



Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar, Ciudad de México, México.
ISSN 2707-2207 / ISSN 2707-2215 (en línea), Noviembre-Diciembre 2025,
Volumen 9, Número 6.

https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i6

CAPACIDAD IN VITRO DE LOS METABOLITOS DE PSEUDOMONAS SPP. PARA INHIBIR PATÓGENOS ASOCIADOS AL CULTIVO DE NICOTIANA TABACUM L.

**IN VITRO CAPACITY OF PSEUDOMONAS SPP.
METABOLITES TO INHIBIT PATHOGENS ASSOCIATED
WITH NICOTIANA TABACUM L. CULTIVATION**

Johana Carolina Guanoquiza Calero

Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador

Fernando Abasolo Pacheco

Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador

Cristhian John Macías Holguín

Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador

Capacidad In Vitro de los Metabolitos de *Pseudomonas Spp.* para Inhibir Patógenos Asociados al Cultivo de *Nicotiana Tabacum L.*

Johana Carolina Guanoquiza Calero¹

carolina.guanoquiza2015@uteq.edu.ec

<https://orcid.org/0009-0003-1072-0642>

Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Quevedo, Ecuador

Fernando Abasolo Pacheco

fabasolo@uteq.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0003-2268-7432>

Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Quevedo, Ecuador

Cristhian John Macías Holguín

cristhian.macias2016@uteq.edu.ec

<https://orcid.org/0000-0003-2068-8503>

Universidad Técnica Estatal de Quevedo
Quevedo, Ecuador

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar *in vitro* el efecto antagonista de metabolitos secundarios de cinco cepas de *Pseudomonas spp.* frente a los fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Enterobacter hormaechei*, ambos asociados a enfermedades en el cultivo de *Nicotiana tabacum L.* La actividad antifúngica se determinó mediante ensayos de inhibición del crecimiento micelial en agar PDA, mientras que la actividad antibacteriana se cuantificó mediante análisis de transmitancia en caldo nutritivo a 650 nm. Los resultados revelaron diferencias significativas entre los tratamientos. *Pseudomonas putida* BO 4-4 presentó la mayor inhibición de *F. oxysporum*, con un 77.04 %, seguida de otras cepas del mismo género con valores superiores al 70 %. En cuanto a la inhibición bacteriana, *Pseudomonas protegens* CHA0 redujo considerablemente el crecimiento de *E. hormaechei*, alcanzando una transmitancia del 6.6 %, frente al control, que registró solo 1.6 %, lo cual evidencia un mayor desarrollo del patógeno. Este estudio confirma el potencial de los metabolitos de *Pseudomonas spp.* para inhibir el crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenas bajo condiciones controladas, sugiriendo su uso como herramienta biotecnológica en el diseño de estrategias de biocontrol aplicables en la agricultura.

Palabras claves: bacterias antagonistas, biocontrol, *fusarium oxysporum*, *enterobacter hormaechei*

¹ Autor principal

Correspondencia: carolina.guanoquiza2015@uteq.edu.ec

In Vitro Capacity of *Pseudomonas* Spp. Metabolites to Inhibit Pathogens Associated with *Nicotiana Tabacum* L. Cultivation

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate *in vitro* the antagonistic effect of secondary metabolites from five *Pseudomonas* spp. strains against the phytopathogens *Fusarium oxysporum* and *Enterobacter hormaechei*, both associated with diseases affecting *Nicotiana tabacum* L. Antifungal activity was determined through assays measuring mycelial growth inhibition on PDA agar, while antibacterial activity was quantified using transmittance analysis in nutrient broth at 650 nm. The results revealed significant differences among treatments. *Pseudomonas putida* BO 4-4 showed the highest inhibition of *F. oxysporum*, with 77.04%, followed by other strains of the same genus with values above 70%. Regarding bacterial inhibition, *Pseudomonas protegens* CHA0 significantly reduced the growth of *E. hormaechei*, achieving a transmittance of 6.6%, compared to the control, which recorded only 1.6%, indicating a greater development of the pathogen. This study confirms the potential of *Pseudomonas* spp. metabolites to inhibit the growth of phytopathogenic fungi and bacteria under controlled conditions, suggesting their use as a biotechnological tool in the design of biocontrol strategies applicable in agriculture.

Keywords: antagonistic bacteria, biocontrol, fusarium oxysporum, enterobacter hormaechei

Artículo recibido 20 octubre 2025

Aceptado para publicación: 15 noviembre 2025



INTRODUCCIÓN

Nicotiana tabacum L. se encuentra entre las especies de mayor importancia agrícola mundial, caracterizado por adaptarse a una amplia variedad de suelos y condiciones climáticas, además de constituir una fuente significativa de ingresos para productores debido a que es la principal materia prima utilizada en la producción de cigarrillos (Jia et al., 2024; Tsaliki et al., 2023).

El cultivo se enfrenta a múltiples enfermedades las que afectan tanto el rendimiento como la calidad del producto final, impulsando la dependencia de agroquímicos para su control que cada vez genera mayor preocupación por su impacto ambiental y aparición de resistencias (Liu et al., 2021). Por lo tanto, el empleo de microorganismos benéficos que promuevan el crecimiento vegetal y actúen como agentes biocontroladores se plantea como una alternativa sostenible y eficaz.

Dentro de estos microorganismos, *Pseudomonas* spp. son bacterias rizosféricas reconocidas por su capacidad de promover el crecimiento vegetal y actuar como agentes biocontroladores frente a fitopatógenos actuando mediante la producción de antibióticos, sideróforos y enzimas que degradan la pared celular, así como compitiendo por nutrientes esenciales y estimulando el crecimiento vegetal (Abo-Elyousr et al., 2021; Alattas et al., 2024; Mahapatra et al., 2024).

En estudios *in vitro*, diversas cepas han demostrado ser eficaces en la inhibición de *Fusarium oxysporum*, evidenciando su potencial como agentes de biocontrol (Akhtar et al., 2010; Liu et al., 2021).

En los últimos años, la presencia de bacterias fitopatógenas ha cobrado relevancia en cultivos de interés agrícola, destacándose especies como *Enterobacter hormaechei*, responsable de pudriciones en tallos de *Hylocereus costaricensis* en Costa Rica, cuya capacidad patogénica fue confirmada mediante análisis moleculares y morfológicos (Retana-Sánchez et al., 2019). Aunque este tipo de bacterias no ha sido ampliamente estudiado en *Nicotiana tabacum* L., su identificación reciente en este cultivo en Ecuador (Guanquiza Calero et al., 2025) subraya la importancia de explorar alternativas sostenibles para su control. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad biocontroladora *in vitro* de cepas de *Pseudomonas* spp. frente a *Fusarium oxysporum* y *Enterobacter hormaechei*.

METODOLOGÍA

Lugar y condiciones del cultivo

Los ensayos se realizaron en los laboratorios de Biotecnología y Microbiología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), en Quevedo, Ecuador. Todos los procedimientos fueron ejecutados bajo condiciones de esterilidad utilizando una cabina de flujo laminar clase II y se mantuvieron a una temperatura ambiente controlada de 26 ± 2 °C. Se empleó material de vidrio previamente esterilizado y reactivos de grado analítico.

Material genético

Las cepas de *Pseudomonas spp.* utilizadas (*P. putida* BMR2-4, *P. putida* PB 3-6, *P. putida* BO 4-4; *P. protegens* CHA0; y *P. veronii* R4) fueron proporcionadas por el Banco de Rizobacterias de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ). Estas cepas fueron seleccionadas por su potencial como agentes biocontroladores, y la información sobre sus metabolitos antagonistas, sideróforos y ácido indol-3-acético (AIA) se ha reportado previamente en estudios internos de la institución y en literatura relacionada.

Por otro lado, los fitopatógenos empleados fueron aquellos previamente aislados y caracterizados en un estudio anterior (Guanquiza Calero et al., 2025), donde se identificó *Fusarium oxysporum* y *Enterobacter hormaechei* mediante análisis morfológico y PCR.

Actividad antagonica *in vitro* frente a *Fusarium Oxysporum*

Para determinar la actividad antifúngica de los metabolitos secundarios producidos por *Pseudomonas spp.*, se realizó mediante la técnica de difusión en disco descrita por (Balouiri et al., 2016), con modificaciones adaptadas. Las cepas bacterianas se cultivaron en medio líquido King B durante 48 horas a 27 ± 2 °C con agitación constante de 120 rpm. Posterior a ello, los cultivos se centrifugaron a 10 000 rpm durante 15 min y el sobrenadante obtenido se filtró a través de membranas de 0,22 µm para eliminar las células viables, obteniendo de esta manera el extracto libre de células que contiene los metabolitos bacterianos.

El efecto inhibitorio se determinó en placas con medio Papa Dextrosa Agar (PDA) inoculadas en el centro con un disco de 5 mm de diámetro del micelio activo de *Fusarium oxysporum*.



Sobre la superficie del agar se colocaron discos estériles de papel filtro (5 mm de diámetro) impregnados de metabolitos, dispuestos de manera de cruz del centro. Las placas de PDA inoculadas por *Fusarium oxysporum* sin discos bacterianos se utilizaron como control.

La incubación se llevó a cabo a $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante siete días, es decir, un período necesario para el crecimiento completo de micelios en las placas de control (Sokołowski et al., 2024). A continuación, se midieron los diámetros de las zonas de inhibición fúngica alrededor de los discos bacterianos. La actividad antifúngica se calculó como el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM) utilizando la siguiente ecuación, donde:

R1: Diámetro de la colonia fúngica de control.

R2: Diámetro de la colonia fúngica de los tratamientos

$$\text{PICM} = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Actividad antagónica *in vitro* frente a *Enterobacter Hormaechei*

La capacidad antibacteriana de los metabolitos de *Pseudomonas* spp. sobre *Enterobacter hormaechei* se evaluó en cultivo líquido, empleando los metabolitos previamente obtenidos según lo descrito para *Fusarium oxysporum*. En frascos Erlenmeyer se dispuso 10 mL de medio CPG, a los cuales se añadieron 1 000 µL del filtrado de metabolitos de cada cepa de *Pseudomonas* spp. y 200 µL del cultivo de *E. hormaechei*.

Los frascos se incubaron a $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un agitador a 150 rpm durante 24 h. Tras la incubación, se registró la transmitancia (%T) de cada muestra utilizando un espectrofotómetro a 650 nm, siguiendo metodologías previamente descritas para *Enterobacterales* (Axelsson et al., 2024). El control incluyó la bacteria sola. Cada tratamiento se realizó por triplicado y los resultados se expresaron como las medias de las repeticiones.

Diseño experimental

Los ensayos de biocontrol se desarrollaron bajo un diseño completamente al azar, considerando tres repeticiones por tratamiento (Tabla 1). Se establecieron experimentos independientes para evaluar la acción de *Pseudomonas* spp., frente a *Fusarium oxysporum* y frente a enterobacterias.

Los datos experimentales se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) y prueba de Tukey ($p<0.05$) para determinar diferencias significativas entre tratamientos, utilizando el software estadístico InfoStat.

Tabla 1. Tratamientos y repeticiones del ensayo *in vitro*

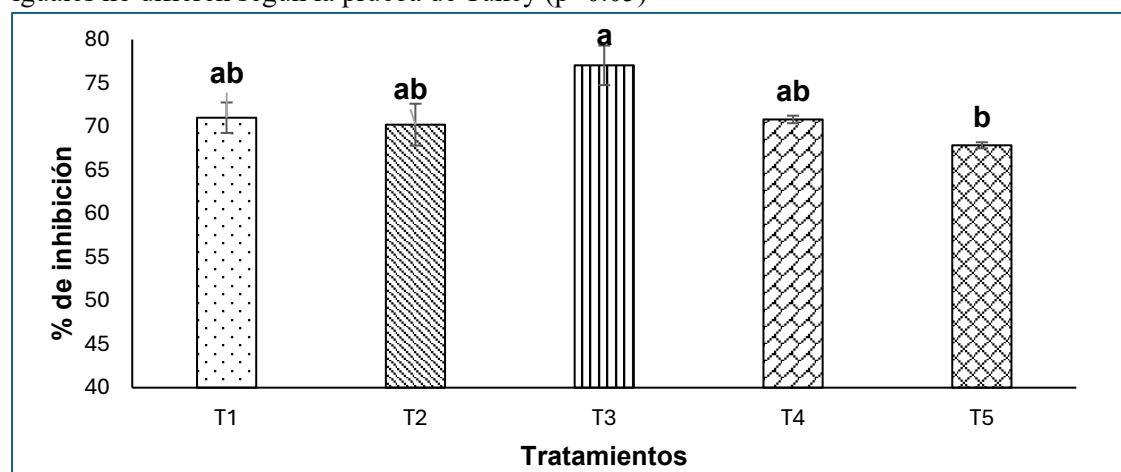
Tratamientos	Descripción	Repeticiones
T1	<i>Pseudomona putida</i> BMR 2-4 + Patógeno	3
T2	<i>Pseudomona putida</i> PB 3-6 + Patógeno	3
T3	<i>Pseudomona putida</i> BO 4-4 + Patógeno	3
T4	<i>Pseudomona protegens</i> CHAO + Patógeno	3
T5	<i>Pseudomona veronii</i> R4 + Patógeno	3
Control	Control (Patógeno)	3

RESULTADOS

Antagonismo *in vitro* de los metabolitos de las *Pseudomonas* spp., frente a *F. oxysporum*

El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($F=3.6$; $p=0.045$) lo que indica que la actividad antifúngica de los metabolitos extracelulares de *Pseudomonas* spp. varió según la cepa utilizada. En la Figura 1, el tratamiento T3, correspondiente a los metabolitos de *Pseudomonas putida* BO 4-4, registró el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo, con un valor de 77.04 %. Le siguieron los tratamientos T1 (*P. putida* BMR 2-4), T4 (*P. protegens* CHAO) y T2 (*P. putida* PB 3-6), con valores de inhibición de 71.02 %, 70.82 % y 70.22 %. Por su parte, el tratamiento T5 (*P. veronii* R4) presentó la menor actividad antifúngica, con un porcentaje de inhibición del 67.85 %

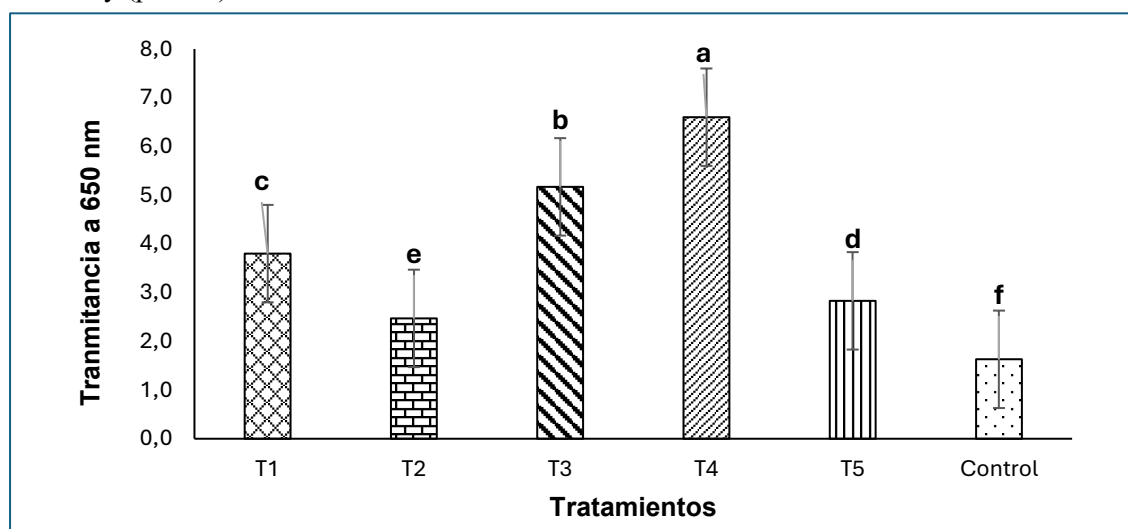
Figura 1. Porcentaje de inhibición de las cepas de *Pseudomonas* spp., frente a *F. oxysporum*. Letras iguales no difieren según la prueba de Tukey ($p<0.05$)



Transmitancia de *Enterobacter hormaechei* en presencia de metabolitos de *Pseudomonas* spp.

Se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($F = 715.79$; $p = 0.0001$). El tratamiento T4, correspondiente a *Pseudomonas protegens* CHA0, registró la mayor inhibición del crecimiento de *E. hormaechei*, evidenciada por un valor de transmitancia de 6.6 %. Le siguió el tratamiento T3, (*Pseudomonas putida* BO 4-4), con una transmitancia del 5.2 %. El control (sin aplicación de metabolitos microbianos) presentó la menor transmitancia, con un 1.6 %, lo que refleja un mayor crecimiento de *E. hormaechei* en ausencia de los metabolitos evaluados.

Figura 2. Transmitancia de *E. hormaechei* en presencia de metabolitos de *Pseudomonas* spp., a las 24 horas de experimentación a una longitud de onda de 650 nm. Letras iguales no difieren según la prueba de Tukey ($p < 0.05$)



DISCUSIÓN

La cepa *P. putida* BO 4-4 presentó el mayor efecto antagonista, lo que indica una mayor producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Weller (2007), quien destaca que diversas cepas de *Pseudomonas* son capaces de controlar hongos fitopatógenos mediante la síntesis de compuestos antibióticos y sideróforos que limitan el acceso de hierro al hongo, así como mediante enzimas que degradan la pared celular.

Estudios experimentales también respaldan esta capacidad. Islam et al. (2018) demostraron que aislados rizosféricos de *Pseudomonas* inhibieron significativamente el crecimiento de *F. oxysporum* en ensayos *in vitro* en plantas de pepino, lo que evidencia la eficacia de estas bacterias como agentes de biocontrol.

Por otro lado, revisiones actuales (Alattas et al., 2024) destacan que la diversidad metabólica de *Pseudomonas* spp. les permite actuar de manera efectiva frente a hongos patógenos, interfiriendo en etapas del ciclo de vida, incluida la germinación de esporas, el crecimiento micelial y la formación de estructuras reproductivas.

Por otro lado, la evaluación de la transmitancia de *E. hormaechei* en presencia de los metabolitos de *Pseudomonas* spp. reveló un efecto inhibitorio, siendo la cepa *Pseudomonas protegens* CHA0 la más eficaz. La reducción en transmitancia indica un menor crecimiento bacteriano, probablemente regulado por metabolitos antagónicos como PR y PRN, capaces de interferir con la síntesis de proteínas esenciales, afectar la integridad de la membrana celular o modular la regulación genética de la bacteria (Canchignia Martínez et al., 2018).

Estos resultados son consistentes con estudios recientes sobre interacciones microbianas antagonistas, que muestran que metabolitos de *Pseudomonas* spp. pueden limitar la proliferación de bacterias fitopatógenas emergentes (Zhang et al., 2023). Así, los metabolitos de *Pseudomonas* spp. podrían constituir una alternativa prometedora para controlar *E. hormaechei* en tabaco, aunque se recomienda realizar estudios *in vivo* que confirmen la eficacia de estos agentes bajo condiciones de cultivo reales.

CONCLUSIONES

Las cepas de *Pseudomonas* spp. demostraron ser eficaces como agentes de biocontrol frente a fitopatógenos de *Nicotiana tabacum* L., inhibiendo su crecimiento *in vitro*. Su uso podría reducir el daño a las plantas, mejorar la rentabilidad del cultivo, proteger el medio ambiente y resguardar la salud de los trabajadores. Se recomienda validar estos resultados mediante estudios *in vivo* para confirmar su aplicabilidad práctica como estrategia sostenible de biocontrol.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ) por permitirnos llevar a cabo las investigaciones en sus laboratorios de Biotecnología y Microbiología, así como por el apoyo logístico brindado. También expresamos nuestro reconocimiento a los encargados de cada área, quienes estuvieron siempre dispuestos a resolver nuestras dudas y facilitar el trabajo experimental. Finalmente, extendemos nuestro agradecimiento a todas las personas que contribuyeron de manera directa o indirecta al desarrollo de este estudio.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abo-Elyousr, K. A. M., Abdel-Rahim, I. R., Almasoudi, N. M., & Alghamdi, S. A. (2021). Native Endophytic *Pseudomonas putida* as a Biocontrol Agent against Common Bean Rust Caused by *Uromyces appendiculatus*. *Journal of Fungi*, 7(9), 745. <https://doi.org/10.3390/jof7090745>
- Akhtar, M. S., Shakeel, U., & Siddiqui, Z. A. (2010). Biocontrol of Fusarium Wilt by *Bacillus Pumilus*, *Pseudomonas Alcaligenes* and *Rhizobium* Sp. On Lentil. *Turkish Journal of Biology*. <https://doi.org/10.3906/biy-0809-12>
- Alattas, H., Glick, B. R., Murphy, D. V., & Scott, C. (2024). Harnessing *Pseudomonas* spp. For sustainable plant crop protection. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1485197>
- Axelsson, C., Nilson, B., & Rehnstam-Holm, A.-S. (2024). Efficient Absorbance-Based Assay for Rapid Antibiotic Susceptibility Testing of Enterobacterales. *Antibiotics*, 13(9), 852. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13090852>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Métodos para la evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana: Una revisión. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Canchignia Martínez, H. F., Chávez-Arteaga, K., Guato-Molina, J., Peñafiel-Jaramillo, M., & Mestanza-Uquillas, C. (2018). Bacterias fluorescentes productoras de metabolitos antagónicos de cultivares nativos de *Musa* sp. Y su diversidad filogenética al gen ARNr 16S. *Ciencia y Tecnología*, 11(2), 17-29. <https://doi.org/10.18779/cyt.v11i2.232>
- Guanquiza Calero, J. C., Freire Vaca, E. R., & Quintana Zambrano, J. J. (2025). Caracterización morfológica y molecular de fitopatógenos causantes de pudrición del tallo en *Nicotiana tabacum* L. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 9(3), 1244-1255. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v9i3.17723
- Islam, Md. A., Nain, Z., Alam, Md. K., Banu, N. A., & Islam, Md. R. (2018). *In vitro* study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against *Fusarium oxysporum* f. Sp. Cucumerinum. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 28(1), 90. <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0097-1>



- Jia, L., Sun, M., He, M., Yang, M., Zhang, M., & Yu, H. (2024). Study on the change of global ecological distribution of *Nicotiana tabacum* L. based on MaxEnt model. *Frontiers in Plant Science*, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1371998>
- Liu, T., Gu, Y., Zhou, Z., Liu, Z., Yin, H., Qin, C., Yi, T., & Tao, J. (2021). Ecological strategies of biological and chemical control agents on wildfire disease of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *BMC Microbiology*, 21(1), 184. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02237-8>
- Mahapatra, B., Ghosh, D., & Mukhopadhyay, R. (2024). Biocontrol potential of *Trichoderma* and *Pseudomonas*: A review. *International Journal of Advanced Biochemistry Research*, 8(4S), 129-132. <https://doi.org/10.33545/26174693.2024.v8.i4Sb.933>
- Retana-Sánchez, K., Castro-Zúñiga, O., Blanco-Meneses, M., Quesada-González, A., Retana-Sánchez, K., Castro-Zúñiga, O., Blanco-Meneses, M., & Quesada-González, A. (2019). Etiología de las pudriciones en el tallo DE *Hylocereus costaricensis*, Provocadas por *Enterobacter hormaechei*, en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 43(2), 61-73. <https://doi.org/10.15517/rac.v43i2.37949>
- Sokołowski, W., Marek-Kozaczuk, M., Sosnowski, P., Sajnaga, E., Jach, M. E., & Karaś, M. A. (2024). Profiling Metabolites with Antifungal Activities from Endophytic Plant-Beneficial Strains of *Pseudomonas chlororaphis* Isolated from *Chamaecytisus albus* (Hack.) Rothm. *Molecules*, 29(18), 4370. <https://doi.org/10.3390/molecules29184370>
- Tsaliki, E., Moysiadis, T., Toumpas, E., Kalivas, A., Panoras, I., & Grigoriadis, I. (2023). Evaluation of Greek Tobacco Varieties (*Nicotiana tabacum* L.) Grown in Different Regions of Greece. *Agriculture*, 13(7), 1394. <https://doi.org/10.3390/agriculture13071394>
- Weller, D. M. (2007). *Pseudomonas* Biocontrol Agents of Soilborne Pathogens: Looking Back Over 30 Years. *Phytopathology*®, 97(2), 250-256. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-2-0250>
- Zhang, Y.-L., Guo, X.-J., Huang, X., Guo, R.-J., Lu, X.-H., Li, S.-D., & Zhang, H. (2023). The Co-Association of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* with Specific Resistant Cucumber against Fusarium Wilt Disease. *Biology*, 12(2), 143. <https://doi.org/10.3390/biology12020143>

