes aurifrons</i>	X		X	R	
	<i>M. formicivorus</i>	X			R	
	<i>Dryobates scalaris</i>	X		X	R	
Falconidae	<i>Caracara cheriway</i>	X			R	
	<i>Falco sparverius</i>	X		X	R	
	<i>F. peregrinus</i>	X		X	MI	Pr
Tyrannidae	<i>Camptostoma imberbe</i>	X	X	X	R	
	<i>Sayornis nigricans</i>	X	X	X	R	
	<i>S. saya</i>	X		X	R	
	<i>Myiarchus tyrannulus</i>	X			MV	
	<i>Pyrocephalus rubinus</i>	X	X	X	R	
	<i>Pitangus sulphuratus</i>	X		X	R	
	<i>Tyrannus vociferans</i>	X	X	X	R	
	<i>Contopus sordidulus</i>	X			MV	
	<i>Empidonax minimus</i>	X			MI	
Laniidae	<i>Lanius ludovicianus</i>	X		X	R	
Corvidae	<i>Corvus corax</i>	X		X	R	
Remizidae	<i>Auriparus flaviceps</i>	X	X	X	R	
Aegithalidae	<i>Psaltriparus minimus</i>	X	X	X	R	
Hirundinidae	<i>Hirundo rustica</i>	X			MV	
Poliopitilidae	<i>Poliopitila caerulea</i>	X	X	X	MI	
Troglodytidae	<i>Thryomanes bewickii</i>	X		X	R	
	<i>Campylorhynchus brunneicapillus</i>	X	X	X	R	
Sturnidae	<i>Sturnus vulgaris</i>	X		X	R	
Mimidae	<i>Toxostoma curvirostre</i>	X	X	X	R	
	<i>Turdus rufopalliatus</i>	X		X	R	
Bombycillidae	<i>Bombycilla cedrorum</i>	X			MI	
Ptiliognatidae	<i>Phainopepla nitens</i>	X		X	R	
Passeridae	<i>Passer domesticus</i>	X		X	R	
Fringillidae	<i>Haemorhous mexicanus</i>	X	X	X	R	
	<i>Spinus psaltria</i>	X	X	X	R	
Passerellidae	<i>Chondestes grammacus</i>	X		X	MI	
	<i>Melospiza lincolni</i>	X	X	X	MI	
	<i>Spizella passerina</i>	X			R	
	<i>Melospiza fusca</i>	X		X	R	
Icteridae	<i>Icterus abeillei</i>	X		X	MV	
	<i>Molothrus aeneus</i>	X			R	
	<i>Quiscalus mexicanus</i>	X	X	X	R	

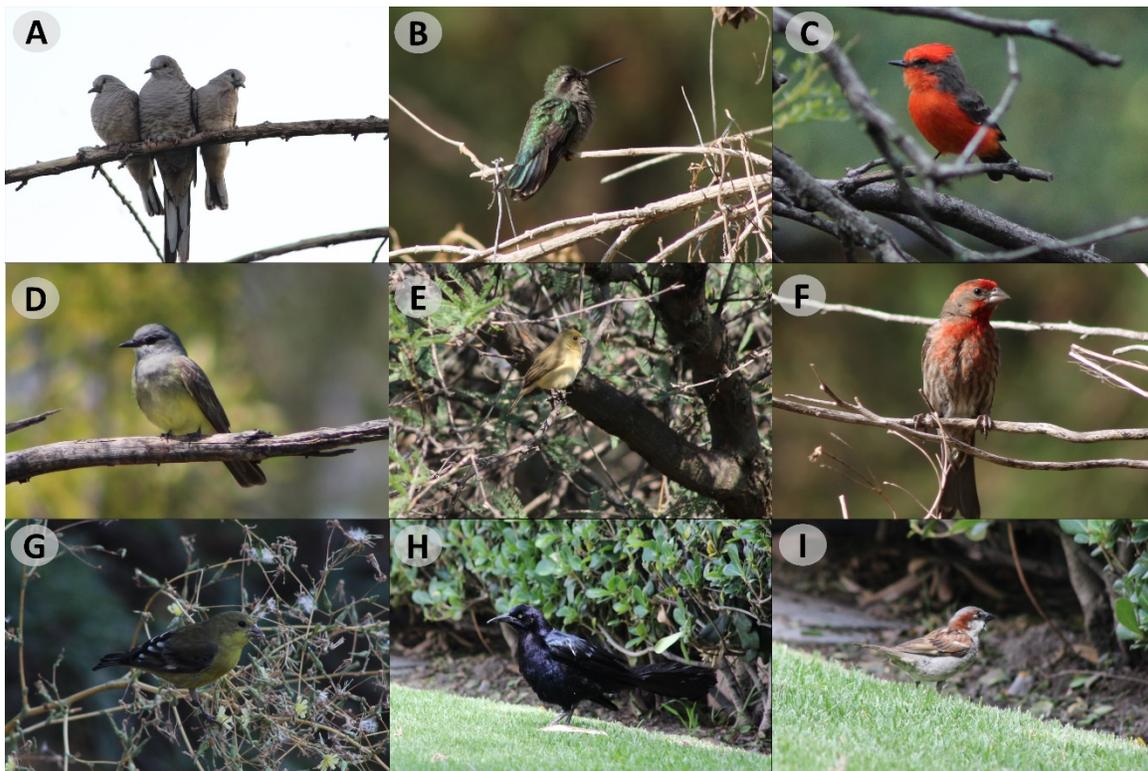
<sup>1</sup>Estacionalidad: R = residente, MI = migratorio de invierno, MV = migratorio de verano, T = transitorio (Billerman et al., 2020).

<sup>2</sup>Categoría de Protección: A= amenazada, Pr= sujetas a protección especial. (SEMARNAT, 2010).

**Cuadro 1.** Continuación

Familia	Especie	Presente estudio	Naturalista	eBird	<sup>1</sup> Est.	<sup>2</sup> Categoría de Protección
Parulidae	<i>Leiothlypis celata</i>	X		X	MI	
	<i>Setophaga petechia</i>	X		X	MV	
	<i>S. coronata</i>	X	X	X	MI	
	<i>Cardellina pusilla</i>	X	X	X	MI	
Cardinalidae	<i>Piranga ludoviciana</i>	X		X	MI	
	<i>Passerina caerulea</i>	X		X	R	
Thraupidae	<i>Sporophila torqueola</i>	X		X	R	

<sup>1</sup>Estacionalidad: R = residente, MI = migratorio de invierno, MV = migratorio de verano, T = transitorio. (Billerman et al., 2020).  
<sup>2</sup>Categoría de Protección: A= amenazada, Pr= sujetas a protección especial. (SEMARNAT, 2010).



**Figura 2.** Especies comunes en el Jardín Botánico Rey Nezahualcóyotl de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, en la ciudad de Aguascalientes, México. A) tortolita cola larga (*Columbina inca*); B) colibrí pico ancho hembra (*Cyanthus latirostris*); C) papamoscas cardenalito macho (*Pyrocephalus rubinus*); D) tirano chibiú (*Tyrannus vociferans*); E) semillero rabadilla canela hembra (*Sporophila torqueola*); F) pinzón mexicano macho (*Haemorhous mexicanus*); G) jilguero dominico hembra (*Spinus psaltria*); H) zanate mayor macho (*Quiscalus mexicanus*); I) gorrión doméstico macho (*Passer domesticus*). Fotografías por Avilés-Piña.

Las palomas son aves comunes en los jardines botánicos de América (Correa et al., 2014; Fuentes-Prado, 2010) y en el JBRN la familia Columbidae es una de las mejor representadas, principalmente por tres especies: *Columbina inca*, *Zenaida asiatica* y *Z. macroura*, que al igual que gran parte de los integrantes de esta familia presentan alimentación de tipo granívora y forrajeo sobre el suelo (González-Salazar et al., 2014), que aprovechan las semillas de pastos y otras plantas herbáceas que aparecen de manera espontánea en las distintas áreas de la colección como *Amaranthus hybridus* L., *Chenopium album* L. y *Lepidium virginicum* L.

Otro gremio alimenticio bien representado es el de las aves insectívoras, en el que destacan *Pitangus sulphuratus*, *Pyrocephalus rubinus* y *Tyrannus vociferans* por ser especies neotropicales de plumaje llamativo o de vocalizaciones distintivas (Winkler et al., 2020), además de estar presentes en el sitio durante todo el año. Estas y las que integran este gremio aprovechan los artrópodos presentes en el JBRN, al igual que sucede en otros jardines botánicos, donde las aves insectívoras se encuentran entre los grupos con mayor cantidad de especies (Correa et al., 2014; Fuentes-Prado, 2010).



**Figura 3.** Avistamientos destacables en el Jardín Botánico Rey Nezahualcóyotl de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, en la ciudad de Aguascalientes, México. A) aguililla aura (*Buteo albonotatus*), B) chinito (*Bombycilla cedrorum*). Fotografías por Carrillo-Martínez.

Se ha considerado a los jardines botánicos como sitios de conservación para la avifauna, ya que funcionan como refugios para especies residentes y migratorias (Correa et al., 2014); lo cual ocurre en el JBRN, donde registramos aves residentes y migratorias de invierno y verano. Al aprovechar los recursos presentes en la zona de estudio, el JBRN se podría ver beneficiado con la presencia de especies de aves insectívoras y carnívoras, ya que estas pueden ayudar a controlar ciertas plagas, tanto de vertebrados (Muñoz-Pedrerros, 2004), como de invertebrados (Graber y Graber, 1983). Además, la presencia de especies nectarívoras como los colibríes (*Cynanthus latirostris* y *Amazilia violiceps*) ayudan a la reproducción de varios ejemplares del jardín, ya que se sabe que este grupo de aves poliniza una gran variedad de plantas (Del Coro-Arizmendi y Berlanga, 2014), por lo que la avifauna representa un elemento importante para la colección y brinda servicios para su bienestar.

Se recomienda realizar muestreos durante y después del ocaso, para determinar si en el área ocurren especies de hábito nocturno que no han podido registrarse durante los recorridos matutinos y vespertinos

#### 4. Conclusión

El Jardín Botánico Rey Nezahualcóyotl de la Benemérita Universidad Autónoma de Aguascalientes, en la ciudad de Aguascalientes, México es un área importante no solo como colección científica, sino también por su función como refugio para aves residentes y migratorias que pueden hacer uso de la vegetación presente.

#### Agradecimientos

Agradecemos a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por los fondos otorgados a través del programa de Miniproyectos 2019, de donde se deriva parte del presente trabajo. Gracias a P. Avilés-Hernández y J. F. Gutiérrez Jiménez por su apoyo durante los muestreos. Y gracias a C. E. Valdivia-Muñoz por el préstamo de herramientas fotográficas.

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### Referencias

- Alderfer J. 2006. Field guide to the bird of North America. 5a. Edición. National Geographic Society. EUA.
- Arellano-Delgado M, Guerra-Quezada F, Cabrera-Manuel F, Sandoval-Ortea MH, Araiza-Arvilla HN. 2018. Avifauna de la comunidad de La Lumbreira (Cieneguilla), Aguascalientes, Aguascalientes, México. *Tecnociencia Chihuahua* 12(2): 114-123.
- Berlanga H, Gómez de Silva H, Vargas-Canales VM, Rodríguez-Contreras V, Sánchez-González LA, Ortega-Álvarez R, Calderón-Parra R. 2019. Aves de México: Lista actualizada de especies y nombres comunes. Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad. México.
- Bibby CJ, Burgess ND, Hill DA. 1992. Bird Census Techniques. Academic Press. EUA.
- Billerman SM, Keeney BK, Rodewald PG, Schulenberg TS. 2020. Birds of the World. Cornell Laboratory of Ornithology. EUA. <https://birdsoftheworld.org/bow/home> (consultado 31 de mayo de 2020).
- Clements JF, Schulenberg TS, Iliff MJ, Billerman SM, Fredericks TA, Sullivan BL, Wood CL. 2019. The eBird/Clements Checklist of Birds of the World: v2019. Cornell Laboratory of Ornithology. EUA.
- Correa C, Solórzano A, Verecía C. 2014. La avifauna del Jardín Botánico Universitario “Baltasar Trujillo”, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. *Revista Venezolana de Ornitología* 4: 4-17.
- De la Riva-Hernández G, Franco Ruiz-Esparza V. 2008. Aves. En: La Biodiversidad en Aguascalientes, estudio de Estado. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto del Medio Ambiente del Estado de Aguascalientes, Universidad Autónoma de Aguascalientes. Pp. 148-161.
- Del Coro-Arizmendi M, Berlanga H. 2014. Colibríes de México y Norteamérica. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Del Olmo LG, Roldán E. 2013. Aves Comunes de la Ciudad de México. Bruja de Monte, CONABIO. México.
- eBird. 2019. eBird – Descubre una nueva forma de pajarear. Cornell Laboratory of Ornithology, Cornell University. Ithaca, Nueva York, EUA. <https://ebird.org> (consultado 20 de octubre de 2019).
- Fuentes-Pardo GE. 2010. Caracterización de la Avifauna del Jardín Botánico de Cali y Ecoparque Río Cali. Universidad del Valle. Colombia.
- Graber JW, Graber RR. 1983. Feeding rates of warblers in spring. *Condor* 85: 139-150.
- González-Salazar C, Martínez-Meyer E, López-Santiago G. 2014. A hierarchical classification of trophic guilds for North American birds and mammals. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 931-941.
- Johnson RR, Glinski RL, Matteson SW. 2020. Zone-tailed Hawk (*Buteo albonotatus*), version 1.0. En: Poole AF, Gill FB (eds). Birds of the World. Cornell Laboratory of Ornithology. EUA.
- Lozano-Román LF. 2007. Guía de Aves de la presa El Cedazo,

- ciudad de Aguascalientes. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto del Medio Ambiente del Estado de Aguascalientes. México.
- Koenig WD, Walters EL, Stacey PB, Stanback MT, Mumme RL. 2020. Acorn Woodpecker (*Melanerpes formicivorus*), version 1.0. En: Rodewald PG, Keeney BK. (eds). Birds of the World. Cornell Laboratory of Ornithology. EUA.
- MacGregor-Fors I. 2019. Migrando a la ciudad: Ecología de aves migratorias neártico-neotropicales en áreas urbanas. Conferencia magistral, XVII Congreso para el estudio y conservación de las aves en México. México.
- Macías C, Equihua Z. 2018. Las aves urbanas en la ruidosa primavera...y en el verano y el otoño y el invierno. En: Eguiarte LE. (ed.). El año de las aves. Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp. 24–27.
- Merlin Bird ID. 2018. Bird ID Wizard. Cornell Lab of Ornithology. EUA. <https://merlin.allaboutbirds.org/> (consultado 10 de septiembre de 2019).
- Muñoz-Pedrerros A. 2004. Aves rapaces y control biológico de plagas. En: Muñoz-Pedrerros A., Rau J., Yáñez J. (eds). Aves rapaces de Chile. CEA Ediciones. Chile. Pp. 307-334.
- Naturalista. 2019. Una red para naturalistas. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. <https://naturalista.mx> (consultado 20 de octubre de 2019).
- Navarro-Sigüenza AG, Rebón-Gallardo MF, Gordillo-Martínez A, Peterson AT, Berlanga-García H, Sánchez-González L. 2014. Biodiversidad de aves en México. Revista Mexicana de Biodiversidad supl.85: S476–S495.
- Pérez-Chávez MS, Bayona-Celis A, Pérez-Orona M. 1996. Aves de Aguascalientes. Centro de Investigación y Estudios Multidisciplinarios de Aguascalientes, Gobierno del Estado de Aguascalientes. México.
- Peterson RT, Chalif EL. 2008. Aves de México. Editorial Diana. México.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación. Cd. Mx., México. [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010).
- Sigala-Rodríguez JJ, Barba-Ávila MD, Meza-Rangel E, Castorena-Esparza G, González-Adame G. 2014. La Biología en la UAA: 40 años de desarrollo. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México.
- Siqueiros-Delgado ME, Rodríguez-Ávalos JA, Martínez-Ramírez J, Sierra-Muñoz JC, García-Regalado G. 2017. Vegetación del estado de Aguascalientes. Universidad Autónoma de Aguascalientes, Comisión Nacional para el Uso y Conocimiento de la Biodiversidad. México.
- Van-Perlo B. 2006. A field guide to the birds of Mexico and Central America. Harper Collins Publisher. Inglaterra.
- Winkler DW, Billerman SM, Lovette IJ. 2020. Tyrant Flycatchers (Tyrannidae), version 1.0. En: Billerman SM, Keeney BK, Rodewald PG, Schulenberg TS. (eds.). Birds of the World. Cornell Lab of Ornithology. EUA.
- Witmer MC, Mountjoy DJ, Elliot L. 2020. Cedar Waxwing (*Bombycilla cedrorum*), version 1.0. En: Poole AF. (ed). Birds of the World. Cornell Laboratory of Ornithology. EUA.



## Optimización de la viabilidad de bacterias ácido lácticas incorporadas en películas de quitosán

Zurisadai Maldonado-Alvarado, Alfredo Vázquez-Ovando\*, Gamaliel Velázquez-Ovalle, Rito Coronel-Niño

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

### Resumen

El atrapamiento de células en matrices poliméricas es una estrategia empleada para mantener la viabilidad. El quitosán posee propiedades funcionales que lo hacen adecuado para elaborar películas conteniendo microorganismos. Mediante un diseño de Plackett Burman y de Superficie de Respuesta, se evaluaron 7 factores y se combinaron componentes de la biopelícula de quitosán para optimizar la viabilidad de bacterias ácido lácticas incorporadas a la matriz. Se mantuvo un nivel de viabilidad de 39.32% en la etapa de cribado de los factores, siendo el tipo de quitosán y el tipo de ácido orgánico los de mayor efecto. La concentración de células y el tipo de carbohidrato empleados no ejercieron ningún efecto sobre la viabilidad. Después de optimizar los factores, se incorporaron  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de bacterias ácido lácticas en películas con la composición de, 1.5% de quitosán de bajo peso molecular, 1.5% de ácido láctico, pH de 4.5, 0.1 M de lactosa y almacenadas bajo condiciones de 90% HR. Las películas elaboradas con éstas condiciones mantuvieron 90.75% de la viabilidad de las células después de 7 días de almacenamiento. Este estudio demuestra que el efecto antimicrobiano del quitosán no afecta en gran medida la viabilidad de las BAL en períodos cortos de almacenamiento.

## Optimizing the viability of lactic acid bacteria incorporated into chitosan films

### Abstract

Cells entrapment in polymeric matrices is a strategy employed to maintain viability. Chitosan has functional properties that make it suitable for making films containing microorganisms. Using a Plackett Burman and Response Surface design, seven factors were evaluated and the components of the chitosan biofilm were combined for optimizing the viability of lactic acid bacteria incorporated into the matrix. A viability of 39.32% was maintained in the factor screening stage, with the type of chitosan and the type of organic acid having the greatest effect. The concentration of cells and the type of carbohydrate used had no effect on viability. After optimizing the factors,  $10^6$  CFU mL<sup>-1</sup> of lactic acid bacteria were incorporated into films with the composition of 1.5% low molecular weight chitosan, 1.5% lactic acid, pH 4.5, 0.1 M lactose and stored under 90% RH conditions. Films made under these conditions maintained 90.75% of cell viability after 7 days of storage. Our results demonstrate that the antimicrobial effect of chitosan does not greatly affect the viability of BALs in short storage periods.

### Palabras clave:

Lactosa  
MTT  
Plackett Burman  
Superficie de Respuesta

### Keywords:

Lactose  
MTT  
Plackett Burman  
Response Surface

### \* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,  
Universidad Autónoma de  
Chiapas.  
Boulevard Príncipe Akishino  
sin número. Colonia  
Solidaridad 2000, CP.  
30798.  
Tapachula, Chiapas, México.  
Teléfono: + 52 9626427972  
Correo-electrónico:  
jose.vazquez@unach.mx

## 1. Introducción

El uso de películas o recubrimientos comestibles es una tecnología que se ha adoptado de manera acelerada en la industria de los alimentos. Su principal uso se orienta al alargamiento de la vida de anaquel, de frutos y hortalizas, manteniendo los atributos de calidad e inocuidad que pueden ser alterados durante la etapa de almacenamiento (Monzón-Ortega et al., 2018). Las películas comestibles son matrices continuas elaboradas con distintas biomoléculas (proteínas, polisacáridos, lípidos y otras) solas o combinadas (Neetoo y Chen, 2007). Los polisacáridos (almidón, carragenanos, pectina, quitosán, celulosa) son los polímeros más empleados para formar películas comestibles, debido a que cuando se forman, las películas funcionan de manera eficiente como barreras contra la humedad y el paso de gases y debido a que tienen propiedades mecánicas deseables para ser usadas incluso como bioplásticos. Las elaboradas con quitosán han sido de las más empleadas, debido a que además de formar películas con propiedades mecánicas deseables se reporta que posee actividad antimicrobiana (Salvador-Figueroa et al., 2017).

Además, las películas elaboradas con biopolímeros también pueden ser utilizadas como vehículos para la incorporación de agentes antimicrobianos, sustancias de interés farmacéutico, entre otros. Varios estudios han demostrado la efectividad de la incorporación de conservadores naturales en películas de quitosán, tales como aceites esenciales (Salvador-Figueroa et al., 2017; Seydim y Sarikus, 2006), donde se ha demostrado que la incorporación disminuyó el crecimiento de patógenos en la superficie de alimentos, con lo cual se consiguió el aumento en la vida de anaquel (Seydim y Sarikus, 2006).

Del mismo modo que se incorporan sustancias activas, en las películas se pueden incorporar enzimas o microorganismos que realicen una función específica, tal como bacterias ácido lácticas (BAL) las cuales, se ha demostrado producen sustancias como peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético, etc.) que inhiben el crecimiento de agentes que causan la descomposición de los alimentos. La incorporación de BAL en películas permite obtener películas con capacidad de controlar microorganismos indeseables en alimentos tales como bacterias (Cálix y Rajendran, 2014) y hongos (Marín et al., 2019).

Sin embargo, cuando estos microorganismos requieren ser atrapados o inmovilizados en matrices poliméricas, debe tomarse en cuenta que varios factores pueden afectar su viabilidad. Se ha reportado que el pH más adecuado para mantener la viabilidad de bacterias ácido lácticas oscila entre 3.5 y 4.5 (Adamberg et al., 2003). Igualmente, se reporta que cuando las células no son deshidratadas (por liofilización, pulverización otro método) previo a la incorporación en la matriz, resulta altamente favorable mantener condiciones de humedad alta, tal como se reporta en películas elaboradas con alginato de calcio (Concha et

al., 2011). En otros reportes se ha demostrado que los oligosacáridos (Romano et al., 2014) o el gel de *Aloe vera* (Barragán-Menéndez et al., 2020) pueden ser empleados como fuente de nutrimentos para mantener la viabilidad e incluso la funcionalidad de las bacterias incorporadas como controladoras de *Listeria monocytogenes* (Concha et al., 2011, Hartmann et al., 2011).

Algunas de las características requeridas por las bacterias atrapadas pueden ser proporcionadas el quitosán, sin embargo, los estudios reportados se enfocan principalmente en el uso de otros polímeros como alginato o almidón (Cálix y Rajendran, 2014; Marín et al., 2019) o usan quitosán en combinación con otros polímeros (Barragán-Menéndez et al., 2020), suponiendo que el efecto antimicrobiano del quitosán puede ser un factor adverso en la viabilidad de las BAL. Con base en nuestra experiencia previa, planteamos la hipótesis que el quitosán puede mantener la viabilidad de las BAL, por lo que el objetivo del presente trabajo fue optimizar la viabilidad de bacterias ácido lácticas incorporadas en películas de quitosán modificando los componentes de la misma.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Bacterias ácido lácticas

Dos cepas de bacterias codificadas como BAL5 y BAL11 fueron proporcionadas por el cepario del Instituto de Biociencias (IBC) de la Universidad Autónoma de Chiapas (UNACH), las cuales fueron sometidas a pruebas bioquímicas y morfológicas y han sido caracterizadas como bacterias ácido lácticas. Las BAL fueron reactivadas en caldo MRS y mantenidas en agitación para su crecimiento. Para estimar el tiempo requerido para obtener la máxima concentración de BAL en los cultivos puros se llevaron a cabo cinéticas de crecimiento para cada una de las cepas. El pre-inóculo de BAL se creció en tubos de 13x100 conteniendo 3 mL de medio durante 48 h, luego el contenido se inoculó en matraces de Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de caldo MRS fresco y a partir del tiempo de la inoculación cada 5 h se tomaron 3 mL con los cuales se midió la absorbancia a 560 nm (usando medio de cultivo como blanco) además se inocularon diluciones seriadas en medio MRS para determinar la concentración celular (Barragán-Menéndez et al., 2020). Las lecturas fueron seguidas hasta que no se observó cambio en las unidades (UFC y absorbancia). Se graficó la absorbancia como una función de la concentración y por interpolación se calculó la DO correspondiente a la máxima concentración de bacterias ( $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>). De manera similar, se estimó el tiempo para alcanzar esta DO. Se establecieron los tiempos para alcanzar una DO de  $1 \pm 0.05 = 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, siendo 24 h para la cepa BAL5 y 48 h para la cepa BAL11.

### 2.2. Optimización de la viabilidad de las BAL

Primeramente, para determinar los factores de la composición de la película de quitosán que mayor

influencia ejercen sobre la viabilidad de bacterias ácido lácticas (BAL), se condujo un diseño experimental de cribado del tipo Plackett- Burman mediante un arreglo de 8 tratamientos o combinaciones, 7 factores (Tipo de quitosán, tipo de ácido orgánico, pH final, humedad relativa del ambiente, tipo de sustrato, concentración de BAL y contenido de humedad de la película) (Cuadro 1). Los niveles de cada factor fueron codificados con 1, -1 y

corresponden, dependiendo del factor a: Tipo de quitosán (1=quitosán de alto peso molecular, -1=quitosán de bajo peso molecular); tipo de ácido orgánico (1=ácido acético, -1=ácido láctico); pH (1=4.5, -1=3.5); humedad relativa del ambiente (1=90%, -1=70%); tipo de carbohidrato (1=glucosa, -1=lactosa); concentración de BAL (1= $10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , -1= $10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ); humedad de la biopelícula (1=>25% de humedad, -1=20% de humedad).

**Cuadro 1.** Arreglo de Plackett- Burman de ocho tratamientos para evaluar la interacción de siete factores de la composición del medio en la viabilidad de bacterias ácido lácticas.

Combinación/ Tratamiento	Factores						
	Tipo de quitosán	Tipo de ácido	pH	HR del ambiente	Tipo de carbohidrato	Concentración de BAL	Humedad de la biopelícula
1	1	-1	-1	1	-1	1	1
2	1	1	-1	-1	1	-1	1
3	1	1	1	-1	-1	1	-1
4	-1	1	1	1	-1	-1	1
5	1	-1	1	1	1	-1	-1
6	-1	1	-1	1	1	1	-1
7	-1	-1	1	-1	1	1	1
8	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Dependiendo del factor, los números (1, -1) representan; Tipo de quitosán: 1=quitosán de alto peso molecular, -1=quitosán de bajo peso molecular; tipo de ácido: 1=ácido acético, -1=ácido láctico; pH 1=4.5, -1=3.5; HR: 1=90%, -1=70%; tipo de sustrato: 1= glucosa, -1=lactosa; concentración de BAL 1= $10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , -1= $10^9$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ ; humedad de la biopelícula: 1=>25% de humedad, -1=20% de humedad. HR: humedad relativa.

Posteriormente, los dos factores cuyo efecto resultó altamente significativo ( $\alpha=0.000059$ ) sobre la viabilidad de las BAL, fueron usados como parámetros para optimizar la composición de las películas mediante el diseño de superficie de respuesta. Se estableció una matriz factorial de nueve tratamientos en tres niveles para cada factor (Cuadro 3). Las películas para estos tratamientos, tuvieron la siguiente composición base: pH 4.5, >25% de humedad de la biopelícula, 0.1 M de lactosa como carbohidrato, concentración de  $10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  y una humedad relativa del ambiente mayor del 90%.

### 2.3. Elaboración de mezcla de soluciones para películas

Las soluciones para formar las películas fueron elaboradas siguiendo el procedimiento descrito por Binsini et al. (2013), empleando como polímero base quitosán al 1.5% p/v (alto o bajo peso molecular, según el tratamiento). Para lograr >25% de humedad de la matriz en los tratamientos correspondientes, primeramente se preparó una solución de almidón al 3% (p/v), la cual se sometió a calentamiento (85 °C) y agitación, hasta la gelatinización completa del almidón. Posteriormente la solución de almidón se mezcló en una proporción 1:1 (v/v) con la solución de quitosán. A partir de aquí se siguió el mismo procedimiento para los demás tratamientos. Según el tratamiento correspondiente, se ajustó el pH (4.5 o 3.5) con un ácido orgánico (acético o láctico). Las soluciones se agitaron hasta disolución completa del quitosán. Posteriormente, se adicionaron a las soluciones 100 mM de glucosa o, 100 mM de lactosa (según el tratamiento).

### 2.4. Incorporación de bacterias y formación de películas

El volumen de solución (medio de cultivo agotado) requerido para obtener las BAL (en función del tratamiento) fue centrifugado a 2500  $\times g$  durante 20 min y el paquete celular lavado dos veces con buffer PBS de pH 7. Posteriormente, las células fueron incorporadas a las soluciones de quitosán, las cuales se agitaron mecánicamente hasta lograr la homogenización completa. Para la elaboración de las películas, siguiendo el método de *casting*, se vertieron 3 mL de la solución en cajas de Petri de 60 mm x 15 mm. Se dejó secar por 24 h a  $28 \pm 2$  °C; posteriormente fueron almacenados en un espacio común con condiciones de  $28 \pm 2$  °C, 70% de HR, 12 h luz y 12 h oscuridad y, exclusivamente para los tratamientos que requerían una humedad relativa de 90%, las películas se colocaron en recipientes cerrados conteniendo una solución saturada de sulfato de potasio. Por cada tratamiento se elaboraron 32 unidades experimentales (una unidad experimental fue una caja de Petri conteniendo una película).

### 2.5. Evaluación de la viabilidad celular

A partir del día de secado de las películas (día cero), cada 24 h y durante siete días se evaluó la viabilidad de las BAL siguiendo la metodología descrita por Hegyi et al. (2012), basado en la prueba de reducción del tetrazolio, conocida como MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Para esto, se pesaron 0.03 g (b.s.) de película (por cuadruplicado), y se colocaron en tubos viales de 2 mL, se les agregó 1 mL de caldo MRS (fresco y estéril) para lavado, posteriormente se centrifugó a 6000  $\times g$  durante

10 min, se retiró el sobrenadante y se le agregó 1 mL de buffer PBS pH 7, luego se agitó durante 10 min. Del contenido obtenido, se tomaron 50 µL y se colocaron en viales, se le adicionaron 50 µL de solución MTT (0.3% disuelto en buffer PBS y 0.2% de dimetilsulfóxido), se dejó incubar 4 h a 37 °C. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 1500 xg durante 20 min, posteriormente se le agregaron 150 µL de DMSO para disolver los cristales formados y se agitó durante 10 min (en vortex). A esta solución, se midió la densidad óptica a una longitud de onda de 492-630 en un lector de microplacas Microplate Reader®, empleando como blanco de calibración buffer PBS. Este mismo procedimiento fue seguido tomando 1 mL del cultivo de células de BAL para obtener la DO de las células control. La viabilidad (%) se calculó a partir de la fórmula = (DO células tratadas/DO células control) x 100.

2.6. Análisis estadístico

Para definir y evaluar el diseño experimental se empleó el software Statgraphic Centurion XV v. 15.2.06. Estableciendo un límite de confianza de 5%, se probó la significancia de los diseños experimentales de Plackett Burman y factorial, así como las interacciones entre los factores. También se obtuvo el modelo de regresión que mostró el mejor ajuste para la relación entre la variable independiente (viabilidad) y las independientes que explicaron el óptimo.

3. Resultados

En la Figura 1 se muestran los valores de viabilidad de las BAL (%) contenidas en las películas durante los 7 días en que fueron evaluados. Para el día 7, los tratamientos con mayor porcentaje de viabilidad fueron los tratamientos 4 (39.32%), 6 (27.64%), 7 (27.44%) y 8 (21.51%). Adicionalmente, las películas de estos tratamientos fueron visualmente menos quebradizas, más manejables y de mejor aspecto táctil que las del resto de los tratamientos. Lo

común en estos cuatro tratamientos fue que las películas fueron elaboradas con quitosán de bajo peso molecular (-1, Cuadro 1). Para verificar el efecto aparente de este factor, se analizó estadísticamente la contribución de cada factor tomando como referencia los datos solamente del día 4 de almacenamiento, como un punto medio del comportamiento de la viabilidad (Cuadro 2).

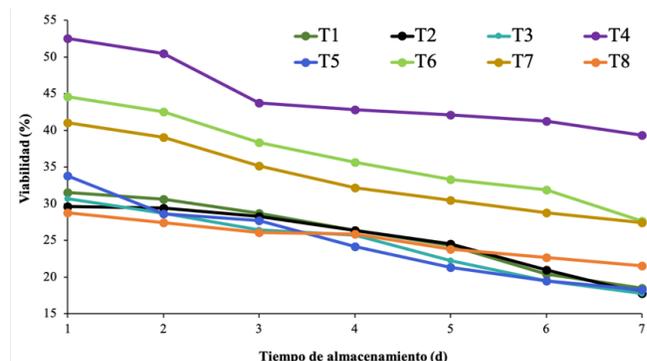


Figura 1. Tendencia de la viabilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) incorporadas en películas de quitosán durante 7 d de almacenamiento a temperatura ambiente. Los tratamientos (1-8) corresponden a la combinación de factores según el diseño de Plackett- Burman (ver Cuadro 1).

En el Cuadro 2 se puede observar como los factores tipo de quitosán y tipo de ácido tienen los valores absolutos más grandes, lo cual está denotando la mayor contribución a la viabilidad de las células. Sin embargo cuando los efectos fueron estandarizados, cinco de los siete factores resultaron significativos (P<0.05). Solamente el tipo de carbohidrato empleado como sustrato y la concentración de células incorporadas a la película no tuvieron efecto sobre la variable de respuesta (P>0.05). La magnitud y sentido de estos efectos puede dimensionarse con la visualización de la Figura 2.

Cuadro 2. Determinación efecto de los factores evaluados sobre la viabilidad de las bacterias ácido lácticas incorporadas en películas de quitosán.

Viabilidad (%) al día 4	Tipo de quitosán	Tipo de ácido	pH	HR del ambiente	Tipo de carbohidrato	Concentración de BAL	Humedad de la biopelícula
26.34964747	1	1	-1	1	1	1	1
26.34964747	1	-1	-1	-1	-1	-1	1
25.68061345	1	-1	1	-1	1	1	-1
42.81817714	-1	-1	1	1	1	-1	1
24.13668880	1	1	1	1	-1	-1	-1
35.61319541	-1	-1	-1	1	-1	1	-1
32.16509701	-1	1	1	-1	-1	1	1
25.88647007	-1	1	-1	-1	1	-1	-1
1	25.62915	27.13448	31.20014	32.22943	30.18373	29.95214	31.92064
-1	34.12073	32.61541	28.54974	27.52046	27.99650	29.79775	27.82924
<b>Efecto estimado</b>	-8.49159	-5.48093	2.650404	4.70897	2.18723	0.15439	4.09140

Dependiendo del factor, los números (1, -1) representan; Tipo de quitosán: 1=quitosán de alto peso molecular, -1=quitosán de bajo peso molecular; tipo de ácido: 1=ácido acético, -1=ácido láctico; pH 1=4.5, -1=3.5; humedad relativa ambiente: 1=90%, -1=70%; tipo de sustrato: 1=glucosa, -1=lactosa; concentración de BAL 1=10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, -1=10<sup>9</sup> UFC mL<sup>-1</sup>; humedad de la biopelícula: 1=>25% de humedad, -1=20% de humedad.

Pese a lo anterior, para investigar solo los dos factores que más influencia ejercen sobre la viabilidad celular, se redujo el valor alfa a 0.00005 y se encontró congruente con el análisis previo que los factores tipo de ácido y tipo de quitosán fueron los de efectos principales. En este análisis ninguna interacción resultó significativa. Ambos factores presentaron la mayor viabilidad de células en su nivel -1 que correspondió a quitosán de bajo peso molecular y ácido láctico (barras de color azul, Figura 2).

En el Cuadro 3 se presentan los valores de viabilidad observada y los valores ajustados predichos por el modelo de regresión. Los valores de viabilidad observados se encontraron en un rango amplio, pues van desde 33.05% (tratamiento 2) hasta 90.75% (tratamiento 8). Se puede observar que los valores más altos de viabilidad (77.78%, 86.91% y 90.75%), se obtuvieron cuando las películas fueron elaboradas con concentraciones de ácido láctico de 1.5%. La mayor viabilidad observada se obtuvo cuando las películas se elaboraron con 1.5% de quitosán de bajo peso molecular y 1.5%, de ácido láctico, no obstante el valor predicho muestra la mayor viabilidad cuando las películas contienen 1.5% de ácido láctico y 1% de quitosán (tratamiento 1, Cuadro 3).

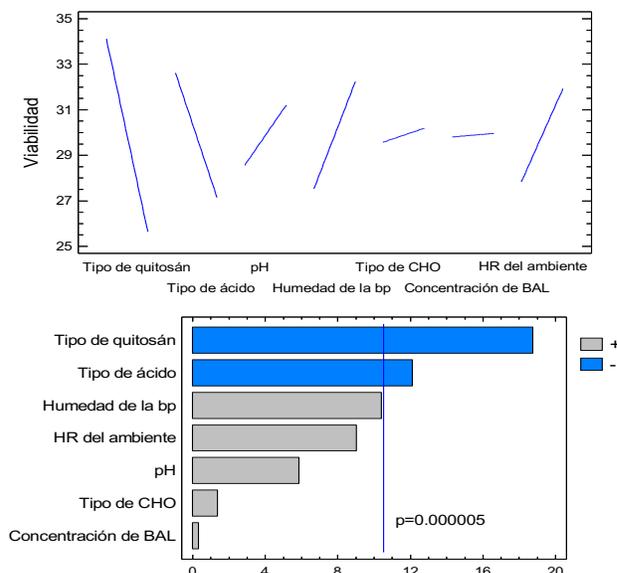


Figura 2. Gráfica de efectos principales (arriba) y diagrama de Pareto de los efectos estandarizados (abajo) para la viabilidad de bacterias ácido lácticas incorporadas en películas de quitosán.

Cuadro 3. Viabilidad de bacterias ácido lácticas y valores predichos ajustados por el modelo de regresión.				
Tratamiento	Concentración de quitosán de bajo PM (%)	Concentración de ácido láctico (%)	Viabilidad observada (%)	Valores predichos ajustados
1	1.0	1.5	86.91±3.7172	91.5106
2	1.5	0.5	33.05±0.6201	48.3556
3	2.0	1.0	52.64±2.8128	54.1022
4	2.0	0.5	67.86±4.9345	60.7372
5	1.0	0.5	58.33±4.4939	50.1472
6	1.0	1.0	49.16±2.2983	52.7422
7	1.5	1.0	51.38±5.3468	46.3356
8	1.5	1.5	90.75±0.3194	80.4889
9	2.0	1.5	77.98±5.4554	83.6406

Los valores observados son el promedio y la desviación estándar de tres determinaciones.

En congruencia con lo anterior, en el Figura 3 se puede observar que tanto la variable de respuesta (superior) como la región óptima (inferior) se obtienen cuando la concentración de ácido láctico va de 1.3 a 1.5%. En la misma figura se puede apreciar la poca contribución de la concentración de quitosán, mismo que no resultó significativa en el análisis estadístico (P>0.05).

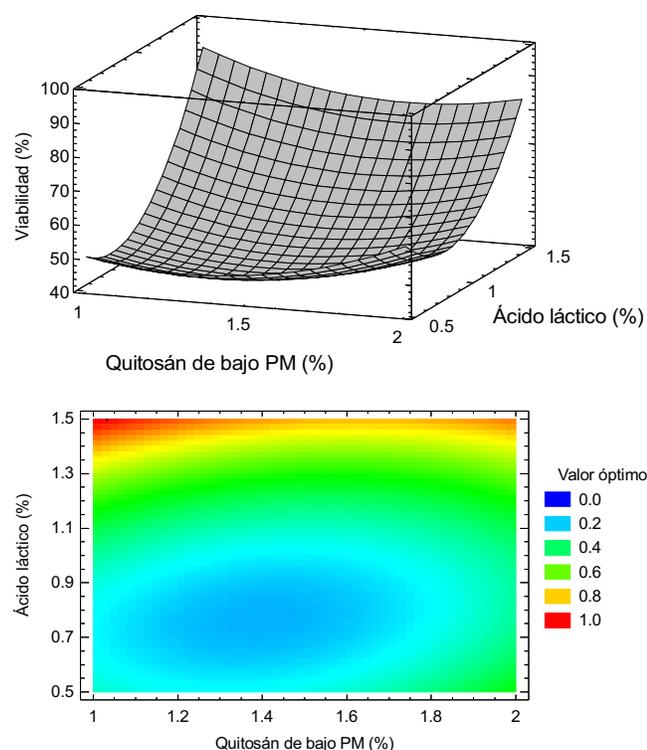
Excluyendo en el análisis la contribución de la concentración de quitosán, se detectó significancia solo para la variable concentración de ácido láctico (P=0.03) y, a partir de ahí se estableció la relación empírica entre las variables independientes (ácido láctico y quitosán de bajo peso molecular) y la respuesta, quedando descrita por la siguiente ecuación: Viabilidad (%) = 122.639 - 66.58\*A - 84.87\*B + 28.3467\*(A)<sup>2</sup> - 18.46\*AB + 72.3467\*(B)<sup>2</sup>, donde A=concentración de quitosán de bajo peso molecular; B=concentración de ácido láctico.

La adecuación del modelo para predecir la respuesta, fue verificada obteniendo el valor R<sup>2</sup>=0.811838; mismo que indica que el 81% de la viabilidad estaría explicada por la concentración de ácido y la concentración de quitosán de bajo peso molecular interactuando en el modelo de segundo orden descrito. Sin embargo, cuando la ecuación se ajusta al modelo de primer orden, la R<sup>2</sup> ajustada se reduce hasta 0.623675.

#### 4. Discusión

De los siete factores que inicialmente se evaluaron por su influencia en la viabilidad de las bacterias ácido lácticas, dos la afectaron de manera altamente significativa (P=0.000005, tipo de ácido y tipo de quitosán) tres lo hicieron de manera significativa (P<0.05), humedad de la película, humedad del ambiente y pH) y dos no mostraron ejercer efecto sobre la variable de respuesta (tipo de

carbohidrato y cantidad de células adicionadas). Estos resultados fueron reveladores, puesto que no existe mucha información respecto de cómo el tipo de ácido orgánico y tipo de quitosán afectan la viabilidad celular y en el análisis de optimización de respuesta se pudo ver como los valores más altos de viabilidad están condicionados sobre todo por la concentración de ácido láctico. El quitosán de bajo peso molecular es comúnmente empleado en la elaboración de películas debido a que ofrece mejores propiedades de manejabilidad en las mismas (Beverly y Janes, 2008). Dado que posee mayor grado de desacetilación, expone mayor número de grupos funcionales (glucosaminas), lo cual le confiere mayor naturaleza catiónica, que en determinadas condiciones puede tener gran afinidad a las envolturas o membranas de las bacterias que tienen carga negativa y promover su desestabilización (Li et al., 2010). Sin embargo, cuando interactúa con ácido láctico en solución, se ha demostrado que se forman grupos amida y existe policondensación del ácido láctico (Bhattarai et al., 2006), lo cual de algún modo en nuestro estudio aumentó notablemente la viabilidad de las BAL.



**Figura 3.** Superficie de respuesta (arriba) y contornos de la superficie de respuesta estimada mostrando el área del óptimo (abajo) para la viabilidad de bacterias ácido lácticas incorporadas en películas de quitosán con a diferentes concentraciones de ácido láctico y quitosán de bajo peso molecular.

Este marcado efecto del ácido orgánico (láctico) fue verificado en el experimento de optimización, pues puede verse que a la concentración más alta evaluada (1.5%) se

logró la mayor viabilidad, producida por la mayor sustitución de grupos aminos del quitosán (Bhattarai et al., 2006). El ácido láctico es el principal producto final del metabolismo de carbohidratos que realizan las BAL, y al estar presente en la películas desde el inicio del almacenamiento pudo proporcionar a las bacterias un ambiente favorable en la conservación de la viabilidad celular (Xio et al., 2013). El ácido láctico se ha usado con anterioridad en películas de glicerol, en donde se demostró que su uso aumentó la flexibilidad y la capacidad de retención de humedad de la película (Manab et al., 2011). Si lo anterior ocurrió en el presente estudio, pudo haber favorecido la viabilidad de las BAL. También se ha reportado que el uso de ácido láctico como disolvente de quitosán podría aumentar la solubilidad de la película (Lin y Zhao, 2007), lo cual en algunos casos puede resultar deseable (liberación de metabolitos) pero en otros puede ser indeseable (películas). Conveniente resulta evaluar las propiedades texturales y fisicoquímicas de las membranas aquí optimizadas.

Las películas elaboradas en el proceso de optimización de este trabajo presentaron mejores características táctiles (no determinadas), esto puede deberse a que la interacción de los factores que se combinaron influyeron directamente sobre las propiedades de manejabilidad, toda vez que se ha reportado que la adición de ácido láctico incrementa la manejabilidad de las películas de quitosán (Lin y Zhao, 2007).

El valor óptimo (deseable) para la viabilidad celular se encontró en el límite superior de la concentración de ácido láctico evaluada (1.5%). Lo anterior puede estar relacionado con el argumento antes planteado acerca de la cantidad de grupos amino libres interactuando con el ácido láctico. Esta hipótesis solo se cumple hasta cierta relación molar, pues se ha demostrado que con relaciones molares ácido:grupo amino superiores a 2.9 el quitosán se vuelve insoluble y no interactúa con el ácido orgánico (Bhattarai et al., 2006). Esto, aunado a los altos valores observados de viabilidad, lleva a pensar que el óptimo de viabilidad (deseabilidad de 1.0) encontrado en nuestro estudio está altamente correlacionado con los valores explorados. La validación empírica del modelo ajustado propuesto resolverá esta pregunta.

De los factores con menor significancia en el análisis de cribado (pH, humedad de la biopelícula y humedad relativa del ambiente, Figura 2), y que fueron empleados como fijos en la etapa de optimización, se ha reportado también su efecto en la viabilidad de las bacterias. Cuando el pH es elevado, las bacterias ácido lácticas producen ácido láctico y otros ácidos orgánicos de cadena corta como resultado del metabolismo de carbohidratos, con lo cual disminuyen el pH como su principal mecanismo de antagonismo. Por lo anterior se ha determinado que algunos géneros como el *Lactobacillus* y bifidobacterias crecen con mayor facilidad a pH de 4.5 (Adamberg et al., 2003). En nuestro estudio encontramos que ese mismo pH (4.5) logró mantener la

viabilidad de las BAL incorporadas en las películas por siete días.

Después de las dos variables que mayor significancia tuvieron, los niveles de humedad, tanto de la película como del ambiente (humedad relativa) mostraron efecto sobre la viabilidad. Ambas variables mostraron una relación directa con la viabilidad, lo cual es un indicio de que las células empleadas en el presente estudio toleran poco la disminución en el contenido de humedad o requieren, bajo esas condiciones la adición de un osmoprotectante o crioprotectante, como ocurre en tratamientos donde se aplica liofilización o *spray-drying* para conservar células (Fonseca et al., 2015; Zamora et al., 2006). Por el contrario, los altos valores de viabilidad en el experimento de optimización son un indicio de que ambas condiciones de humedad interactuando con los factores en optimización, están proporcionando los valores de actividad de agua idóneos. Esto es congruente con las condiciones de humedad de donde estos microorganismos son aislados que oscila en valores de humedad arriba del 70% (Wenjun et al., 2012). Los carbohidratos son esenciales para la supervivencia de las bacterias ácido lácticas ya que son la base principal del metabolismo (Gänzle et al., 2007), sin embargo en nuestro estudio el tipo de carbohidrato no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad.

## 5. Conclusión

Durante la primera etapa del trabajo de investigación se obtuvo una viabilidad máxima de 39.32%, siendo los factores más influyentes el tipo de ácido orgánico (ácido láctico) y el tipo de quitosán (de bajo peso molecular). Mediante la optimización de estos dos factores, en la segunda etapa de este trabajo se logró incrementar la viabilidad de bacterias ácido lácticas hasta 90.75% encontrándose que la concentración de 1.5% de ácido láctico produce los valores más altos de viabilidad, sin efecto significativo del contenido de quitosán de bajo peso molecular. Los resultados de este estudio demuestran que las películas elaboradas a base de quitosán son funcionales como medio para conservar la viabilidad de bacterias ácido lácticas por un periodo de siete días.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Referencias

Adamberg K, Kaska S, Laht TM, Paalme T. 2003. The effect of temperature and pH on the growth of lactic acid bacteria: a pH-auxostat study. *International Journal of Food Microbiology* 85: 171–183.

Barragán-Menéndez C, Gálvez-López D, Rosas-Quijano R, Salvador-Figueroa M, Ovando-Medina I, Vázquez-Ovando A. 2020. Films of chitosan and *Aloe vera* for maintaining the viability and antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* TEP6. *Coatings* 10: 259.

Beverly R, Janes M. 2008. Edible chitosan films on ready-to-eat roast beef for the control of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 25: 534–537.

Bhattarai N, Ramay HR, Chou S, Zhang M. 2006. Chitosan and lactic acid-grafted chitosan nanoparticles as carriers for prolonged drug delivery. *International Journal of Nanomedicine* 1: 181–187.

Binsi PK, Ravishankar CN, Srinivasa-Gopal TK. 2013. Development and characterization of an edible composite film based on chitosan and virgin coconut oil with improved moisture sorption properties. *Journal of Food Science* 78: E526–534.

Cálix T, Rajendran M. 2014. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on spinach and identification of antimicrobial substances produced by a commercial Lactic Acid Bacteria food safety intervention. *Food Microbiology* 38: 192–200.

Concha M, Renate S, Brito C. 2011. Lactic acid bacteria in an alginate film inhibit *Listeria monocytogenes* growth on smoked salmon. *Food Control* 22: 485–489.

Fonseca F, Cenard S, Passot S. 2015. Freeze-drying of Lactic Acid Bacteria. En: Willem F, Harriette W. (eds). *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*. 2<sup>nd</sup> edn. Humana Press. New York, USA. Pp. 477–488.

Gänzle MG, Vermeulen N, Vogel R. 2007. Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology* 24: 128–138.

Hartmann A, Wilke T, Erdmann R. 2011. Efficacy of bacteriocin-containing cell-free culture supernatants from lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* in food. *International Journal of Food Microbiology* 146: 192–199.

Hegyí F, Zalán Z, Halasz A. 2012. Improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay for measuring the viability of lactic acid bacteria. *Acta Alimentaria* 41: 506–512.

Li X, Xiao GF, Yang S, Guo F, Ting-pu W, Zhong-xing S. 2010. Chitosan kills *Escherichia coli* through damage to be of cell membrane mechanism. *Carbohydrate Polymers* 79: 493–499.

Lin D, Zhao Y. 2007. Innovations in the development and application of edible coatings for fresh and minimally processed fruits and vegetables. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6: 60–75.

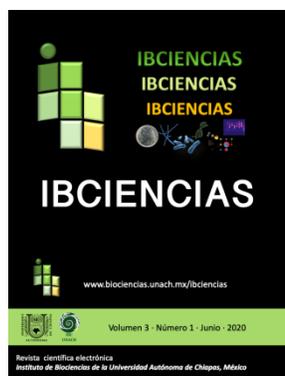
Manab A, Sawitri ME, Awwaly KU, Purnomo H. 2011. Antimicrobial activity of whey protein based edible film incorporated with organic acids. *African Journal of Food Science* 5: 6–11.

Marín A, Plotto A, Atarés L, Chiralt A. 2019. Lactic acid bacteria incorporated into edible coatings to control fungal growth and maintain postharvest quality of grapes. *HortScience* 54: 337–343.

Monzón-Ortega K, Salvador-Figueroa M, Gálvez-López D, Rosas-Quijano R, Ovando-Medina I, Vázquez-Ovando A. 2018. Characterization of *Aloe vera*-chitosan composite films and their use for reducing the disease caused by fungi in papaya Maradol. *Journal of Food Science and Technology* 55: 4747–4757.

Neetoo H, Chen H. 2007. Effectiveness and stability of plastic films coated with nisin for inhibition of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection* 70: 1267–1271.

- 
- Romano N, Tavera-Quiroz MJ, Bertola N, Mobili P, Pinotti A, Gómez-Zavaglia A. 2014. Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Research International* 64: 560–566.
- Salvador-Figueroa M, Castillo-López D, Adriano-Anaya L, Gálvez-López D, Rosas-Quijano R, Vázquez-Ovando A. 2017. Chitosan composite films: physicochemical characterization and their use as coating in papaya Maradol stored at room temperature. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 29: 779–791.
- Seydim AC, Sarikus G. 2006. Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International* 39: 639–644.
- Xio F, Lai Z, Lai C, Zhu M, Li S, Wang J, Wang X. 2013. Efficient production of L-lactic acid by an engineered *Thermoanaerobacterium aotearoense* with broad substrate specificity. *Biotechnology for Biofuels* 6: 124.
- Wenjum L, Qiu Hua B, Jirimutu, Qing M, Siriguleng, Chen X, Sun T, Li M, Zhang J, Yua J, Bilige M. 2012. Isolation and identification of lactic acid bacteria from Tarag in Eastern Inner Mongolia of China by 16S rRNA sequences and DGGE analysis. *Microbiological Research* 167: 110–115.
- Zamora LM, Carretero C, Parés D. 2006. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. *Food Science and Technology International* 12: 77–84.



## ARTÍCULO CORTO

## Aislamiento de bacterias antagónicas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet y promotores de crecimiento en banano (*Musa AAA*)

Luis Ángel Cruz-Ortiz\*, Mariana Flores-Méndez, Kimberly Rosa Escobar-Ventura, Benjamín Moreno-Castillo

Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas. Tapachula, Chiapas, México.

### Resumen

*Mycosphaerella fijiensis* Morelet (agente causal de la Sigatoka Negra, SN) es un patógeno altamente virulento en las plantaciones de banano triploides (*Musa AAA*). La enfermedad se maneja mediante aspersiones aéreas semanales de fungicidas químicos principalmente, lo cual provoca contaminación del ambiente y daños potenciales a la salud humana. Se ha reportado que los microorganismos asociados a las plantas (hojas, frutos, tallos y raíces), podrían ser candidatos para el biocontrol de patógenos y como biofertilizantes. En este trabajo se aislaron en medio selectivo (M9 + quitina coloidal) bacterias asociadas a la rizósfera y filósfera de plantas de banano (AAA, clon enano gigante) en producción comercial. Posteriormente se determinó cuáles de las cepas capaces de producir ácido indol- acético (AIA). Finalmente, el sobrenadante de cultivo en M9 + quitina coloidal de cada cepa aislada se inoculó sobre ascosporas vivas de *M. fijiensis* para evaluar su capacidad de inhibición. Se aislaron tres cepas con propiedades quitinolíticas, dos de rizósfera (Res R-01 y Res R-02) y una de filósfera (Res F), las cuales inhibieron 76.8%, 61.5% y 75.7% la elongación del tubo germinativo, respectivamente. La cepa Res F fue la única que produjo AIA a partir de L-triptófano. Las tres cepas quitinolíticas aisladas tienen potencial como agentes de biocontrol de *M. fijiensis*, dada su capacidad de inhibición *in vitro*, mientras que la cepa Res F podría ser, además, un candidato agente promotor de crecimiento en banano.

### Palabras clave:

Ácido indol-acético  
Ascosporas  
Biocontrol  
Biofertilizante  
Quitinasas

### Keywords:

Indol-acetic acid  
Ascospores  
Biocontrol  
Biofertilizer  
Chitinases

## Isolation of antagonistic bacteria of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and growth promoters in banana (*Musa AAA*)

### Abstract

The Black Sigatoka Disease (BSD) is caused by the ascomycete *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, a highly virulent pathogen in triploid banana plantations (*Musa AAA*). Management of the BSD is mainly achieved by weekly-aerial sprays of chemical fungicides that provoke environmental pollution and potential hazardous effects on human health. There are reports about the potential of plant-associated microorganisms (leaf, fruit, stem and root-associated) as candidate biocontrol agents of phytopathogens and as biofertilizers. In this work we isolate banana phyllosphere and rhizosphere-associated bacterial strains in salt broth M9 + colloidal chitin, to test their ability to produce indol- acetic acid (IAA) and to evaluate the antifungal activities of the bacterial chitinolytic culture supernatants on *M. fijiensis* ascospore germination. Three chitinolytic bacterial strains were isolated, one phyllosphere-associated (Res F) and two rhizospheric (Res R-01, Res R-02) strains. The chitinolytic culture supernatants of the three isolates failed to inhibit ascospore germination but showed a germ tube inhibition of 75.7%, 76.8% and 61.5%, respectively, as compared to untreated *M. fijiensis* ascospores. Only strain Res F produced IAA from L-tryptophan. The three chitinolytic bacterial strains isolated from banana phyllosphere and rhizosphere have the potential as biocontrol agents, as function of their *in vitro* antifungal activities against *M. fijiensis*. Moreover, due to its ability to synthesize IAA, strain Res F is also a candidate as plant growth promoter in banana plants.

\* Autor para correspondencia:

Instituto de Biociencias,  
Universidad Autónoma de  
Chiapas.  
Boulevard Príncipe Akishino  
sin número colonia  
Solidaridad 2000. C.P.  
30798.  
Tapachula Chiapas, México.  
Teléfono: +52 962 1227401.  
Correo-electrónico:  
cruzortizluisangel@gmail.com

## 1. Introducción

El banano (*Musa AAA*) es una de las frutas tropicales más aceptadas por el mercado consumidor debido a sus precios bajos, sabor agradable, disponibilidad todo el año y por su aporte nutritivo en potasio, hierro y vitamina K (García et al., 2013). En 2018 se produjeron en México más de 2 millones de toneladas, de las cuales el estado de Chiapas contribuyó con 29% de total nacional (SIAP, 2018).

La Sigatoka Negra (SN) es el principal problema fitosanitario que afrontan los productores bananeros de todo el mundo, enfermedad que es causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (teleomorfo) y *Pseudocercospora fijiensis* Morelet (anamorfo), patógenos altamente virulentos que pueden ocasionar pérdidas de hasta el 100% de la cosecha si no se mantienen los niveles de infección por debajo del umbral económico (Arango et al., 2016; Churchill, 2011). Altos índices de infección de SN provocan necrosis foliar, baja tasa fotosintética, debilidad, maduración prematura, rendimientos bajos y de baja calidad, no aptos para la comercialización (Luna-Moreno et al., 2019). De manera convencional, los productores de banano aplican fungicidas químicos para el manejo de la SN, pero con la aparición de cepas resistentes de *M. fijiensis* a los fungicidas, el manejo de la SN se ha vuelto más complicado (Yáñez-López et al., 2012). Aunado a esto, el sobreuso de insumos de síntesis química ha generado problemas en la salud humana y en el ambiente (Budzinski y Courdechet, 2018).

Recientemente se ha reportado el potencial de microorganismos asociados a las plantas (principalmente a las hojas, tallos y raíces), los cuales podrían ser candidatos para el biocontrol de patógenos y como biofertilizantes, reduciendo con su implementación el impacto ambiental causado por la fertilización y el control químico (González y Fuentes, 2016). Distintos trabajos han mostrado el potencial de diversas cepas de *Bacillus*, *Gluconacetobacter*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y actinomicetos, como candidatos agentes de biocontrol de fitopatógenos en diferentes cultivos agrícolas (Badía et al., 2011; Ríos et al., 2016; Suárez y Rangel, 2014). Dentro de estas cepas microbianas destacan aquellas que son capaces de producir enzimas micolíticas (como las quitinasas) que degradan la quitina estructural de las paredes celulares de los hongos fitopatógenos, algunas de las cuales ya han sido reportadas contra *M. fijiensis* (Ceballos et al., 2012; Gutiérrez-Román et al., 2015; Moreno-Castillo et al., 2016). Otros mecanismos de acción de los agentes de biocontrol, aparte de la lisis, son el micoparasitismo, la competencia por nutrientes, la antibiosis, la tolerancia a factores ambientales adversos y la promoción del crecimiento vegetal, como condicionante de un estado inmunológico vegetal fuerte (Suárez y Rangel, 2014). Una de las cualidades principales de los promotores de crecimiento vegetal es la producción de fitohormonas, como el ácido indol- acético (AIA), el cual es absorbido y utilizado por la planta (Kandel et al., 2017). Esta hormona vegetal es normalmente sintetizada a partir del L-triptófano en la rizósfera o en la filósfera de las plantas y se

ha reportado como una molécula señal importante entre planta y microorganismo para la promoción del crecimiento (Hardoim et al., 2008; Spaepen et al., 2007). De esta manera, una de las formas más empleadas para determinar el potencial de microorganismos como posibles promotores de crecimiento vegetal, es determinar su capacidad de producir AIA a partir de L-triptófano (Sziderics et al., 2007).

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue aislar bacterias quitinolíticas residentes de la filósfera y rizósfera del banano, así como evaluar su actividad inhibitoria sobre ascosporas de *M. fijiensis* y determinar de manera cualitativa su capacidad para producir ácido indol- acético (AIA) a partir de L-triptófano.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Aislamiento de bacterias quitinolíticas residentes de rizósfera y filósfera

Las muestras se obtuvieron de la plantación de banano (clon Enano Gigante) finca Carlota, de nueve años, en producción, suelo de tipo luvisol, textura franca, capa arable de aproximadamente 75 cm, localizado en el municipio de Tapachula Chiapas, México. Bajo condiciones de esterilidad se tomaron 5 g de suelo de rizósfera o de tejido foliar y se colocaron en 50 mL de buffer de sodio fosfato 0.1 M + Tween 80 (pH 7) 0.1% a 170 rpm por una hora (Ceballos et al., 2012). Alícuotas de 1 mL de esta suspensión se inocularon por triplicado en matraces conteniendo medio mínimo M9 + quitina coloidal 1% + 1 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura (5 días, 120 rpm 26 °C) (Moreno-Castillo et al., 2016). La presencia de actividad quitinasa extracelular se confirmó mediante la reacción del sobrenadante de cultivo con el sustrato cromogénico 4-PNG (Sigma) siguiendo el protocolo de Park et al. (2000). Posterior a la incubación, estas suspensiones se estiraron sobre agar nutritivo y se incubaron por 48 h a temperatura ambiente, para posteriormente seleccionar las cepas con mayor crecimiento y resembrarlas en agar nutritivo bajo las mismas condiciones hasta lograr su purificación. Las cepas puras se guardaron en glicerol (30%) a -8 °C.

### 2.2. Determinación de la producción de ácido indol- acético

Las cepas puras se reactivaron e inocularon por triplicado en medio de crecimiento líquido (glucosa 5 g L<sup>-1</sup> + 0.025 g L<sup>-1</sup> de extracto de levadura + 0.204 g L<sup>-1</sup> de L-triptófano) durante 3 días a 120 rpm y 26 °C. Un control negativo (sin inóculo) fue también preparado (Sziderics et al., 2007). La determinación cualitativa de la producción de ácido indol- acético (AIA) se hizo mediante una prueba colorimétrica. El sobrenadante de cultivo en medio de crecimiento (previamente centrifugado a 6708 g por 5 min) se hizo reaccionar con 2 mL de reactivo de Salkowsky (0.3 g de FeCl<sub>3</sub> en 8.14 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y 1.86 mL de agua destilada) por 30 min en oscuridad y a temperatura ambiente (Glickmann y Dessaux, 1995). Una coloración rosa-púrpura indicó la presencia de AIA en el sobrenadante de cultivo. Un

control positivo con ácido 3-indol acético (Sigma) fue además preparado ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) con fines de comparación.

### 2.3. Efecto del sobrenadante de medio de cultivo M9 sobre ascosporas de *M. fijiensis*

El procedimiento de descarga de ascosporas se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Gutiérrez-Román et al. (2015) y Moreno-Castillo et al. (2016); lesiones en estadio 6 (escala de Fouré) presentes en hojas de banano infectadas con *M. fijiensis* se colectaron en campo y fueron colocadas en cámara húmeda por 48 h. Posteriormente se seleccionaron bajo el estereoscopio, las lesiones con abundantes pseudotecios maduros sobre el haz y próximos a esporular, las cuales se engraparon a cartulinas de 5x5 cm dejando el haz expuesto. Las lesiones se lavaron en agua corriente por 15 min, se eliminó el exceso de agua con papel toalla y se colocaron dentro de las tapas de cajas Petri de vidrio (45 mm de diámetro) cuyas bases contenían agar-agua al 1.5%. Las cajas de Petri se cerraron y se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se localizaron las ascosporas sobre el agar y se marcaron con aguja estéril. El sobrenadante de las cepas bacterianas cultivadas en medio M9 + quitina coloidal (preparado fresco), fue centrifugado y filtrado en membrana de nitrocelulosa ( $0.45 \mu\text{m}$ ). Posteriormente,  $50 \mu\text{L}$  del sobrenadante se inocularon sobre las ascosporas vivas de *M. fijiensis* inmediatamente después de ser descargadas y marcadas sobre el agar-agua 1.5%. Después de 24 h de incubación a temperatura ambiente, el crecimiento de las ascosporas fue detenido con unas gotas de solución de lactofenol, para posteriormente ser fotografiadas bajo el microscopio. La longitud de 100 tubos germinativos por tratamiento fue medidos y comparados con las longitudes de los tubos germinativos del testigo (ascosporas a libre germinación y crecimiento), para calcular el porcentaje de inhibición observado en cada tratamiento.

### 2.4 Análisis de datos

Los datos obtenidos de todas las variables se presentan como la media y desviación estándar.

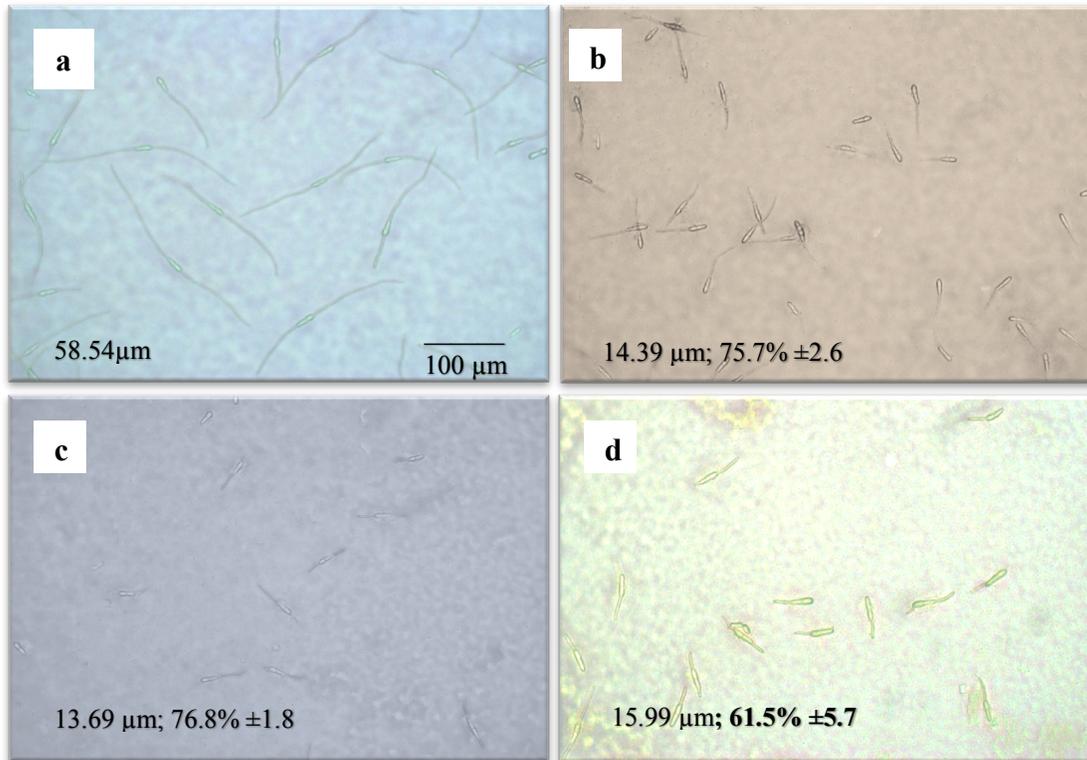
## 3. Resultados y Discusión

Se aislaron dos cepas bacterianas de rizósfera y una de filósfera de plantas de banano clon Enano Gigante, codificadas como Res R-01, Res R-02 y Res F, respectivamente. Se confirmó la actividad quitinolítica de las tres cepas aisladas, ya que el sobrenadante de cultivo bacteriano en M9 + quitina coloidal degradó el sustrato cromogénico 4-PNG, tornando la reacción amarilla (no mostrado). Por las condiciones de crecimiento y morfología colonial, es probable que las cepas aisladas pertenezcan al género *Bacillus*, género que parece ser común estar asociado con plantas de banano (Ceballos et al., 2012). Estos autores aislaron cepas bacterianas de la filósfera del banano y caracterizaron la actividad antifúngica de los sobrenadantes de cultivo sobre la germinación de ascosporas y crecimiento micelial de *M. fijiensis*. De 648 aislados, el sobrenadante del

44% de las cepas, mostraron valores de inhibición por arriba del 75%, las cuales eran en su mayoría *Bacillus* y en una menor proporción *Paenibacillus*. El género *Bacillus* también ha sido reportado como productor de enzimas líticas con actividad antifúngica (glucanasas y quitinasas) (Villarreal-Delgado et al., 2017). Se ha correlacionado el éxito de los agentes de biocontrol con la producción de enzimas líticas, principalmente quitinasas, mediante las cuales los microorganismos antagonistas degradan la quitina estructural contenida en la pared celular de los hongos fitopatógenos, hidrolizando el enlace glucosídico  $\beta$  (1,4) entre monómeros de N-acetil-glucosamina (GlcNAC) que constituyen al biopolímero para generar oligómeros y monómeros de bajo peso molecular que usan como fuente de carbono (Swiontek et al., 2014). La actividad antifúngica de las quitinasas tiene lugar por su interacción con la membrana citoplasmática de células fúngicas, provocando la formación de poros y un desbalance osmótico, lo que desencadena la muerte celular de los microorganismos fitopatógenos (Villarreal-Delgado et al., 2017).

Asimismo, los sobrenadantes quitinolíticos de las cepas Res R-01, Res R-02 y Res F, obtenido del cultivo en medio M9 + quitina, no inhibieron la germinación de las ascosporas de *M. fijiensis* pero inhibieron en 76.8%, 61.5% y 75.7% la elongación del tubo germinativo con respecto al testigo, respectivamente (Figura 1). Ceballos et al. (2012) reportaron la inhibición del crecimiento de los tubos germinativos de *M. fijiensis* usando cepas de *Bacillus subtilis* (94% de inhibición), *Bacillus amyloliquefaciens* (93%) y *Bacillus pumilus* (92%). Moreno-Castillo et al. (2016) lograron una inhibición cercana al 100% en la germinación de ascosporas y en la elongación del tubo germinativo de *M. fijiensis* con el sobrenadante de *Streptomyces galilaeus* CFFSUR-B12, mientras que una suspensión celular de la cepa quitinolítica *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 inhibió en 100% la germinación de ascosporas de *M. fijiensis* (Gutiérrez-Román et al., 2015). Hernández et al. (2018) reportaron que cepas de *Bacillus amyloliquefaciens*, *B. subtilis* y *Stenotrophomonas rhizophila* inhibieron 81-93%, 51-69% y 90-98%, respectivamente, la germinación de hongos fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides* (Antracnosis de la papaya y mango).

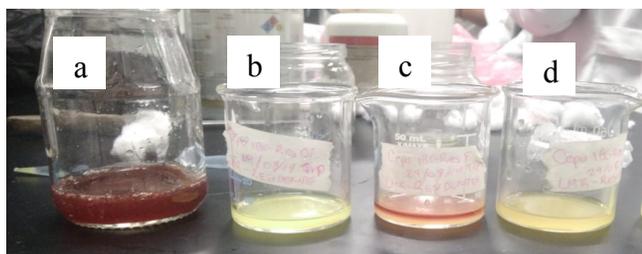
Por otro lado, la cepa Res F fue la única que produjo ácido indol- acético a partir de L-triptófano (Figura 2). Se han reportado cepas bacterianas productoras de ácido indol-acético (AIA) en diversos cultivos como el arroz, frijol y tomate (Flores-Márquez et al., 2017), las cuales tienen el potencial de ser usadas como biofertilizantes, ya que promueven procesos fisiológicos que incluyen el alargamiento y la división celular, diferenciación de tejido, fototropismo, gravitropismo, respuestas de defensa, entre otros. Dentro de estas cepas, *Bacillus* también ha sido reportado como promotor de crecimiento en una variedad de plantas (Vega-Celedon et al., 2016).



**Figura 1.** Porcentaje de inhibición a 24 h (promedio±desviación estándar) del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* inoculadas con el sobrenadante quitinolítico bacteriano de las cepas b) Res F (aislada de filósfera), c) Res R-01 (de rizósfera) y d) Res R-02 (de rizósfera) de banano. Se muestra el crecimiento de las ascosporas testigo a) sin tratamiento. Aumento 10X.

Los resultados de este trabajo son preliminares y se requiere de más investigación tanto *in vitro* como *in planta* para poder determinar el desempeño de las cepas como agentes de biocontrol de *M. fijiensis* y como biofertilizantes en plantas de banano.

cepas aisladas, solamente la cepa Res F fue capaz de sintetizar AIA a partir de L- triptófano, razón por la cual puede ser considerada como un potencial promotor de crecimiento en plantas de banano.



**Figura 2.** Detección colorimétrica de ácido indol- acético (AIA) en sobrenadante de cultivo bacteriano. a) control con AIA (sigma), b) Res R-01, c) Res F, d) Res R-02.

#### 4. Conclusión

En el presente trabajo se aislaron tres cepas con propiedades quitinolíticas, dos asociadas a la rizósfera y una asociada a la filósfera de plantas de banano. Los sobrenadantes de cultivo de las cepas aisladas, codificadas como Res R-01, Res R-02 y Res F, no inhibieron la germinación de las ascosporas de *M. fijiensis*, pero si redujeron la elongación del tubo germinativo en 76.8%, 61.5% y 75.7%, respectivamente. Las

#### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

#### Referencias

- Arango RE, Diaz-Trujillo C, Dhillon B, Aerts A, Carlier A, Crane C, Jong T, Vries I, Dietrich R, Farmer A, Fortes C, García S, Guzman M, Hamelin R, Lindquist E, Mehrabi R, Quiros O, Schmutz J, Shapiro H, Reynolds E, Scalliet G, Souza M, Van der Lee T, De Wit P, Zapater MF, Zwiers LH, Grigorie I, Goodwin S, Kema G. 2016. Combating a global threat to a clonal crop: banana black Sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* (Synonym *Mycosphaerella fijiensis*) genomes reveal clues for disease control. *Plos Genetics* 12(10): 1-36.
- Badía MR, Hernández T, Murrel AL, Mahillon J, Pérez M. 2011. Isolation and characterization of strains of the *Bacillus* associated of rice (*Oryza sativa* L.). *Revista Brasileira de Agroecología* 6(1): 90-99.
- Budzinski H, Couderchet M. 2018. Environmental and human health issues related to pesticides: from usage and

- environmental fate to impact. *Environmental Science and Pollution Research* 25(15): 14277–14279.
- Ceballos I, Mosquera S, Angulo-Bedoya M, Mira M, Argel L, Uribe-Velez D, Romero-Tabarez M, Orduz-Peralta S, Villegas V. 2012. Cultivable bacteria populations associated with leaves of banana and plantain plants and their antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*. *Microbial Ecology* 64: 641–653.
- Churchill CL. 2011. *Mycosphaerella fijiensis*, the black leaf streak pathogen of banana: progress towards understanding pathogen biology and detection, disease development, and the challenges of control. *Molecular Plant Pathology* 12: 307–328.
- Flores-Márquez DJ, Leal-Medina GI, Ardila LD, Cárdenas DM. 2017. Isolation and characterization of rhizobacteria associated with rice crops (*Oryza sativa* L.) in Norte de Santander (Colombia). *Agrociencia* 51(4): 373-391.
- García R, González F, García C, Mora S, González A, Martínez A. 2013. Banana (*Musa paradisiaca*) market in Mexico, 1971-2017. *Agrociencia* 47(4): 399–410.
- Glickmann E, Dessaux Y. 1995. A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied Environmental Microbiology* 61: 793–796.
- González H, Fuentes N. 2016. Action mechanism of five microorganism promoters of plant growth. *Agricultural Sciences Magazine* 34(1): 17-31.
- Gutiérrez-Román MI, Holguín-Meléndez F, Dunn M, Guillén-Navarro K, Huerta-Palacios G. 2015. Antifungal activity of *Serratia marcescens* CFFSUR-B2 purified chitinolytic enzymes and prodigiosin against *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka in banana (*Musa* spp.). *Biocontrol* 60: 565–572.
- Hardoim PR, van Overbeek LS, van Elsas JD. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends in Microbiology* 16(10): 463–471.
- Hernández LG, Rivas T, Romero M, Ruiz FH, Chiquito RG. 2018. Potencial antagónico de bacterias y levaduras marinas para el control de hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 20: 4311–4321.
- Kandel S, Joubert P, Doty S. 2017. Bacterial endophyte colonization and distribution within plants. *Microorganisms* 5(77): 2-26.
- Luna-Moreno D, Sánchez-Álvarez A, Islas-Flores I, Canto-Canche B, Carrillo-Pech M, Villarreal-Chiu JF, Rodríguez-Delgado M. 2019. Early detection of the fungal banana black sigatoka pathogen *Pseudocercospora fijiensis* by an SPR immunosensor method. *Sensors* 19(3): 1–12.
- Moreno-Castillo B, Dunn M, Guillén-Navarro K, Holguín-Meléndez F, Hernández-Ortiz M, Encarnación S, Huerta G. 2016. Antifungal performance of extracellular chitinases and culture supernatants of *Streptomyces galilaeus* CFFSUR-B12 against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 32(3): 44.
- Park SH, Lee JH, Lee HK. 2000. Purification and characterization of chitinase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. 98CJ11027. *The Journal of Microbiology* 38: 224–229.
- Ríos Y, Rojas M, Ortega M, Álvarez D, Rodríguez J. 2016. Isolation and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains. *Cultivos Tropicales* 37(1): 34-39.
- SIAP. 2018. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Resumen nacional intención de cosecha 2018. <https://www.gob.mx/siap>
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology* 31(4): 425–48.
- Suárez LY, Rangel AL. 2014. Isolation of microorganisms for biological control of *Moniliophthora roreri*. *Acta Agronómica* 62(4): 370-378.
- Swiontek M, Urszula J, Aleksandra B, Maciej W. 2014. Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Current Microbiology* 68: 71–81.
- Sziderics AH, Rasche F, Trognitz F, Sessitsch A, Wilhelm E. 2007. Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology* 53: 1195–1202.
- Vega-Celedon P, Canchignia H, González M, Seeger M. 2016. Biosynthesis of indole-3-acetic acid and plant growth promoting by bacteria. *Cultivos Tropicales* 37: 33-39.
- Villarreal-Delgado MF, Villa-Rodríguez ED, Cira-Chávez LA, Estrada-Alvarado MI, Parra-Cota FI, Santos-Villalobos S. 2017. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología* 36(1): 93-130.
- Yáñez-López R, Torres-Pacheco I, Guevara-González RG, Hernández-Zul I, Quijano-Carranza JA, Rico-García E. 2012. The effect of climate change on plant diseases. *African Journal Biotechnology* 11(10): 2417–2428.