



DOI: https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i6.3568

Modulación diferencial de la actividad enzimática lítica de la pared celular entre *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* durante el biocontrol de *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro

Bautista-Ortega Paula Itzel

paula_baor26@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-1177-105X>

Hernández-Hernández Irving

irving_hdezh@hotmail.com

<https://orcid.org/0000-0002-1425-3258>

Pérez-Pérez Rubén

rperez@cdhidalgo.tecnm.mx

<https://orcid.org/0000-0003-1743-1555>

Soria-Leal Lizeth Yazmín

lsoria@cdhidalgo.tecnm.mx

<https://orcid.org/0000-0002-8342-1470>

Chávez-Avilés Mauricio Nahuam

nchavez@cdhidalgo.tecnm.mx

<https://orcid.org/0000-0002-6588-6653>

Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo
Ciudad Hidalgo – México

Correspondencia: paula_baor26@hotmail.com

Artículo recibido 15 setiembre 2022 Aceptado para publicación: 15 octubre 2022

Conflictos de Interés: Ninguna que declarar

Todo el contenido de **Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar**, publicados en este sitio están disponibles bajo

Licencia [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) 

Cómo citar: Bautista-Ortega , P. I., Hernández-Hernández, I., Pérez-Pérez , R., Soria-Leal, S.-L. L. Y., & Chávez-Avilés, M. N. (2022). Modulación diferencial de la actividad enzimática lítica de la pared celular entre *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* durante el biocontrol de *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 6(6), 732-768. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v6i6.3568

RESUMEN

Colletotrichum gloeosporioides (agente causal de la antracnosis) genera pérdidas significativas en diversos cultivos. Es necesario desarrollar alternativas al control químico para combatir esta enfermedad. En este estudio, se evaluó la eficacia de los tratamientos simples o combinados de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* sobre *C. gloeosporioides* en agar papa dextrosa (PDA) y Luria Bertani (LB). La actividad antagónica individual de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* fue mayor en LB. Se observó un efecto diferencial del grado de inhibición y de la actividad hidrolítica en algunas combinaciones de *Trichoderma* y *Bacillus*. Sin embargo, la combinación de *Trichoderma* T2 y *B. subtilis* mostró compatibilidad, ambas cepas mostraron actividad celulolítica y quitinolítica estable. Por otro lado, el micelio desactivado de *C. gloeosporioides* estimuló las actividades endo- β -1,3-glucanasa, endo- β -1,4-glucanasa y β -N-acetilhexosaminidasa de *B. subtilis* y de las cepas de *Trichoderma* (T2 y T3) excepto la β -N-acetilhexosaminidasa de *Trichoderma* T1. En el sistema tripartito la actividad hidrolítica disminuyó en la mayoría de los sistemas, aunque la actividad β -N-acetilhexosaminidasa incrementó notablemente. Estos resultados sugieren que la combinación de *Trichoderma* T2 y *B. subtilis* posee potencial antagónico sobre *C. gloeosporioides* independientemente del contenido nutricional, por lo que esta mezcla se podría emplear para el tratamiento de la antracnosis.

Palabras clave: agentes de control biológico; antracnosis; co-cultivo.

Differential modulation of cell wall lytic enzyme activity between *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* during the biocontrol of *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro

ABSTRACT

Colletotrichum gloeosporioides (causing agent of anthracnose) provokes significant losses in various agronomic crops. It is necessary to develop alternatives to chemical control to manage this disease. In this study, the effectiveness of single or combined treatments of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis* on *C. gloeosporioides* was determined in Potato Dextrose Agar (PDA) and Luria Bertani (LB). The individual antagonistic activity of *Trichoderma* sp. and *B. subtilis* was higher in LB. A differential effect on the degree of inhibition and hydrolytic activity was observed with some combinations of *Trichoderma* and *Bacillus*. On the other hand, *Trichoderma* T2 and *B. subtilis* showed compatibility between them. Both strains show stable cellulolytic and chitinolytic activity. On the other hand, the inactivated mycelium of *C. gloeosporioides* stimulated the endo- β -1,3-glucanase, endo- β -1,4-glucanase, and β -N-acetylhexosaminidase activities of *B. subtilis* and *Trichoderma* strains (T2 and T3) except β -N-acetylhexosaminidase from *Trichoderma* T1. In the tripartite system, hydrolytic activity decreased in most systems, although β -N-acetylhexosaminidase activity increased significantly. These results suggest that the combination of *Trichoderma* T2 and *B. subtilis* has an antagonistic potential against *C. gloeosporioides*, regardless of the nutrient content, so this mixture could be used to treat anthracnose.

Keywords: biological control agents; anthracnose; co-culture.

INTRODUCCIÓN

Los miembros del género *Colletotrichum* se encuentran entre los principales patógenos de plantas que causan antracnosis, una enfermedad de las plantas con varios huéspedes, desde los árboles hasta la hierba (Ajay Kumar 2014; De Silva et al. 2017). La mayoría de los cultivos en todo el mundo son susceptibles a una o varias especies de *Colletotrichum*, por ejemplo, *C. gloeosporioides* afecta a *Mangifera indica*, causando pérdidas de aproximadamente el 30%-60% (Kefialew y Ayalew 2008; Admasu et al. 2014; Kamle y Kumar, 2016), *Persea americana* (Rodríguez-López et al. 2009; Djami-Tchatchou et al. 2013; Tapia et al. 2020), y *Capsicum annuum* (Than 2008; Welideniya et al. 2019), mientras que *C. acutatum* afecta a *Capsicum annuum*, *Malus domestica*, *Fragaria ananassa*, entre otros (Than 2008; Ashwini y Srividya 2014; Baroncelli et al. 2017).

Debido al impacto económico de esta enfermedad en la agricultura, varios estudios se han centrado en los avances de las técnicas para controlar el crecimiento y desarrollo de las especies del género *Colletotrichum*. El control de la antracnosis se ha basado en gran medida en el uso de fungicidas químicos, como el benomilo, el maneb y el clorotalonil. Sin embargo, estos agentes químicos tienen ciertas desventajas, como la generación de efectos drásticos sobre el medio ambiente y sobre los consumidores, resultado de su frecuente aplicación en cantidades excesivas para obtener un buen rendimiento (Hussain 2008; Tang et al. 2019), por lo tanto, es necesario identificar alternativas para controlar estos fitopatógenos.

Las alternativas más prometedoras para controlar las enfermedades de las plantas se basan en el uso de agentes de control biológico (BCA, por sus siglas en inglés Biological Control Agents). Este enfoque implica el uso de organismos benéficos, así como de sus genes y/o productos para reducir y contrarrestar los efectos de los organismos fitopatógenos. Las especies del género *Trichoderma* son ampliamente utilizadas para este propósito debido a su capacidad para producir numerosos compuestos biológicamente activos, incluidas las enzimas que degradan la pared celular y los metabolitos secundarios (Guzmán-Guzmán et al. 2019). Durante el biocontrol, *Trichoderma* mata a los patógenos a través del micoparasitismo, este proceso implica varios eventos, incluido el reconocimiento, el ataque, la penetración y la muerte del huésped. Durante este proceso, la secreción de enzimas como celulasas, quitinasas y glucanasas juegan un papel

importante en la hidrólisis de la pared celular del hongo fitopatógeno (Guzmán-Guzmán et al. 2019).

Además, las especies de *Trichoderma* producen metabolitos secundarios, como los antibióticos, que les permiten competir con otros microorganismos (Vinale 2008; Guzmán-Guzmán et al. 2019). Aunque *Trichoderma* es un BCA exitoso, es necesario desarrollar estrategias alternativas para mejorar o complementar los métodos existentes. Una alternativa que se ha explorado para este propósito es el uso combinado de BCA junto con un agente químico. Hussain et al. (2008) evaluaron el efecto del uso combinado de *Trichoderma viride*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma hamatum* con captan o mancozeb contra *C. gloeosporioides*. Los resultados mostraron que el uso combinado de los tratamientos biológicos y químicos generó un ligero aumento en la eficiencia de la inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* en comparación con la observada en los tratamientos individuales. Esto llevó a la búsqueda de alternativas que pudieran ser más eficientes en la inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*. En este sentido, *Trichoderma* es un agente de biocontrol natural en comunidades microbianas que interactúa con diversos microorganismos, esto sugiere posibles interacciones entre microorganismos que podrían resultar en un aumento en el proceso de biocontrol (Jambhulkar et al. 2018).

Las bacterias de la rizosfera contienen potenciales BCA, como las cepas de *Bacillus subtilis* aisladas de la rizosfera, que se han utilizado para biocontrolar el hongo fitopatógeno *Macrophomina phaseolina* (Singh et al. 2008) y *Fusarium oxysporum* (Gajbhiye et al. 2010). Adicionalmente, *B. subtilis* produce enzimas líticas como: quitinasas, glucanasas y celulasas (Ashwini y Srividya 2014; Yoo 2009; Živković 2010). Además, los metabolitos secundarios con actividad de biocontrol, como los antibióticos, son producidos por *B. subtilis* (Ashwini y Srividya 2014; Joshi y McSpadden Gardener 2006). Por lo tanto, *B. subtilis* es un candidato ideal para su uso en combinación con *Trichoderma* para potenciar la actividad de biocontrol de cada uno.

Las interacciones microorganismo-microorganismo son la estrategia clave para colonizar diferentes ambientes, desencadena cambios en la señalización y la expresión génica, y aumenta la capacidad competitiva de los miembros de la comunidad microbiana. Las interacciones entre microorganismos son cruciales para muchos procesos y los organismos responden mediante el intercambio metabólico, lo que lleva a respuestas

reguladoras complejas (diafonía) (Cosetta y Wolfe, 2019). Por otro lado, las interacciones fúngico-bacteriana pueden conducir a la producción de metabolitos secundarios, modulando la comunicación entre especies. La producción de tales compuestos depende de la disponibilidad de fuentes de nutrientes (carbono y nitrógeno), que determinan el metabolismo de los microbios y desempeñan un papel clave en los rasgos de biocontrol de los BCA (Blackburn et al. 2016). Además, las interacciones físicas también contribuyen a esto (Braga et al. 2016; Frey-Klett et al. 2011; Cosetta y Wolfe, 2019). Emanuel et al. (2020) reportaron que el micelio desactivado de *C. gloeosporioides* indujo la biosíntesis de compuestos orgánicos con propiedades antifúngicas en sistemas de co-cultivo de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis*, reportaron compuestos específicos y comunes producidos en los sistemas. En el primer grupo, reportaron compuestos como 2-butoxietanol, ácido hexadecanoico y ácido octadecanoico; en el segundo grupo, se reportaron butanoato de etilo, acetato de butilo, ácido acético y alcohol 3,5-di-*tert*-butil-4-hidroxibencil.

Además, el contacto físico entre BCA (por ejemplo, *Trichoderma* sp. y *B. subtilis*) y fitopatógenos fúngicos desencadena la producción de enzimas hidrolíticas de la pared celular fúngica, que degradan las paredes celulares de fitopatógenos a través de la hidrólisis de sus componentes (polisacáridos de glucano y quitina) (Ghazanfar et al. 2018, Shafi et al. 2017). Por lo tanto, es necesario identificar combinaciones de BCA que generen un proceso de biocontrol efectivo para *C. gloeosporioides*, cuyos mecanismos de acción sean estables independientemente de la disponibilidad de nutrientes. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la co-inoculación de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* en el biocontrol de *C. gloeosporioides in vitro* tanto en medio Agar Papa Dextrosa (PDA) como Luria Bertani (LB), y analizar el papel de las condiciones nutricionales en la compatibilidad entre BCA y su actividad hidrolítica durante el proceso de biocontrol.

METODOLOGÍA

Cepas y condiciones de cultivo

Trichoderma IMI206040, JS3, T1, T2 y T3, *C. gloeosporioides*, *Bacillus subtilis* (aislado de una solución madre de SERENADE® Max (Bayer CropScience)), *Escherichia coli* JM101 [*supE thi Δ(lac-proAB) F'(traD36 proAB' lacIq lacZΔM15)*] (Sambrook y Russell, 2001), se cultivaron en medio PDA (DIBICO®) y LB a temperatura ambiente (21 ± 2 °C) en la oscuridad. Para la actividad lítica, las cepas se cultivaron en caldo Papa Dextrosa (PD) a

30 °C y 280 rpm, y se inoculó con 1×10^7 esporas/mL y otro de 1×10^8 UFC/mL de las cepas de *Trichoderma* sp. (IMI206040, JS3, T1, T2 y T3) y *B. subtilis*, respectivamente. La cinética de crecimiento de las cepas fue monitoreada mediante la cuantificación de azúcares reductores utilizando el método de ácido dinitrosálico (DNS) descrito por Miller (1959).

Determinación de la actividad antagonista en sistemas bipartitos

Para analizar la capacidad de biocontrol individual de cada cepa sobre *C. gloeosporioides* se realizaron, ensayos de antagonismo en PDA, y se normalizó la tasa de crecimiento para evitar el efecto de la competencia por el espacio y la absorción de nutrientes por las cepas de *Trichoderma* sp. Para ello, se evaluó la cinética de crecimiento de los microorganismos empleados tanto en medio PDA como LB, y se determinó la tasa de crecimiento. La inoculación de la cepa se realizó en diferentes puntos temporales, de tal manera que la confrontación de las cepas comenzó cuando cada una alcanzó su crecimiento medio promedio (**Figura Suplementaria 1**). *B. subtilis* o *Trichoderma* (IMI206040, JS3, T1, T2 y T3) se colocaron en las placas después de 24 o 72 h de la inoculación e incubación con *C. gloeosporioides*, respectivamente. Para *Trichoderma* sp. se colocaron discos miceliales (4 mm de diámetro) en una placa Petri equidistantemente a un disco de micelio de *C. gloeosporioides*. Para evaluar las bacterias antagonistas, se colocó un disco de agar de 4 mm cubierto con *B. subtilis* en una placa Petri junto con discos de micelio de *C. gloeosporioides*. Se utilizó *Escherichia coli* JM101 como control. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad. Además, el mismo experimento se realizó en medio LB para evaluar si la actividad de biocontrol de *B. subtilis* se modificaba en PDA, debido a las diferencias en las condiciones experimentales. *C. gloeosporioides*, y *B. subtilis* o *Trichoderma* sp. (T1, T2 o T3) se colocaron simultáneamente, mientras que *Trichoderma* sp. IMI206040 y *Trichoderma* JS3 se colocaron 72 h después de la incubación con el fitopatógeno. Los experimentos se repitieron tres veces, con tres réplicas por tratamiento. La inhibición del crecimiento se determinó utilizando la siguiente ecuación: $\text{inhibición del crecimiento} = ((\text{crecimiento control} - \text{crecimiento tratamiento}) / \text{crecimiento control}) \times 100$ (Emanuel et al. 2020).

Determinación de la actividad antagónica en el sistema tripartito en medio PDA y LB

Para evaluar la compatibilidad de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis*, así como la mejora del potencial en su actividad de biocontrol, se realizaron ensayos tripartitos sobre medio PDA y LB. *C. gloeosporioides* se colocó en el medio, y después de 24 o 72 h de incubación, se

colocaron *B. subtilis* y *Trichoderma* sp. La cepa de *Trichoderma* (T1, T2 o T3) se colocó en la misma placa Petri de manera equidistante. El mismo experimento se realizó en medio LB, y el crecimiento se normalizó bajo estas condiciones experimentales. *C. gloeosporioides*, *B. subtilis*, y *Trichoderma* sp. (T1, T2 o T3) se colocaron simultáneamente, mientras que *Trichoderma* IMI206040 y *Trichoderma* JS3 se colocaron después de 72 h de incubación de *C. gloeosporioides* y *B. subtilis*. Los experimentos se repitieron tres veces con tres réplicas para cada tratamiento. La inhibición del crecimiento se reportó como porcentaje.

Determinación de la actividad antagonista entre BCA

Los ensayos de confrontación dual entre cepas antagonistas (*Trichoderma* sp. y *B. subtilis*) se realizaron tanto en medio PDA como en LB. Para los sistemas realizados en medio PDA, los discos (4 mm de diámetro) de *B. subtilis* fueron inoculados e incubados durante 48 h, en este punto los discos miceliales (4 mm de diámetro) de *Trichoderma* sp. (JS3, T1, T2 o T3) se colocaron equidistantemente al disco de *B. subtilis* previamente inoculado, como control se realizó el mismo ensayo sustituyendo *B. subtilis* por *E. coli*. En el caso de los sistemas realizados en medio LB, ambas cepas antagónicas fueron inoculadas simultáneamente. Los ensayos se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad. El crecimiento se midió cada 24 h durante 72 h y 120 h para los ensayos realizados en medios PDA y LB, respectivamente. Se graficó la inhibición del crecimiento de cada cepa evaluada.

Análisis cualitativo de la endo- β -1,4-glucanasa en medio sólido

La actividad enzimática de la endo- β -1,4-glucanasa se determinó sobre medio PDA y LB utilizando carboximetilcelulosa al 1% (CMC, Sigma-Aldrich). Para este ensayo, se colocó un disco de 8 mm de diámetro de medios cubiertos con cada cepa en placas CMC-PDA y CMC-LB, las cuales se incubaron a temperatura ambiente en la oscuridad. La actividad enzimática en los ensayos bipartitos y tripartitos fue monitoreada a los 12 y 7 días después de la incubación en medio PDA y LB, respectivamente. La actividad se evaluó a través de la tinción con rojo Congo utilizando un método modificado descrito por Sazci (1986) y Javaheri-Kermani y Asoodeh (2019), se agregaron 5 mL de una solución de rojo Congo al 3% al medio, y después de 15 minutos de incubación, se eliminó la solución. A continuación, se agregaron 5 mL de cloruro de sodio de 0.3 M y, después de 15 minutos de incubación, se retiró la solución. El área de degradación de CMC se midió utilizando el

software ImageJ (Bourne 2010), y se analizaron los resultados. Los experimentos se repitieron dos veces con tres réplicas para cada tratamiento.

Análisis cualitativo de la actividad de la β -N-acetilhexosaminidasa en medio sólido

La actividad de la β -N-acetilhexosaminidasa se evaluó sobre medio PDA y LB que contenía 1% de quitina coloidal (CC), que se preparó utilizando un método modificado descrito por Roberts y Selitrennikoff (1988). Se disolvieron 40 g de quitina de cáscaras de camarón (Sigma-Aldrich) en 400 mL de ácido clorhídrico concentrado. La solución se agitó a 150 rpm durante 2 h; luego, se agregaron 2 L de agua destilada refrigerada. A continuación, la mezcla se agitó rápidamente hasta que la quitina se precipitó, y luego se tamizó para obtener la CC, se lavó tres veces con 200 mL de agua destilada. Para analizar la actividad quitinolítica, se colocó un disco de medio de 8 mm de diámetro cubierto con cada cepa en medio CC-PDA y CC-LB e incubó a temperatura ambiente en la oscuridad. La actividad enzimática para ensayos bipartitos y tripartitos fue monitoreada a los 12 y 7 días después de la inoculación en medio PDA y LB, respectivamente. La actividad se evaluó mediante tinción con rojo Congo, como se describió anteriormente (Sazci 1986). El área de degradación de CC se midió utilizando ImageJ (Bourne 2010), y se analizaron los resultados. Los experimentos se repitieron dos veces con tres réplicas para cada tratamiento.

Desactivación de micelio de *C. gloeosporioides*

El micelio de *C. gloeosporioides* se desactivó utilizando el método descrito por Yang (2009), en 250 mL de caldo PD se inocularon cuatro discos de micelio de *C. gloeosporioides*. El cultivo se incubó durante cinco días a 30 °C y 280 rpm, después de lo cual la biomasa se filtró con papel filtro. El micelio se colocó en un matraz Erlenmeyer de 500 mL que contenía 250 mL de agua destilada, que se calentó a 100 °C durante 30 minutos y luego se tamizó. La biomasa se recuperó y almacenó a -20 °C hasta su uso.

Determinación de azúcares reductores utilizando el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico

La concentración de azúcares reductores generados en el caldo PD en diferentes sistemas de biocontrol se determinó utilizando el método descrito por Miller (1959). Para cada muestra, se agregaron 20 μ L de muestra a 180 μ L de agua destilada en un tubo cónico, después de lo cual se mezcló la solución, y luego se agregaron 300 μ L de reactivo de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS; Sigma-Aldrich). La solución se incubó durante cinco minutos en un baño de agua hirviendo, y la reacción se detuvo transfiriendo los tubos cónicos a un

baño de agua fría durante un minuto. Después de esto, se agregaron 1.5 mL de agua destilada a la mezcla, y los azúcares reductores se midieron espectrofotométricamente a 540 nm. Se realizó una curva de calibración utilizando soluciones de dextrosa (Meyer) con un valor de R^2 de 0.9965.

Análisis de la actividad de la endo- β -1,3, la endo- β -1,4-glucanasa y la β -N-acetilhexosaminidasa

Para evaluar la actividad celulolítica y quitinolítica, se inocularon 50 mL de caldo PD con 1×10^7 esporas/mL de cada cepa de *Trichoderma* sp. y/o 1×10^8 UFC/mL de *B. subtilis*, y se incubaron a 30 °C y 280 rpm, después de 0, 24, 48 y 72 h de incubación, se extrajeron muestras de 1 mL y se centrifugaron a 9,580 **g** durante 5 minutos. La actividad de la endo- β -1,3- y endo- β -1,4-glucanasa se midió para cada muestra mezclando 20 μ L de sobrenadante con 180 μ L de tampón de acetato de sodio (pH 5,0; 50 mM) suplementado con laminarina al 0.25% de *Laminaria digitata* (Sigma-Aldrich) (Mestre et al. 2017; Ting y Chai 2015; da Silva Aires et al. 2012) o CMC al 1% (Sigma-Aldrich) (Sahin et al. 2013), respectivamente. Las mezclas se incubaron a 37 ± 2 °C o 50 ± 2 °C para evaluar la actividad de la endo- β -1,3- y la endo- β -1,4-glucanasa, respectivamente. Una unidad internacional (UI) de actividad de endo- β -1,3 y endo- β -1,4-glucanasa se definió como 1 μ mol de azúcar reductor liberado por $\text{min}^{-1}\text{mL}^{-1}$ en las condiciones anteriores. La actividad quitinolítica se midió mediante una modificación del método descrito por Ting y Chai (2015). Para medir la actividad de la β -N-acetilhexosaminidasa, se mezclaron 20 μ L de sobrenadante con 180 μ L de tampón de fosfato de sodio (pH 7,0; 50 mM) suplementados con CC al 1%, después de lo cual la mezcla se incubó a 30 °C durante 30 min. Las reacciones se detuvieron agregando 300 μ L de reactivo DNS. Los azúcares reductores fueron analizados como se describió anteriormente. Una unidad internacional (UI) de actividad de la β -N-acetilhexosaminidasa fue definida como 1 μ mol de azúcar reductor liberado por $\text{min}^{-1}\text{mL}^{-1}$ en las condiciones anteriores. Para los sistemas bipartito y tripartito, el caldo PD se suplementó con micelio desactivado de *C. gloeosporioides* al 1%. Para el sistema bipartito, se añadieron simultáneamente 1×10^7 esporas/mL de las cepas de *Trichoderma* sp. o 1×10^8 UFC/mL de *B. subtilis*, mientras que, para el sistema tripartito, se añadieron 1×10^8 UFC/mL de *B. subtilis* después de 24 h de incubación con *Trichoderma* sp. La actividad de la endo- β -1,3, endo- β -1,4-glucanasa y β -N-acetilhexosaminidasa se monitorearon a las 0, 24, 48 y 72 h después de la incubación para los sistemas

individuales, bipartitos y tripartitos. Los experimentos se repitieron tres veces con tres réplicas para cada tratamiento.

Análisis estadístico

Se utilizó Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) para todos los análisis estadísticos. Los datos se expresaron como la media \pm DE de tres mediciones y se analizaron mediante un ANOVA unidireccional seguido del análisis *post hoc* de Tukey para probar las diferencias en el porcentaje de inhibición de *C. gloeosporioides*, el crecimiento, las actividades celulolíticas y quitilíticas, y actividades de endo- β -1,3-glucanasa, endo- β -1,4-glucanasa y β -N-acetilhexosaminidasa. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $\alpha=0.01$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar la actividad de biocontrol de las cepas de *B. subtilis*, *Trichoderma* (IMI206040, JS3, T1, T2 y T3) contra *C. gloeosporioides*, se realizó un ensayo bipartito. Todas las cepas evaluadas fueron capaces de inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* en medio PDA. La cepa menos eficiente fue *Trichoderma* T1, que generó el 32.6% de inhibición, mientras que *Trichoderma* JS3 y *B. subtilis* alcanzaron el 55.1% y 57.1% de inhibición, respectivamente. Las cepas más eficientes fueron *Trichoderma* IMI206040, *Trichoderma* T3 y *Trichoderma* T2, que inhibieron el crecimiento de *C. gloeosporioides* en un 70.4%, 67.3% y 62.4%, respectivamente (**Tabla 1 y Figura suplementaria 2**). Adicionalmente, para determinar si la actividad de biocontrol de *B. subtilis* disminuyó en medio PDA, se realizó un ensayo de antagonismo en medio LB. En estas condiciones, se modificaron las actividades de biocontrol de las cepas. *Trichoderma* JS3 y *Trichoderma* IMI206040 mostraron reducciones en su actividad de biocontrol frente a *C. gloeosporioides* consiguieron el 44.2% y 31.5% de inhibición, respectivamente. *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2, *Trichoderma* T3 y *B. subtilis* exhibieron una mayor actividad de biocontrol contra *C. gloeosporioides* bajo estas condiciones. *Trichoderma* T1 y *Trichoderma* T2 exhibieron una inhibición de *C. gloeosporioides* del 87.1%, mientras que *Trichoderma* T3 y *B. subtilis* obtuvieron el 79.1% y 70.8%, respectivamente (**Tabla 1 y Figura Suplementaria 2**). Estos resultados sugieren que la actividad de biocontrol es específica para cada cepa, y esta actividad puede estar fuertemente influenciada por otros factores, como la fuente de nutrientes.

Para evaluar la eficiencia del proceso de biocontrol de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* en *C. gloeosporioides*, se realizó un ensayo tripartito. Las cepas antagonistas mostraron actividad de biocontrol contra *C. gloeosporioides* en medio PDA para todas las combinaciones probadas. La combinación de *Trichoderma* T2 y *B. subtilis* mostró la mayor tasa de inhibición con un 76%, que también fue mayor que la inhibición observada en los sistemas bipartitos para estas cepas (Tabla 1 y Figura suplementaria 2). Otras combinaciones mostraron inhibición de 43.5% a 53.1%. Además, la combinación de *Trichoderma* T1 y *B. subtilis* mostró una inhibición del 53.1%, que fue un porcentaje mayor que el observado para *Trichoderma* T1, y similar a la inhibición observada para *B. subtilis* en el sistema bipartito. En contraste, en medio LB, las combinaciones con las tasas de inhibición más altas fueron *Trichoderma* T2 y *B. subtilis*, seguido de *Trichoderma* T1 y *B. subtilis*, así como *Trichoderma* T3 y *B. subtilis* (71.3%, 66.3% y 59%, respectivamente). Las combinaciones de *Trichoderma* IMI206040 y *B. subtilis* así como *Trichoderma* JS3 y *B. subtilis* mostraron el 15% y 31% de inhibición, respectivamente (Tabla 1 y Figura Suplementaria 2).

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de cepas antagonistas sobre el crecimiento de *C. gloeosporioides* en los sistemas bipartito y tripartito

Ensayo	Inhibición (%)			
	Sistema bipartito (<i>Trichoderma</i> sp. o <i>B. subtilis</i>)		Sistema tripartito (<i>Trichoderma</i> sp. + <i>B. subtilis</i>)	
	Medio			
	PDA	LB	PDA	LB
Control	3.54 ± 1.53 A d	1.64 ± 1.65 A d	1.56 ± 1.56 A c	5.32 ± 3.69 A c
<i>Trichoderma</i> IMI206040	70.40 ± 1.76 A a	31.59 ± 0.27 C c	50.00 ± 5.82 B b	15.45 ± 1.41 C bc
<i>Trichoderma</i> JS3	55.10 ± 6.37 A ab	44.23 ± 5.22 A c	43.54 ± 6.45 A b	31.71 ± 6.45 A b
<i>Trichoderma</i> T1	32.65 ± 6.12 B c	87.18 ± 0.63 A a	53.12 ± 5.41 AB b	66.39 ± 2.84 A a
<i>Trichoderma</i> T2	62.24 ± 1.77 B a	87.18 ± 1.68 A a	76.04 ± 1.80 AB a	71.31 ± 3.76 B a
<i>Trichoderma</i> T3	67.34 ± 1.77 A a	79.12 ± 4.40 A a	50.00 ± 3.12 AB b	59.02 ± 3.76 AB a
<i>Bacillus subtilis</i>	57.14 ± 0.001 B ab	70.88 ± 3.43 A b		

Nota: Los datos son la media ± DE, n=3. Diferentes letras mayúsculas y minúsculas representan diferentes medias significativas para la misma cepa (datos horizontales) y medios de cultivo (datos verticales), respectivamente (nivel de significancia de 0.001 en la prueba *post-hoc* de Tukey).

Todas las combinaciones en el sistema tripartito en medio LB mostraron menor inhibición que la observada en los sistemas bipartitos en el mismo medio. Esto puede deberse a que la cepa de *B. subtilis* afecta la actividad de biocontrol de las cepas de *Trichoderma*. Estos resultados refuerzan la hipótesis de que las condiciones nutricionales y las interacciones de microorganismos determinan la actividad de biocontrol de cepas antagonistas como *Trichoderma* sp. y *B. subtilis*, regulando sus mecanismos de biocontrol individuales.

Los resultados observados en los ensayos antagónicos sugieren que la diafonía ocurre entre *Trichoderma* sp., *B. subtilis*, y *C. gloeosporioides* durante el proceso de biocontrol. Para evaluar más a fondo este problema, se evaluaron las actividades celulolíticas y quitilíticas en medio PDA y LB.

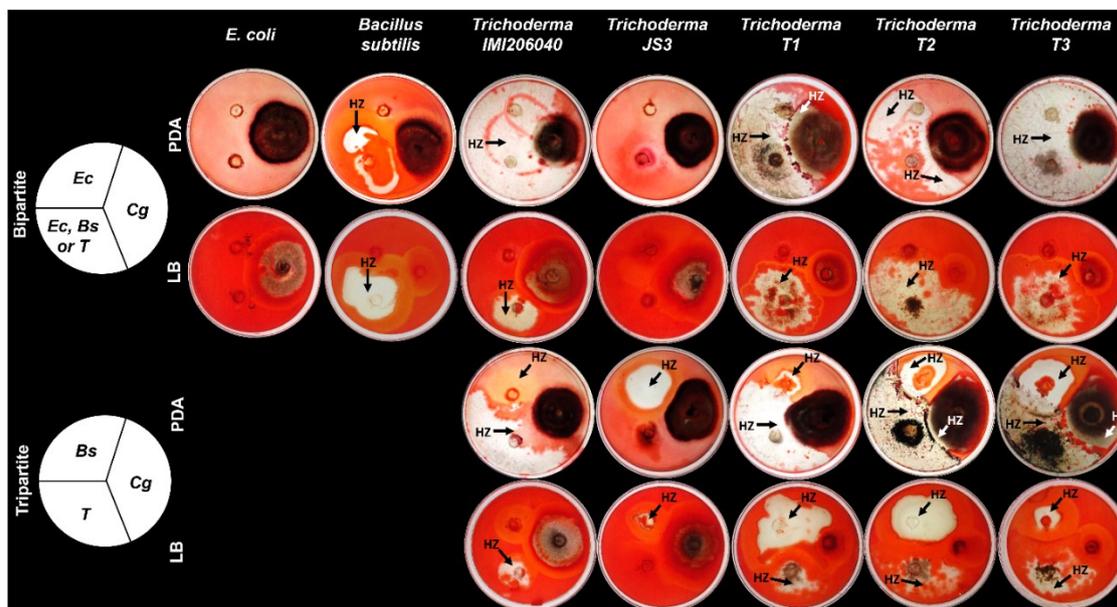


Figura 1. Actividad celulolítica de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* durante el proceso de biocontrol de *C. gloeosporioides* en sistemas bipartitos y tripartitos. Fotografías representativas de la actividad celulolítica de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* en sistemas bipartitos y tripartitos en medios PDA y LB durante el proceso de biocontrol en *C. gloeosporioides*. Las cepas fueron inoculadas en medios PDA y LB suplementados con CMC al 1%, al final del ensayo las zonas de hidrólisis fueron reveladas por tinción con rojo Congo, las áreas blancas son indicativas de la presencia de actividad celulolítica. Se utilizó *E. coli* como tratamiento de control. *Ec* (*E. coli*), *Bs* (*B. subtilis*), *T* (*Trichoderma* sp.), *Cg* (*C. gloeosporioides*) y *HZ* (zona de hidrólisis).

En términos de actividad celulolítica, *C. gloeosporioides* mostró zonas hidrolíticas menores de estas actividades en los ensayos bipartitos y tripartitos tanto en medio PDA como LB en presencia de *Trichoderma* sp. o *B. subtilis* (Figura 1, Tablas 2 y 3). Además, tanto las cepas de *Trichoderma* sp. como *B. subtilis* mostraron zonas de actividad celulolítica. Las cepas de *Trichoderma* (excepto *Trichoderma* JS3) mostraron hidrólisis de CMC tanto en medio PDA como en LB, así como *B. subtilis*, como lo demuestra la tinción con rojo Congo. Se observó una disminución en la zona de actividad celulolítica para *Trichoderma* sp. en los sistemas bipartitos realizados en medio LB en comparación con la observada en medio PDA, excepto en *Trichoderma* T2. *Trichoderma* IMI206040, *Trichoderma* T1 y *Trichoderma* T3 disminuyeron su actividad celulolítica en un 80.5%, 42.5%, 43% y 54%, respectivamente. En contraste, *Trichoderma* T2 mostró un aumento en la actividad celulolítica en un 37% (Figura 1 y Tabla 2).

Del mismo modo, la actividad celulolítica de las cepas de *Trichoderma* disminuyó en los sistemas tripartitos realizados en medio LB en comparación con la observada en medio PDA. *Trichoderma* IMI206040, *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3 disminuyeron su actividad celulolítica en un 73%, 66%, 52% y 70%, respectivamente (Figura 1 y Tabla 3). En este sentido, tal disminución en la actividad celulolítica de *Trichoderma* podría deberse al menor crecimiento de estas cepas en medio LB con respecto a lo observado en medio PDA tanto para sistemas bipartitos como tripartitos (Figura 1).

La actividad celulolítica de *B. subtilis* en el sistema bipartito realizado en medio LB aumentó en un 157% en comparación con el observado en medio PDA (Figura 1 y Tabla 2). En contraste, en los sistemas tripartitos, se observaron dos efectos: estimulación y disminución de la actividad celulolítica de *B. subtilis*. En el primer grupo, *B. subtilis* alcanzó un aumento de la actividad celulolítica en los sistemas conformados por *Trichoderma* T1 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides* y *Trichoderma* T3 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides*, en un 560% y 12.38%, respectivamente, en comparación con los observados en los mismos sistemas realizados en PDA.

Tabla 2. Actividad celulolítica de *Trichoderma* sp. y *C. gloeosporioides* en ensayos bipartitos durante el proceso de biocontrol de *C. gloeosporioides*

Ensayo Bipartito	Actividad celulolítica (área de hidrólisis (cm ²))			
	Cepa antagonista		<i>C. gloeosporioides</i>	
	Medio			
	PDA	LB	PDA	LB
<i>Trichoderma</i> IMI206040 vs. <i>C. gloeosporioides</i>	43.20 ± 1.01 a	8.42 ± 0.4 bc	1.71 ± 0.24 ab	2.11 ± 1.10
<i>Trichoderma</i> JS3 vs. <i>C. gloeosporioides</i>	0.00 ± 0.00 e	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 b	1.43 ± 0.14
<i>Trichoderma</i> T1 vs. <i>C. gloeosporioides</i>	30.38 ± 0.40 b	17.47 ± 2.19 ab	3.78 ± 1.17 a	0.24 ± 0.24
<i>Trichoderma</i> T2 vs. <i>C. gloeosporioides</i>	19.77 ± 0.40 c	27.23 ± 0.49 a	0.00 ± 0.00 b	0.67 ± 0.67
<i>Trichoderma</i> T3 vs. <i>C. gloeosporioides</i>	45.98 ± 1.76 a	21.21 ± 7.07 ab	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00
<i>B. subtilis</i> vs. <i>C. gloeosporioides</i>	5.34 ± 0.31 d	13.74 ± 0.77 abc	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00

Nota: Los datos son la media ± DE, n=3. Diferentes letras representan diferentes medias estadísticamente significativas en el mismo medio de cultivo (datos verticales) (nivel de significancia de 0.001 en la prueba *post-hoc* de Tukey). Los datos sin grupos estadísticos no mostraron ninguna diferencia estadística entre ellos.

En el segundo grupo, *B. subtilis* disminuyó la actividad celulolítica en los sistemas *Trichoderma* IMI206040 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides*, *Trichoderma* JS3 vs. *B. subtilis*

vs. *C. gloeosporioides*, y *Trichoderma* T2 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides*, en un 100%, 74% y 55%, respectivamente, en comparación con los observados en los mismos sistemas realizados en PDA (Figura 1 y Tabla 3). Estos resultados muestran que la actividad celulolítica de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* es diferencial en los sistemas bipartito y tripartito en ambos medios.

Tabla 3. Actividad celulolítica de *Trichoderma* sp., *B. subtilis* y *C. gloeosporioides* en ensayos bipartitos durante el proceso de biocontrol de *C. gloeosporioides*

Ensayo Tripartito	Actividad celulolítica (área de hidrólisis (cm ²))					
	<i>Trichoderma</i> sp.		<i>B. subtilis</i>		<i>C. gloeosporioides</i>	
	Medio					
	PDA	LB	PDA	LB	PDA	LB
<i>Trichoderma</i> IMI206040 vs. <i>B. subtilis</i> vs. <i>C. gloeosporioides</i>	19.85 ± 0.35 a	5.41 ± 1.04	8.06 ± 0.19 a	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00	1.79 ± 1.79
<i>Trichoderma</i> JS3 vs. <i>B. subtilis</i> vs. <i>C. gloeosporioides</i>	0.00 ± 0.00 b	0.00 ± 0.00	7.90 ± 1.03 a	2.02 ± 1.17 b	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>Trichoderma</i> T1 vs. <i>B. subtilis</i> vs. <i>C. gloeosporioides</i>	22.65 ± 3.15 a	7.63 ± 3.49	2.30 ± 0.89 b	15.18 ± 0.84 a	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>Trichoderma</i> T2 vs. <i>B. subtilis</i> vs. <i>C. gloeosporioides</i>	26.28 ± 1.66 a	12.59 ± 4.11	5.28 ± 0.19 ab	2.36 ± 0.04 b	0.29 ± 0.29	0.00 ± 0.00
<i>Trichoderma</i> T3 vs. <i>B. subtilis</i> vs. <i>C. gloeosporioides</i>	22.02 ± 3.30 a	6.63 ± 1.80	8.41 ± 1.02 a	12.38 ± 1.41 a	1.88 ± 1.88	0.00 ± 0.00

Nota: Los datos son la media ± DE, n=3. Diferentes letras representan diferentes medias estadísticamente significativas en el mismo medio de cultivo (datos verticales) (nivel de significancia de 0.001 en la prueba *post-hoc* de Tukey). Los datos sin grupos estadísticos no mostraron ninguna diferencia estadística entre ellos.

En cuanto a la actividad quitinolítica, *C. gloeosporioides* mostró actividad quitinolítica limitada o nula en los sistemas bipartito y tripartito realizados tanto en medio PDA como LB. *Trichoderma* IMI206040, *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3 fueron capaces de hidrolizar CC en los medios PDA o LB en los sistemas bipartito y tripartito, según lo determinado por la presencia de zonas claras, mientras que *Trichoderma* JS3 mostró escasa actividad en el sistema tripartito realizado en PDA (Figura 2, Tablas 4 y 5). Las cepas de *Trichoderma* mostraron una disminución en la actividad quitinolítica en los sistemas bipartitos realizados en medio LB, y *Trichoderma* IMI206040, *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3, disminuyeron su actividad quitinolítica en un 91%, 73%, 40% y 73%, respectivamente, en comparación con las correspondientes al medio PDA (Figura 2 y Tabla 4). Del mismo modo, en los sistemas tripartitos realizados en medio LB, la actividad quitinolítica de *Trichoderma* IMI206040, *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2

y *Trichoderma* T3 disminuyó en un 91%, 56%, 31% y 61%, respectivamente, en comparación con la observada en el medio PDA (Figura 2 y Tabla 5).

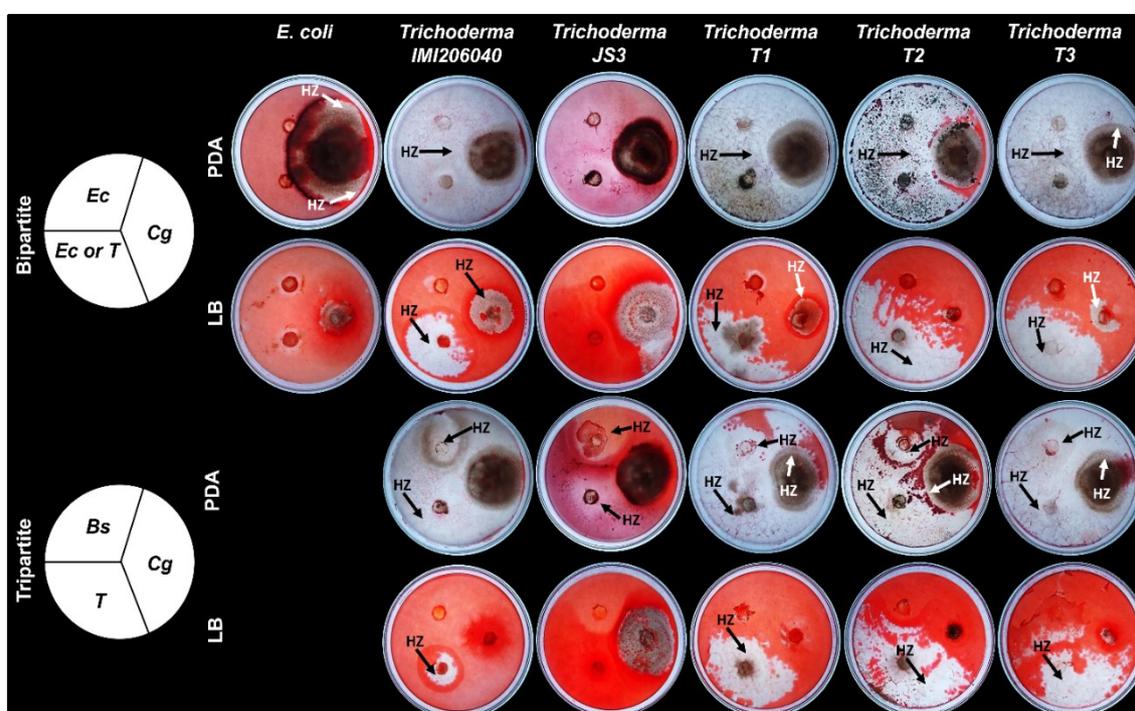


Figura 2. Actividad quitinolítica de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* durante el proceso de biocontrol de *C. gloeosporioides* tanto en sistemas bipartito como tripartitos. Fotografías representativas de la actividad quitinolítica de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* en los sistemas bipartitos y tripartitos sobre medio PDA y LB durante el proceso de biocontrol de *C. gloeosporioides*. Las cepas fueron inoculadas en medio PDA y LB suplementadas con CC al 1%, al final del ensayo las zonas de hidrólisis fueron reveladas tinción con rojo Congo, las áreas blancas son indicativas de la presencia de actividad quitinolítica. Se utilizó *E. coli* como tratamiento de control. *Ec* (*E. coli*), *Bs* (*B. subtilis*), *T* (*Trichoderma* sp.), *Cg* (*C. gloeosporioides*) y HZ (zona de hidrólisis).

Además, *Trichoderma* IMI206040, *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3 en los sistemas tripartitos disminuyeron su actividad quitinolítica en un 4%, 15%, 36% y 21%, respectivamente, en comparación con los observados en los sistemas bipartitos correspondientes (Figura 2, Tablas 4 y 5). Sin embargo, en medio LB, la actividad hidrolítica cambió entre los sistemas bipartitos y tripartitos. *Trichoderma* IMI206040 y *Trichoderma* T2 disminuyeron su actividad hidrolítica en un 11% y 27%, respectivamente, en los sistemas tripartitos conformados por *Trichoderma* IMI206040 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides* y *Trichoderma* T2 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides*, respectivamente, en comparación con la actividad observada en los sistemas bipartitos.

Tabla 4. Actividad quitinolítica de *Trichoderma* sp. y *C. gloeosporioides* en los ensayos bipartitos durante el proceso de biocontrol en *C. gloeosporioides*

Ensayo Bipartito	Actividad quitinolítica (área de hidrólisis (cm ²))			
	<i>Trichoderma</i> sp.		<i>C. gloeosporioides</i>	
	Medio			
	PDA	LB	PDA	LB
<i>Trichoderma</i> IMI206040 vs. <i>C. gloeosporioides</i>	47.79 ± 0.84 ab	4.41 ± 7.63 ab	6.63 ± 0.26 ab	3.33 ± 4.71
<i>Trichoderma</i> JS3 vs. <i>C. gloeosporioides</i>	0.00 ± 0.00 c	0.00 ± 0.00 b	0.76 ± 0.66 c	9.76 ± 7.67
<i>Trichoderma</i> T1 vs. <i>C. gloeosporioides</i>	46.68 ± 3.59 ab	12.43 ± 3.60 ab	11.19 ± 2.81 a	2.81 ± 1.82
<i>Trichoderma</i> T2 vs. <i>C. gloeosporioides</i>	44.85 ± 3.54 b	26.75 ± 9.73 a	5.08 ± 0.24 bc	0.00 ± 0.00
<i>Trichoderma</i> T3 vs. <i>C. gloeosporioides</i>	53.27 ± 1.13 a	14.14 ± 9.12 ab	6.46 ± 1.36 ab	1.28 ± 1.12

Nota: Los datos son la media ± DE, n=3. *Diferentes letras* representan diferentes medias estadísticamente significativas en el mismo medio de cultivo (datos verticales) (nivel de significancia de 0.001 en la prueba *post-hoc* de Tukey). Los datos sin grupos estadísticos no mostraron ninguna diferencia estadística entre ellos.

En contraste, *Trichoderma* T1 y *Trichoderma* T3 aumentaron su actividad hidrolítica en un 40% y 15%, en los sistemas *Trichoderma* T1 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides* y *Trichoderma* T3 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides* en comparación con los observados en los sistemas bipartitos (**Figura 2, Tablas 4 y 5**). En contraste, *B. subtilis* disminuyó la actividad quitinolítica en los sistemas *Trichoderma* IMI206040 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides*, *Trichoderma* T1 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides*, y *Trichoderma* T3 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides*, en un 51%, 78% y 57%, respectivamente, en comparación con los observados en los sistemas tripartitos realizados en medio PDA. Por otro lado, *B. subtilis* aumentó la actividad quitinolítica en los sistemas *Trichoderma* JS3 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides* y *Trichoderma* T2 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides*, en un 492% y 68%, respectivamente, en comparación con los mismos sistemas realizados en medio PDA (**Figura 2 y Tabla 5**). Estos datos refuerzan la posibilidad de diafonía entre *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* durante el biocontrol de *C. gloeosporioides*, modulando las actividades celulolíticas y quitinolíticas.

La actividad de las glucanasas y quitinasas se induce al menos parcialmente en las cepas de *Trichoderma* antes del contacto directo con el huésped. Sin embargo, los resultados descritos anteriormente sugieren que estos están modulados diferencialmente por el contenido de nutrientes de los medios y por las interacciones con otros microorganismos. Para confirmar la hipótesis de que la comunicación cruzada ocurre entre *Trichoderma* sp.

y *B. subtilis* sobre la modulación de la actividad lítica, se evaluó la actividad de las enzimas endo- β -1,3-glucanasa, endo- β -1,4-glucanasa y β -N-acetilhexosaminidasa durante el biocontrol de *C. gloeosporioides* cuantitativamente, en sistemas bipartitos y tripartitos en caldo PD. Se determinó la actividad de *B. subtilis*, *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3. Por otro lado, *Trichoderma* JS3 no mostró actividad celulolítica o quitinolítica en medio sólido razón por la cual no se incluyó en este ensayo.

Tabla 5. Actividad quitinolítica de *Trichoderma* sp. y *C. gloeosporioides* en los ensayos tripartitos durante el proceso de biocontrol sobre *C. gloeosporioides*

Tripartito Ensayo	Actividad quitinolítica (área de hidrólisis (cm ²))					
	<i>Trichoderma</i> sp.		<i>B. subtilis</i>		<i>C. gloeosporioides</i>	
	Medio					
	PDA	Lb	PDA	Lb	PDA	Lb
<i>Trichoderma</i> IMI206040 vs. <i>B. subtilis</i> vs. <i>C. gloeosporioides</i>	45.95 ± 2.81 a	3.92 ± 4.49 b	6.95 ± 1.80 a	3.40 ± 5.90	5.08 ± 0.15 ab	0.73 ± 1.27
<i>Trichoderma</i> JS3 vs. <i>B. subtilis</i> vs. <i>C. gloeosporioides</i>	0.28 ± 0.11 b	0.00 ± 0.00 b	0.74 ± 0.35 b	4.38 ± 7.58	0.00 ± 0.00 b	4.14 ± 7.17
<i>Trichoderma</i> T1 vs. <i>B. subtilis</i> vs. <i>C. gloeosporioides</i>	39.71 ± 1.32 a	17.39 ± 1.79 a	5.99 ± 0.17 a	1.30 ± 0.94	6.38 ± 2.39 ab	1.05 ± 0.72
<i>Trichoderma</i> T2 vs. <i>B. subtilis</i> vs. <i>C. gloeosporioides</i>	28.43 ± 10.93 a	19.63 ± 5.12 a	5.26 ± 0.34 a	8.85 ± 1.48	8.12 ± 3.17 a	1.00 ± 1.21
<i>Trichoderma</i> T3 vs. <i>B. subtilis</i> vs. <i>C. gloeosporioides</i>	41.57 ± 1.19 a	16.27 ± 1.63 a	6.04 ± 1.99 a	2.62 ± 2.29	5.77 ± 1.14 ab	0.60 ± 0.21

Nota: Los datos son la media ± DE, n=3. Diferentes letras representan diferentes medias estadísticamente significativas en el mismo medio de cultivo (datos verticales) (nivel de significancia de 0.001 en la prueba *post-hoc* de Tukey). Los datos sin grupos estadísticos no mostraron ninguna diferencia estadística entre ellos.

La actividad basal de la endo- β -1,3-glucanasa de *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3 fue dependiente del tiempo, mostrando la mayor actividad a las 72 h (3.01, 2.36 y 2.37 UI, respectivamente), mientras que la mayor actividad para *B. subtilis* se observó a las 48 h (0.62 UI) (Figura 3A).

Adicionalmente, en el sistema bipartito (en presencia de micelio desactivado de *C. gloeosporioides*), todas las cepas antagonistas mostraron un aumento de la actividad de la endo- β -1,3-glucanasa a las 24 h después de la incubación, alcanzando su máximo a las 48 h después de la inoculación. *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3 alcanzaron 3.2, 2.8 y 2.18 UI, respectivamente, mientras que *B. subtilis* alcanzó 1.72 UI en estas condiciones experimentales. Sin embargo, individualmente y con el mismo tiempo de incubación, exhibieron 2.11, 1.74 y 0.89 UI para *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3, respectivamente, mientras que *B. subtilis* exhibió una actividad de 0.61 UI (Figura 3B).

Para el sistema tripartito (*Trichoderma* sp., *B. subtilis*, y micelio desactivado de *C. gloeosporioides*), la actividad endo- β -1,3-glucanasa fue dependiente del tiempo cuando se utilizó *Trichoderma* T1, mostrando la mayor actividad a las 72 h (1.6 UI), mientras que *Trichoderma* T2 mostró actividad estable en todos los puntos de tiempo evaluados (aproximadamente 1.35 UI). Como se puede observar, en el sistema tripartito para *Trichoderma* T1 y *B. subtilis* y, *Trichoderma* T2 y *B. subtilis* en presencia de micelio desactivado de *C. gloeosporioides* la actividad de la endo- β -1,3-glucanasa disminuyó significativamente, aunque para *Trichoderma* T3 y *B. subtilis*, dicha actividad se mantuvo constante en comparación con la actividad observada en el sistema bipartito para *Trichoderma* T3, y se observó un aumento para *B. subtilis*.

La combinación con *Trichoderma* T3 exhibió una actividad de 2.9 UI a 48 h (el valor más alto en cualquier condición dada para esta cepa), aunque esto disminuyó a las 72 h después de la inoculación (1.09 UI) (Figura 3C).

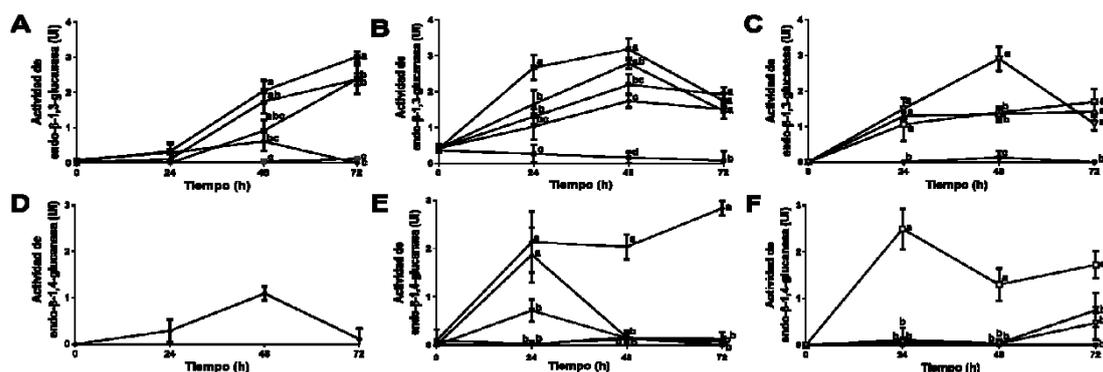


Figura 3. Efecto del micelio desactivado de *C. gloeosporioides* sobre la actividad de la endo- β -1,3- y endo- β -1,4-glucanasa de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* en caldo PD. A-C) Actividad de la endo- β -1,3-glucanasa. D-F) actividad de la endo- β -1,4-glucanasa. A, D) Actividad basal. B, E) Sistema bipartito. C, F) Sistema tripartito. () Control, () *Trichoderma* T1, () *Trichoderma* T2, () *Trichoderma* T3, () *B. subtilis*, () *Trichoderma* T1 más *B. subtilis*, () *Trichoderma* T2 más *B. subtilis*, () *Trichoderma* T3 más *B. subtilis*. Los datos son medias \pm DE, n=3. Diferentes letras representan diferentes medias estadísticamente significativas entre los diferentes sistemas evaluados para el mismo tiempo de incubación (nivel de significancia de 0.01 en la prueba *post-hoc* de Tukey).

En contraste, en el sistema individual, solo *B. subtilis* mostró actividad de la endo- β -1,4-glucanasa, alcanzando un valor máximo a las 48 h después de la incubación (1.06 UI) (Figura 3D). En el sistema bipartito, el micelio desactivado de *C. gloeosporioides* estimuló la actividad de la endo- β -1,4-glucanasa de *B. subtilis*, así como de *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3 a las 24 h después del inicio de la incubación, aumentando en 2.11, 1.70 y 0.72 UI, respectivamente, mientras que *Trichoderma* T1 no mostró actividad en la

misma condición. Además, la actividad de *B. subtilis* se mantuvo estable a las 48 h (2.00 UI), aumentó a las 72 h y alcanzó las 2.85 UI. Bajo esta condición, *Trichoderma* T2 disminuyó su actividad después de 24 h de incubación hasta 0.08 UI, mientras que *Trichoderma* T3 no mostró actividad a las 72 h después de la incubación (Figura 3E). Curiosamente, en el sistema tripartito, solo la combinación de *Trichoderma* T1 y *B. subtilis* en presencia de micelio desactivado de *C. gloeosporioides* mostró actividad de la endo- β -1,4-glucanasa significativamente a las 24 h después de la incubación (2.49 UI) y dicha actividad se redujo a las 48 h y 72 h (1.19 y 1.81 UI, respectivamente). Además, los sistemas de *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3 mostraron actividad hasta 72 h después de la incubación (0.70 y 0.46 UI, respectivamente) (Figura 3F).

Además, con respecto a la actividad de la β -N-acetilhexosaminidasa en el sistema individual, *B. subtilis* y *Trichoderma* T1 exhibieron sus valores máximos 24 h después de la incubación (1.01 y 1.32 UI, respectivamente), mientras que *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3 no mostraron esta actividad (Figura 4A). En el sistema bipartito, el micelio desactivado de *C. gloeosporioides* indujo un aumento en la actividad de *B. subtilis*, *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3, alcanzaron 1.40, 1.31 y 0.86 UI, respectivamente. Curiosamente, *Trichoderma* T1 (que mostró mayor actividad individualmente), en presencia de micelio desactivado de *C. gloeosporioides*, mostró nula actividad bajo estas condiciones experimentales (Figura 4B). Para el sistema tripartito, la combinación de *Trichoderma* T3 alcanzó 1.77 UI a las 48 h después de la incubación, mientras que la combinación de *Trichoderma* T1 o *Trichoderma* T2 aumentó la actividad hasta 1.20 y 0.25 UI 24 h después de la incubación, respectivamente (Figura 4C).

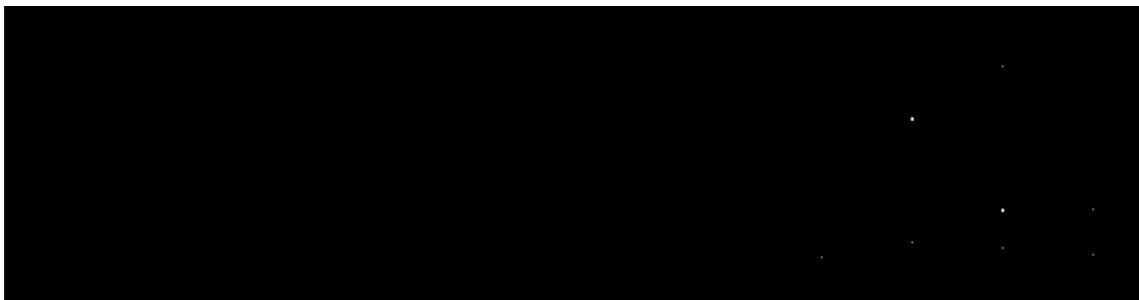


Figura 4. Efecto del micelio desactivado de *C. gloeosporioides* sobre la actividad de la β -N-acetilhexosaminidasa de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* en caldo de PD. A) Actividad basal. B) Sistema bipartito. C) Sistema tripartito. () Control, () *Trichoderma* T1, () *Trichoderma* T2, () *Trichoderma* T3, () *B. subtilis*, () *Trichoderma* T1 más *B. subtilis*, () *Trichoderma* T2 más *B. subtilis*, () *Trichoderma* T3 más *B. subtilis*. Los datos son medias \pm DE, n=3. Diferentes letras representan diferentes medias estadísticamente significativas entre los diferentes sistemas evaluados para el mismo tiempo de incubación (nivel de significancia de 0.01 en la prueba *post-hoc* de Tukey).

Todos los resultados descritos anteriormente indican que la actividad lítica (endo- β -1,3-glucanasa, endo- β -1,4-glucanasa y β -N-acetilhexosaminidasa) de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* se modula diferencialmente en presencia de micelio desactivado de *C. gloeosporioides*, probablemente a través de la comunicación cruzada entre *Trichoderma* sp. y *B. subtilis*.

Discusión

El uso de BCA contra microorganismos fitopatógenos ha aumentado en los últimos años. Aunque *Trichoderma* es un BCA exitoso, es necesario desarrollar estrategias alternativas para mejorar o complementar los métodos existentes. En este sentido, una opción explorada en los últimos años es el uso de una combinación de dos BCA para mejorar la eficiencia del control de los agentes etiológicos de las enfermedades de las plantas. La combinación de dos o más BCA puede modular positivamente la actividad de biocontrol entre sí (Jambhulkar et al. 2018). Sin embargo, debe determinarse la compatibilidad entre los BCA. Las bacterias de la rizosfera son excelentes BCA potenciales y podrían ser compatibles con otros BCA como *Trichoderma* sp. Las especies de *Bacillus* son bacterias rizosféricas, y muchas de ellas son BCA sobresalientes debido a sus múltiples mecanismos de acción, como la producción de enzimas que degradan la pared celular y de antibióticos (Shafi et al. 2017). Debido a sus características de biocontrol, *Bacillus* sp. son un candidato ideal para formar equipo con *Trichoderma* sp.

En este estudio, la actividad de biocontrol de cinco cepas de *Trichoderma* sp. y una de *B. subtilis* se evaluó durante el biocontrol de *C. gloeosporioides*. Los resultados del sistema bipartito mostraron que las cepas utilizadas en este estudio fueron capaces de inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides* (restringiendo el efecto de la competencia por espacio y nutrientes). En el medio PDA, se observaron porcentajes de inhibición de 70.4%, 55.5%, 32.65%, 62.24%, 67.24% y 57.14% para *Trichoderma* IMI206040, *Trichoderma* JS3, *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2, *Trichoderma* T3 y *B. subtilis*, respectivamente (**Tabla 1 y Figura suplementaria 2**). Además, en medio LB, la actividad de biocontrol de las cepas fue diferente (efecto probablemente asociado con la fuente de nutrientes) (Ghazanfar et al. 2018). Se observó un aumento de la actividad inhibitoria para *B. subtilis*, *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3 en un 24%, 167%, 40% y 17%, respectivamente, en comparación con los observados en el medio PDA en los sistemas bipartitos correspondientes. Para *Trichoderma* JS3 y *Trichoderma* IMI206040, se observó una

disminución de la actividad de biocontrol contra *C. gloeosporioides* en medio LB en un 55% y 19%, respectivamente, en comparación con los observados en medio PDA (**Tabla 1**). Los valores de inhibición observados en este estudio fueron más altos que los reportados en otros estudios. Živković et al. (2010) informaron que *Trichoderma harzianum* inhibió el crecimiento de *C. gloeosporioides* en un 38%-58%, mientras que *B. subtilis* exhibió una inhibición del 28%-48% en el medio PDA. Además, Ashwini y Srividya (2014) informaron que *B. subtilis* inhibió el crecimiento de *C. gloeosporioides* en un 55% en medio PDA. Estos resultados indican que las diferencias observadas en la actividad de biocontrol son específicas de la cepa y dependen de fuentes nutricionales (Ghazanfar et al. 2018; Mustafa et al. 2009).

En el presente estudio, los sistemas de confrontación se realizaron en medios PDA y LB, y se observó actividad de biocontrol diferencial en ambos medios, y los bioensayos de biocontrol realizados en medio LB contra *C. gloeosporioides* fueron más eficientes que el alcanzado en el medio PDA en los sistemas bipartitos. Anwar e Iqbal (2017) evaluaron el efecto del uso de medio de caldo nutriente (GNB), caldo de extracto de levadura (YEB) y caldo de dextrosa de papa (PDB) en la producción de moléculas de antibióticos. Determinaron que la composición de las fuentes nutricionales afecta la producción de compuestos bioactivos en *Trichoderma harzianum*. El medio de crecimiento más efectivo para inducir la producción de metabolitos bioactivos fue el GNB, con una composición de 10 g de glucosa, 5 g de peptona y 3 g de extracto de levadura, lo que sugiere que la fuente de nitrógeno favorece la actividad de biocontrol de *T. harzianum* a través de la producción de moléculas con propiedades antibióticas como los compuestos orgánicos volátiles (COV).

En el presente estudio, se observaron efectos similares a los reportados por Anwar e Iqbal (2017). En este sentido, el PDA es un medio de cultivo rico en carbohidratos como fuente de carbono (20 g de glucosa y 4 g de extracto de papa), mientras que el medio LB ofrece fuentes de carbono y nitrógeno (peptona y extracto de levadura), lo que podría favorecer la actividad de biocontrol de las cepas evaluadas en los sistemas bipartitos. Bruce et al. (2000) demostraron que la composición de aminoácidos del medio afecta la producción de COV fungicidas con propiedades antifúngicas en *Trichoderma aureoviride*. Por lo tanto, en este estudio, el mecanismo de antibiosis mediado por COV podría contribuir al aumento de la eficacia de biocontrol observado en los sistemas bipartitos realizados en

medio LB. Además, la disminución de la eficiencia de biocontrol de *Trichoderma* IMI206040 y *Trichoderma* JS3 observada en medio LB sugiere que estas cepas podrían emplear otro mecanismo de biocontrol.

Para determinar si las combinaciones de *B. subtilis* y *Trichoderma* sp. producen un efecto aditivo o sinérgico para inhibir el crecimiento de *C. gloeosporioides*, se estableció un sistema tripartito. La combinación de *Trichoderma* IMI206040, *Trichoderma* JS3 o *Trichoderma* T3 con *B. subtilis* generó porcentajes de inhibición inferiores a los observados en el sistema bipartito en medio PDA. El mismo efecto se observó en LB medio para todas las cepas (**Tabla 1 y Figura Suplementaria 2**). Es razonable especular que los metabolitos producidos por *B. subtilis* podría afectar el crecimiento de cepas de *Trichoderma*, ya que se ha demostrado que los compuestos producidos por esta bacteria, como la iturina A, la surfactina y la fengicina, inhiben otros organismos fúngicos como *C. gloeosporioides* (Kim et al. 2010), afectando su proceso de biocontrol a través de la modulación del metabolismo secundario en respuesta a dichos compuestos, incluida la producción de enzimas líticas (Udhayakumar et al. 2019). En este sentido, los enfrentamientos entre los BCA *Trichoderma* sp. contra *B. subtilis*, muestran que *B. subtilis* inhibe el crecimiento de todas las cepas de *Trichoderma* en medio PDA generando porcentajes de inhibición de 31.96%, 16.40%, 16.23%, y 14.87% en *Trichoderma* JS3, *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3, respectivamente (**Figuras suplementarias 3 y 4**). El mismo efecto se observó en el medio LB, sin embargo, el efecto fue notable hasta las 120 h, debido a la tasa de crecimiento de los microorganismos en este medio de cultivo, donde *B. subtilis* generó porcentajes de inhibición de 42.30%, 20.45%, 14.95% y 22.24% en *Trichoderma* JS3, *Trichoderma* T1, *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3, respectivamente. El efecto de inhibición podría deberse al mecanismo de antibiosis ejercido por *B. subtilis* sobre las especies de *Trichoderma*, que limita el crecimiento de las cepas de *Trichoderma* en ambos medios (**Figura suplementaria 4**). Sin embargo, en los sistemas tripartitos realizados en medio PDA el porcentaje de inhibición de *C. gloeosporioides* aumentó en un 63% y 22%, en *Trichoderma* T1 y *B. subtilis*, así como *Trichoderma* T2 y *B. subtilis* respectivamente, en comparación con los alcanzados por las cepas de *Trichoderma* (sistemas bipartitos). Aunque la eficacia inhibitoria contra *C. gloeosporioides* disminuyó en el sistema *Trichoderma* T1 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides* en un 7%, mientras que en *Trichoderma* T2 vs. *B. subtilis* vs. *C.*

gloeosporioides, la actividad de biocontrol contra *C. gloeosporioides* aumentó en un 33% en comparación con la de *B. subtilis* (sistema bipartito). Adicionalmente, cuando se analizó el efecto inhibitorio contra *C. gloeosporioides* en los sistemas tripartitos realizados sobre PDA y LB, se observaron dos tendencias en los sistemas realizados en medio LB en comparación con los observados en medio PDA; se evaluó la disminución y estimulación de la actividad de biocontrol de cada sistema. En el primer grupo, la eficiencia inhibitoria de *Trichoderma* IMI206040 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides*, *Trichoderma* JS3 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides*, y *Trichoderma* T2 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides* disminuyó en un 69%, 27% y 6%, respectivamente. En contraste, los sistemas *Trichoderma* T1 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides* y *Trichoderma* T3 vs. *B. subtilis* vs. *C. gloeosporioides* aumentaron en un 25% y 18%, respectivamente. Este resultado sugiere que existe una probable interacción entre las cepas de *B. subtilis* y *Trichoderma* que modulan la eficiencia del biocontrol en un sistema tripartito en función tanto del contenido nutricional (Ghazanfar et al. 2018; Mustafa et al. 2009) e interacciones con otros microorganismos (Jambhulkar et al. 2018).

La inhibición diferencial del crecimiento de *C. gloeosporioides* observado en sistemas bipartitos y tripartitos realizados en ambos medios sugiere que existen mecanismos de biocontrol modulador entre los BCA evaluados. Las interacciones microorganismo-microorganismo son la estrategia clave para colonizar diferentes ambientes. Estas interacciones entre microorganismos son cruciales para muchos procesos, incluida la detección de los miembros de una comunidad para competir o cooperar dentro de nichos ambientales específicos (Cosetta y Wolfe, 2019). Por otro lado, las interacciones fúngico-bacterianas pueden conducir a la producción de metabolitos secundarios, modulando la comunicación entre las especies, aunque las interacciones físicas contribuyen a este fenómeno (Braga et al. 2016; Frey-Klett et al. 2011; Cosetta y Wolfe, 2019). Como resultado, las actividades celulolíticas y quitilíticas se evaluaron cualitativamente en sistemas bipartitos y tripartitos en medios PDA y LB porque el contacto entre BCA y fitopatógenos desencadena la producción de enzimas degradadoras de la pared celular por BCAs.

En el sistema bipartito realizado tanto en medios PDA como LB, todas las cepas de *Trichoderma* mostraron actividad celulolítica, excepto *Trichoderma* JS3. Sin embargo, la actividad celulolítica de *Trichoderma* en LB medio fue menor que la observada en medio

PDA en sistemas bipartitos y tripartitos, excluyendo *Trichoderma* T2, para la cual la actividad celulolítica se incrementó en un 37% en medio LB. Además, *B. subtilis* mostró la mayor actividad celulolítica en medio LB en sistemas tripartitos en presencia de *C. gloeosporioides* y *Trichoderma* T1 o *Trichoderma* T3. Además, esta actividad disminuyó en presencia de *Trichoderma* IMI206040, *Trichoderma* JS3 o *Trichoderma* T2 (**Figura 1, Tablas 2 y 3**). También, se observó la misma tendencia para la actividad quitinolítica tanto en sistemas bipartitos como tripartitos. Los valores detectados en el medio PDA fueron superiores a los observados en el medio LB tanto en el sistema bipartito como en el tripartito (**Figura 2, Tablas 4 y 5**). Se ha demostrado que las fuentes de nitrógeno y carbono, así como las interacciones entre microorganismos antagonistas y fitopatógenos, desempeñan un papel importante en la regulación de la actividad enzimática como se describió anteriormente (Ting y Chai 2015; El-Katatny et al. 2000; Udhayakumar et al. 2019; Karimi et al. 2017).

Como se observó anteriormente, las actividades enzimáticas hidrolíticas de *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* se modularon diferencialmente en medio LB (efecto asociado con la composición del medio de cultivo) (Baukaew et al. 2016). Las enzimas degradadoras de la pared celular producidas por *Trichoderma* durante el proceso de biocontrol incluyen endo- β -(1,3)-, endo- β -(1,4)- y endo- β -(1,6)-glucanasas, quitinasas y proteasas (Zeilinger y Omann 2007; Karimi et al. 2017) y *B. subtilis* produce quitinasas, glucanasas y celulasas (Ashwini y Srividya 2014; Yoo 2009; Živković 2010). Sin embargo, la producción y la actividad enzimática están moduladas por la composición del medio y el tipo de cepa (Baukaew et al. 2016; Deka et al. 2011). Para confirmar la modulación de la actividad hidrolítica observada en medios sólidos, se evaluaron cuantitativamente las actividades de la endo- β -1,3-glucanasa, endo- β -1,4-glucanasa y β -N-acetilhexosaminidasa en caldo de PD. Individualmente, se observó actividad máxima de endo- β -1,3-glucanasa para las cepas de *Trichoderma* después de 72 h de incubación, mientras que para *B. subtilis*, la actividad máxima se observó a las 48 h (**Figura 3A**). Además, solo *B. subtilis* exhibió actividad de la endo- β -1,4-glucanasa, mostrando actividad máxima después de la incubación durante 48 h (**Figura 3D**). Para la actividad de la β -N-acetilhexosaminidasa, *Trichoderma* T1 y *B. subtilis* alcanzaron valores máximos de actividad después de 24 h de incubación, mientras que *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3 no mostraron actividad en un momento dado (**Figura 4A**). La actividad enzimática única (basal) de diferentes cepas

podría atribuirse al reciclaje de la pared celular durante el envejecimiento y la autólisis, así como a la remodelación de la pared celular durante el desarrollo vegetativo (Gruber y Seidl-Seiboth 2012, Kappel et al. 2020).

Cuando se agregó micelio desactivado de *C. gloeosporioides* al medio de cultivo, se estimuló la actividad de la endo- β -1,3-glucanasa para todas las cepas evaluadas después de 24 h de incubación, alcanzando su actividad máxima a las 48 h de incubación (**Figura 3B**). Además, en estas condiciones, la actividad de la endo- β -1,4-glucanasa en *B. subtilis* se estimuló alcanzando su actividad máxima a las 72 h, mientras que *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3 mostraron la máxima actividad a las 24 h después de la incubación (**Figura 3E**). Además, en estas condiciones, la actividad de la β -N-acetilhexosaminidasa fue detectable para *Trichoderma* T2 y *Trichoderma* T3, que alcanzaron su actividad máxima después de 24 h, y en el caso de *Trichoderma* T2, la actividad se mantuvo a las 48 h de incubación, mientras que la actividad de *Trichoderma* T1 disminuyó en estas condiciones. Además, la actividad de *B. subtilis* se mantuvo estable después de 48 y 72 h de incubación (**Figura 4B**). Estos resultados indican que el micelio desactivado de *C. gloeosporioides* modula positivamente las actividades de la endo- β -1,3-glucanasa, endo- β -1,4-glucanasa y β -N-acetilhexosaminidasa de todas las cepas analizadas, excepto la β -N-acetilhexosaminidasa de *Trichoderma* T1, en la que la actividad no fue detectable en estas condiciones. Resultados similares fueron reportados por Yang et al. (2009), quienes demostraron que la presencia de micelio desactivado de *Botrytis cinerea* actúa como un inductor de la actividad enzimática, aumentando la tasa de liberación de enzimas líticas extracelulares en *T. harzianum* ETS 323. Este efecto se observó para las actividades quitinolíticas, endo- β -1,3-glucanasa y proteasa, que alcanzaron sus niveles más altos en presencia de *B. cinerea* a las 72 h después de la inoculación para quitinasas y endo- β -1,3-glucanasas, mientras que la mayor actividad proteasa se observó después de 48 h de crecimiento. Además, Zhang et al. (2014) demostraron que las actividades de la endo- β -1,3-glucanasa y quitinasa de *T. harzianum* T-E5 aumentó en presencia de micelio desactivado de *F. oxysporum*, exhibiendo actividad máxima a las 96 h después de la inoculación, y el mismo efecto se observó en la interacción entre *Trichoderma cerinum* y *F. oxysporum* (Khare et al. 2018). Además, Ashwini y Srividya (2014) evaluaron las actividades quitinolíticas, endo- β -1,3- y endo- β -1,4-glucanasa de *B. subtilis* en presencia de micelio desactivado de *C. gloeosporioides*. Se observó una actividad máxima de

quitinasa de 2.84 U/mL después de 24 h de incubación, mientras que las actividades de la endo- β -1,3- y endo- β -1,4-glucanasa alcanzaron 3.2 y 13.21 U/mL a las 48 y 72 h después de la inoculación, respectivamente.

Además, los resultados del presente trabajo indican que la interacción entre microorganismos modula su mecanismo de biocontrol, por ejemplo, la actividad hidrolítica. En este sentido, en el sistema tripartito, se observó la mayor actividad de la endo- β -1,3-glucanasa para la combinación con *Trichoderma* T3 y *B. subtilis* a las 48 h después de la incubación, que fue mayor que las actividades observadas en los sistemas individual y bipartito para estas cepas. Curiosamente, la actividad de la combinación de *Trichoderma* T1 o *Trichoderma* T2 y *B. subtilis* bajo esta condición disminuyó significativamente en comparación con la observada en los sistemas individual y bipartito (**Figura 3C**). En particular, la combinación de *Trichoderma* T1 y *B. subtilis* mostró la mayor actividad de endo- β -1,4-glucanasa bajo esta condición, y es razonable suponer que esta actividad corresponde a la observada en *B. subtilis* en presencia de micelio desactivado de *C. gloeosporioides*; sin embargo, esta actividad fue casi nula en el sistema formado por la combinación de *Trichoderma* T2 o *Trichoderma* T3 y *B. subtilis* (**Figura 3F**). Además, la combinación de *Trichoderma* T3 y *B. subtilis* mostró la mayor actividad de β -N-acetilhexosaminidasa en el sistema tripartito, que fue mayor que la actividad observada en todos los demás sistemas probados. Además, la combinación de *Trichoderma* T1 y *B. subtilis* exhibió una mayor actividad, mientras que la combinación de *Trichoderma* T2 y *B. subtilis* exhibió una actividad significativamente disminuida en estas condiciones (**Figura 4C**). Estos resultados confirman la modulación diferencial de la actividad hidrolítica (endo- β -1,3-glucanasa, endo- β -1,4-glucanasa y β -N-acetilhexosaminidasa) entre *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* en presencia de micelio desactivado de *C. gloeosporioides*. En este sentido, Ting y Chai (2015) demostraron interacciones entre *T. harzianum* y patógenos (*F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 y *Ganoderma boninense*), los agentes no patógenos (*T. viridescens*, *Serratia marcescens* y *Streptomyces griseus*) disminuyeron la actividad de la endo- β -1,3-glucanasa, lo que es consistente con los resultados del presente estudio. Por otro lado, bacterias como *B. subtilis* y *Pseudomonas fluorescens* tienen la capacidad de inhibir la actividad enzimática de celulasas de hongos como *C. gloeosporioides* (Udhayakumar et al. 2019), lo que podría haber sucedido en la presente obra.

El contenido nutricional del medio de cultivo juega un papel clave en la compatibilidad entre *Trichoderma* sp. y *B. subtilis*, así como su eficacia en el biocontrol de *C. gloeosporioides* en la modulación de la actividad hidrolítica de cepas antagonistas. Sin embargo, no se descarta que los mecanismos de biocontrol restantes puedan ser modulados de manera similar. Los resultados del presente estudio sugieren que la combinación de las cepas de *Trichoderma* T2 y *B. subtilis* mostró potencialidad antagonista de manera independiente al contenido nutricional, que podría explorarse para el tratamiento de la enfermedad antracnosis causada por *C. gloeosporioides*.

Agradecimientos

Las cepas utilizadas fueron amablemente donadas: *Trichoderma* T1 y *Trichoderma* T3 de Juan Boyzo Marín, *Trichoderma* T2 de M.C. Alberto Flores García del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas (IIQB-UMSNH), *Trichoderma* IMI206040 de Dra. Ana Laura Guillén Nepita de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez" (UMSNH), y *Trichoderma* JS3 de M.C. Luis María Suárez Rodríguez del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas (IIQB-UMSNH), y el hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides* de Dra. Silvia Patricia Hernández Pavía del Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF-UMSNH). Este trabajo fue apoyado por el Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP). Beca PRODEP. DSA/103.5/15/10775 No. 2014. Bautista-Ortega y Hernández-Hernández fueron beneficiarios de la beca PRODEP No. DSA/103.5/15/10775.

REFERENCIAS

- Admasu, W., Sahile, S., & Kibret, M. (2014). Assessment of potential antagonists for anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) disease of mango (*Mangifera indica* L.) in North Western Ethiopia (Pawe). Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(18), 2176-2186. doi: <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.870110>
- Ajay Kumar, G. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides*: biology, pathogenicity and management in India. J Plant Physiol Pathol 2, 2, 2. doi: <https://doi.org/10.4172/2329-955X.1000125>
- Anwar, J. and Z. Iqbal. 2017. Effect of growth conditions on antibacterial activity of *Trichoderma harzianum* against selected pathogenic bacteria. Sarhad Journal of

- Agriculture, 33(4): 501-510. doi: <http://dx.doi.org/10.17582/journal.sja/2017/33.4.501.510>
- Ashwini, N., & Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. 3 Biotech, 4(2), 127-136. doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-013-0134-4>
- Baroncelli, R., Talhinhos, P., Pensec, F., Sukno, S. A., Le Floch, G., & Thon, M. R. (2017). The *Colletotrichum acutatum* species complex as a model system to study evolution and host specialization in plant pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 8(2001). doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02001>
- Baukaew, S., Petlamul, W., Suyotha, W., & Prasertsan, P. (2016). Simultaneous fermentative chitinase and beta-1,3 glucanase production from *Streptomyces philanthi* RM-1-1-38 and their antifungal activity against rice sheath blight disease. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, 97(4), 271-284. doi: <https://doi.org/10.5114/bta.2016.64544>
- Blackburn, D., Shapiro-Ilan, D. I., & Adams, B. J. (2016). Biological control and nutrition: Food for thought. *Biological Control*, 97, 131-138. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.03.007>
- Bourne, R. (2010). ImageJ. In *Fundamentals of digital imaging in medicine* (pp. 185-188). Springer, London. doi: https://doi.org/10.1007/978-1-84882-087-6_9
- Braga, R. M., Dourado, M. N., & Araújo, W. L. (2016). Microbial interactions: ecology in a molecular perspective. *Brazilian journal of microbiology*, 47, 86-98. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.005>
- Bruce, B. A., Wheatley, R. E., Humphris, S. N., Hackett, C. A., and Florence, M. E. J. (2000). Production of volatile organic compounds by *Trichoderma* in media containing different amino acids and their effect on selected wood decay fungi. *De Gruyter* 54, 481-486. doi: <https://doi.org/10.1515/HF.2000.081>
- Cosetta, C. M., & Wolfe, B. E. (2019). Causes and consequences of biotic interactions within microbiomes. *Current opinion in microbiology*, 50, 35-41. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.09.004>
- da Silva Aires, R., Steindorff, A. S., Ramada, M. H. S., de Siqueira, S. J. L., & Ulhoa, C. J. (2012). Biochemical characterization of a 27 kDa 1, 3-β-D-glucanase from

- Trichoderma asperellum* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani*. Carbohydrate polymers, 87(2), 1219-1223. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.09.001>
- De Silva, D. D., Crous, P. W., Ades, P. K., Hyde, K. D., & Taylor, P. W. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. Fungal Biology Reviews, 31(3), 155-168. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2017.05.001>
- Deka, D., Bhargavi, P., Sharma, A., Goyal, D., Jawed, M., & Goyal, A. (2011). Enhancement of cellulase activity from a new strain of *Bacillus subtilis* by medium optimization and analysis with various cellulosic substrates. Enzyme research, 2011, 1-8. doi: <https://doi.org/10.4061/2011/151656>
- Djami-Tchatchou, A. T., Allie, F., & Straker, C. J. (2013). Expression of defence-related genes in avocado fruit (cv. Fuerte) infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. South African journal of botany, 86, 92-100. doi: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.02.166>
- El-Katatny, M. H., Somitsch, W., Robra, K. H., El-Katatny, M. S., & Gübitz, G. M. (2000). Production of chitinase and β -1, 3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. Food Technology and Biotechnology, 38(3), 173-180. Available from <https://www.ftb.com.hr/archives/89-table-of-content/1064-table-of-contents-july-september-2000>
- Emanuel, R.V., César Arturo, P.U., Lourdes Iveth, M.R. Homero R de la C., and Mauricio Nahuam C.A. (2020) In vitro growth of *Colletotrichum gloeosporioides* is affected by butyl acetate, a compound produced during the co-culture of *Trichoderma* sp. and *Bacillus subtilis*. 3 Biotech 10, 329. doi: <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02324-z>
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M., & Sarniguet, A. (2011). Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 75(4), 583-609. doi: <https://doi.org/10.1128/MMBR.00020-11>
- Gajbhiye, A., Rai, A. R., Meshram, S. U., & Dongre, A. B. (2010). Isolation, evaluation and characterization of *Bacillus subtilis* from cotton rhizospheric soil with biocontrol activity against *Fusarium oxysporum*. World Journal of Microbiology and

Biotechnology, 26(7), 1187-1194. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0287-9>

Ghazanfar, M. U., Raza, M., Raza, W., & Qamar, M. I. (2018). *Trichoderma* as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. Plant Protection, 2(3). Available from <https://esciencepress.net/journals/index.php/PP/article/view/3142/1571>

Gruber, S., & Seidl-Seiboth, V. (2012). Self-versus non-self: fungal cell wall degradation in *Trichoderma*. Microbiology, 158(1), 26-34. doi: <https://doi.org/10.1099/mic.0.052613-0>

Guzmán-Guzmán, P., Porrás-Troncoso, M. D., Olmedo-Monfil, V., & Herrera-Estrella, A. (2019). *Trichoderma* species: versatile plant symbionts. Phytopathology, 109(1), 6-16. doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0218-RVW>

Hussain, A., Raziq, F., & Khan, H. (2008). In vitro integrated control of *Colletotrichum gloeosporioides* with biological and chemical agents. Sarhad J. Agric., 24(1), 79. Available from http://www.aup.edu.pk/sj_pdf/In%20vitro%20integrated%20control%20of%20colletotrichum=128-2007.pdf

Jambhulkar, P. P., Sharma, P., Manokaran, R., Lakshman, D. K., Rokadia, P., & Jambhulkar, N. (2018). Assessing synergism of combined applications of *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas fluorescens* to control blast and bacterial leaf blight of rice. European journal of plant pathology, 152(3), 747-757. doi: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-1519-3>

Javaheri-Kermani, M., & Asoodeh, A. (2019). A novel beta-1,4 glucanase produced by symbiotic *Bacillus* sp. CF96 isolated from termite (*Anacanthotermes*). International journal of biological macromolecules, 131, 752-759. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.124>

Joshi, R., & McSpadden Gardener, B. B. (2006). Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. Phytopathology, 96(2), 145-154. doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-0145>

Kamle, M., & Kumar, P. (2016). *Colletotrichum gloeosporioides*: Pathogen of anthracnose disease in mango (*Mangifera indica* L.). In Current Trends in Plant Disease

- Diagnostics and Management Practices (pp. 207-219). Springer, Cham. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-319-27312-9_9
- Kappel, L., Münsterkötter, M., Sipos, G., Escobar Rodriguez, C., & Gruber, S. (2020). Chitin and chitosan remodeling defines vegetative development and *Trichoderma* biocontrol. *PLoS Pathogens*, 16(2), e1008320. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008320>
- Karimi, K., Ahari, A. B., Arzanlou, M., Amini, J., & Pertot, I. (2017). Comparison of indigenous *Trichoderma* spp. strains to a foreign commercial strain in terms of biocontrol efficacy against *Colletotrichum nymphaeae* and related biological features. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124(5), 453-466. doi: <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0088-6>
- Kefialew, Y., & Ayalew, A. (2008). Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biology and Technology*, 50(1), 8-11. doi: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.007>
- Khare, E., Kumar, S., & Kim, K. (2018). Role of peptaibols and lytic enzymes of *Trichoderma cerinum* Gur1 in biocontrol of *Fusarium oxysporum* and chickpea wilt. *Environmental Sustainability*, 1(1), 39-47. doi: <https://doi.org/10.1007/s42398-018-0022-2>.
- Kim, P. I., Ryu, J., Kim, Y. H., & Chi, Y. T. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J Microbiol Biotechnol*, 20(1), 138-145. doi: <https://doi.org/10.4014/jmb.0905.05007>
- Mestre, P., Arista, G., Piron, M. C., Rustenholz, C., Ritzenthaler, C., Merdinoglu, D., & Chich, J. F. (2017). Identification of a *Vitis vinifera* endo- β -1,3-glucanase with antimicrobial activity against *Plasmopara viticola*. *Molecular plant pathology*, 18(5), 708-719. doi: <https://doi.org/10.1111/mpp.12431>
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical chemistry*, 31(3), 426-428. doi: <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mustafa, A., Khan, M. A., Inam-ul-Haq, M., Pervez, M. A., & Umar, U. (2009). Usefulness of different culture media for in vitro evaluation of *Trichoderma* spp. against seed

- borne fungi of economic importance. Pakistan Journal of Phytopathology, 21(1), 83-88. Available from https://scholar.google.com/scholar?hl=es&as_sdt=0%2C5&q=Usefulness+of+different+culture+media+for+in+vitro+evaluation+of+Trichoderma+spp.+against+seed+borne+fungi+of+economic+importance&btnG=
- Roberts, W. K., & Selitrennikoff, C. P. (1988). Plant and bacterial chitinases differ in antifungal activity. Journal of General Microbiology, 134(1), 169-176. Available from <https://pdfs.semanticscholar.org/da0c/5234cd4e8b429c653503c75adb811d82bea6.pdf>
- Rodríguez-López, E. S., González-Prieto, J. M., & Mayek-Pérez, N. (2009). La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. Revista mexicana de fitopatología, 27(1), 53-63. Available from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092009000100007
- Sambrook J. & Russell D. W. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Available from <https://nla.gov.au/nla.cat-vn2284148>
- Sahin, S., Ozmen, İ., & Biyik, H. H. (2013). Purification and characterization of endo- β -1,4-glucanase from local isolate *Trichoderma ouoviride*. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 3(2), 129. doi: <https://doi.org/10.7763/IJBBB.2013.V3.180>
- Sazci, A., Erenler, K., & Radford, A. (1986). Detection of cellulolytic fungi by using Congo red as an indicator: a comparative study with the dinitrosalicylic acid reagent method. Journal of Applied Bacteriology, 61(6), 559-562. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1986.tb01729.x>
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 31(3), 446-459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2008). Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus*

- roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(9), 1669. doi: <https://doi.org/10.1007/s11274-008-9680-z>
- Than, P. P., Prihastuti, H., Phoulivong, S., Taylor, P. W., & Hyde, K. D. (2008). Chili anthracnose disease caused by *Colletotrichum* species. Journal of Zhejiang University Science B, 9(10), 764. doi: <https://doi.org/10.1631/jzus.B0860007>
- Tang, L., Mo, J., Guo, T., Huang, S., Li, Q., Ning, P., & Hsiang, T. (2019). Antifungal effects of dimethyl trisulfide against *Colletotrichum gloeosporioides* infection on mango. Journal of Phytopathology, 167(7-8), 445-450. doi: <https://doi.org/10.1111/jph.12816>
- Tapia, R. A., Ramírez, D. J., Salgado, S. M., Castañeda, V. Á., Maldonado, Z. F., & Lara, D. A. (2020). Spatial distribution of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) in avocado in the State of Mexico, Mexico. Revista Argentina de microbiología, 52(1), 72-81. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.07.004>
- Ting, A. S. Y., & Chai, J. Y. (2015). Chitinase and β -1,3-glucanase activities of *Trichoderma harzianum* in response towards pathogenic and non-pathogenic isolates: Early indications of compatibility in consortium. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 4(1), 109-113. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.10.003>
- Udhayakumar, R., Usharani, S., & Muthukumar, A. (2019). Effect of bacterial antagonists on the in vitro production of cellulolytic and pectinolytic enzymes by *Colletotrichum gloeosporioides*. Plant Archives, 19(1), 923-926. Available from [http://www.plantarchives.org/PDF%2019-1/923-926%20\(4605\).pdf](http://www.plantarchives.org/PDF%2019-1/923-926%20(4605).pdf)
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry, 40(1), 1-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>
- Welideniya, W. A., Rienzie, K. D. R. C., Wickramaarachchi, W. A. R. T., & Aruggoda, A. G. B. (2019). Characterization of fungal pathogens causing anthracnose in capsicum pepper (*Capsicum annuum* L.) and their seed borne nature. Ceylon Journal of Science, 48(3), 261-269. doi: <https://doi.org/10.4038/cjs.v48i3.7650>
- Yang, H. H., Yang, S. L., Peng, K. C., Lo, C. T., & Liu, S. Y. (2009). Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. Mycological research, 113(9), 924-932. doi: <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2009.04.004>

- Yoo, J. H., Lee, Y. J., Park, B. S., Lee, S. E., Kim, Y. K., Seo, J. S., ... & Joo, J. H. (2009). Isolation and bioactivity of *Bacillus* sp. YJH-051 against *Colletotrichum gloeosporioides*, the fungal pathogen for anthracnose disease on peppers. *Biological agriculture & horticulture*, 26(4), 399-409. doi: <https://doi.org/10.1080/01448765.2009.9755098>
- Zeilinger, S., & Omann, M. (2007). *Trichoderma* biocontrol: signal transduction pathways involved in host sensing and mycoparasitism. *Gene regulation and systems biology*, 1, GRSB-S397. doi: <https://doi.org/10.4137/GRSB.S397>
- Zhang, F., Yang, X., Ran, W., & Shen, Q. (2014). *Fusarium oxysporum* induces the production of proteins and volatile organic compounds by *Trichoderma harzianum* T-E5. *FEMS microbiology letters*, 359(1), 116-123. doi: <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12582>
- Živković, S., Stojanović, S., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Popović, T., & Balaž, J. (2010). Screening of antagonistic activity of microorganisms against *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Archives of Biological Sciences*, 62(3), 611-623. doi: <https://doi.org/10.2298/ABS1003611Z>

ANEXOS

Material suplementario

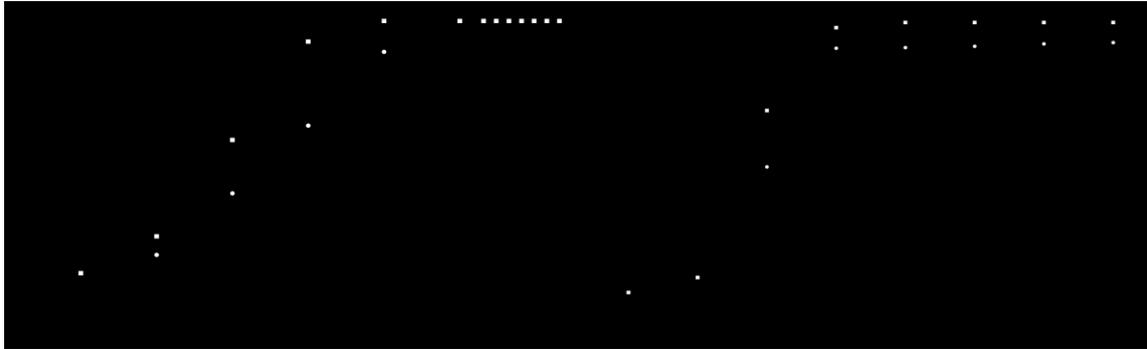


Figura suplementaria 1. Crecimiento cinético de las cepas microbianas. A) PDA B) LB. (○) *Trichoderma* IMI206040, (□) *Trichoderma* JS3, (■) *Trichoderma* T1, (▲) *Trichoderma* T2, (▼) *Trichoderma* T3, (◆) *B. subtilis*, y (→) *C. gloeosporioides*. El crecimiento se monitoreó cada 24 h hasta llegar a la fase estacionaria o saturación de la placa. Los datos son medias \pm DE, n=3. El experimento se repitió dos veces.

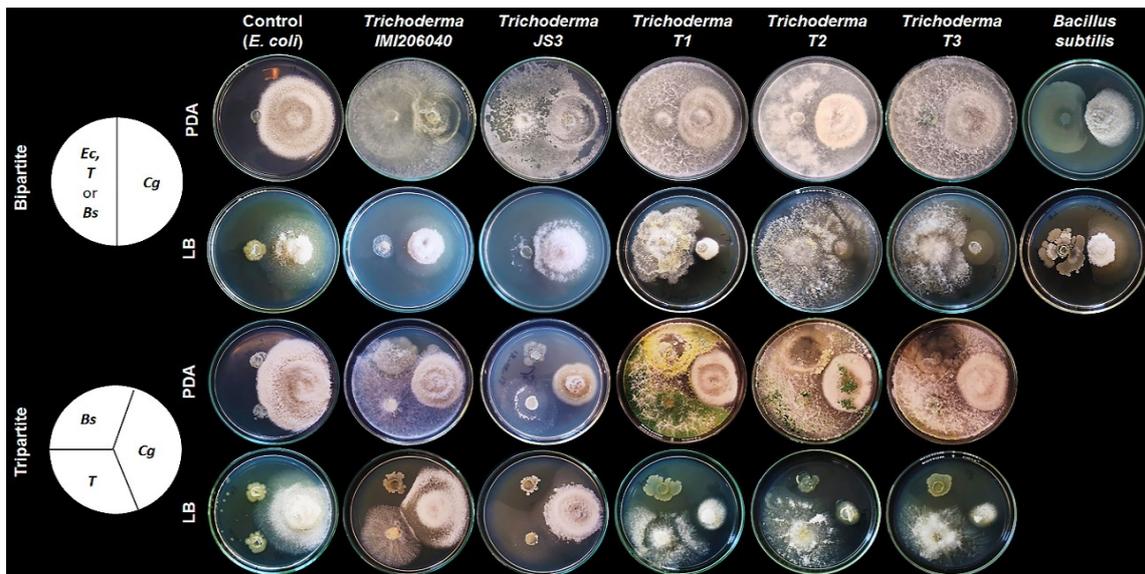


Figura suplementaria 2. Análisis de antagonismo de *Trichoderma* sp. y *Bacillus subtilis* en la inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides*. Fotografías representativas de la inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* generada por *Trichoderma* sp. y/o *Bacillus subtilis* en sistemas bipartitos y tripartitos tanto en medios PDA como LB. Se utilizó *E. coli* como tratamiento de control.

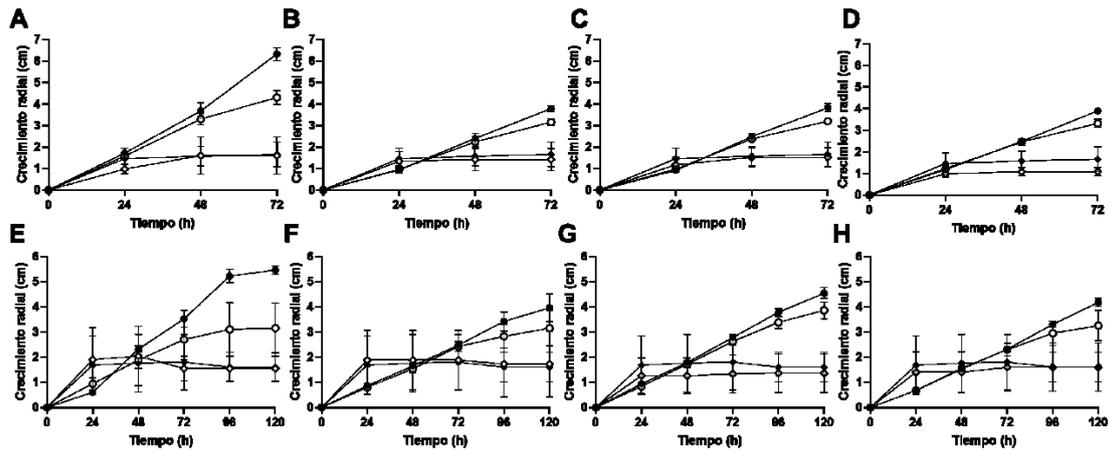


Figura suplementaria 3. Crecimiento cinético de cepas microbianas de los ensayos de antagonismo entre *Trichoderma* sp. y *B. subtilis*. A-D) Medio PDA. E-H) medio LB. El crecimiento se monitoreó en medio PDA de 24 h a 72 h una vez iniciado el enfrentamiento (tras 48 h de inoculación de *B. subtilis*) mientras que en LB medio se monitoreó el crecimiento de 24 h a 120 h. A, E) *Trichoderma* JS3 vs. *B. subtilis*. B, F) *Trichoderma* T1 vs. *B. subtilis*. C, G) *Trichoderma* T2 vs. *B. subtilis*. D, H) *Trichoderma* T3 vs. *B. subtilis*. (●) *Trichoderma* sp. vs. *E. coli*, (○) *B. subtilis* vs. *E. coli*, (▲) *Trichoderma* sp. vs. *B. subtilis*, (◆) *B. subtilis* vs. *Trichoderma* sp. La línea corresponde al primer organismo del sistema de confrontación. Los datos son medias \pm DE, n=5. El experimento se repitió dos veces.

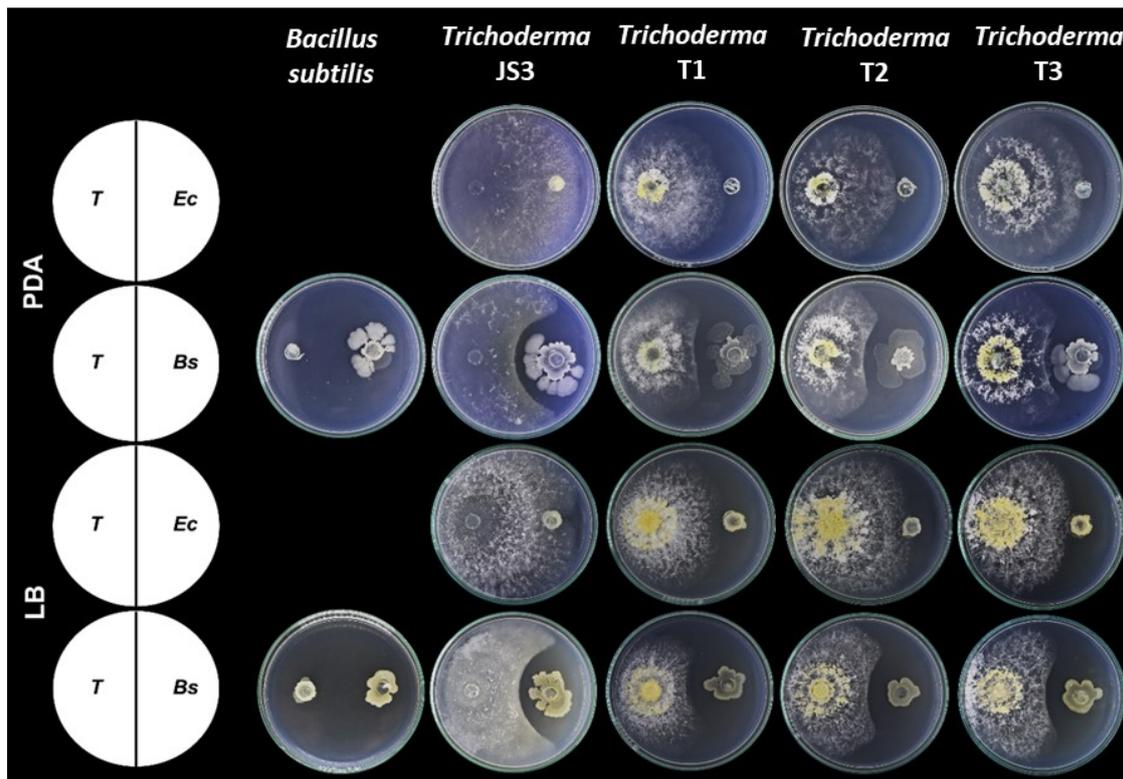


Figura suplementaria 4. Enfrentamientos duales entre *Trichoderma* sp. y *B. subtilis* en medios PDA y LB. Fotografías representativas de los ensayos de antagonismo de *Trichoderma* JS3 vs. *B. subtilis*, *Trichoderma* T1 vs. *B. subtilis*, *Trichoderma* T2 vs. *B. subtilis*, y *Trichoderma* T3 vs. *B. subtilis*. En el medio PDA las fotografías fueron tomadas a las 72 h de confrontación mientras que en el medio LB fueron tomadas a las 120 h de confrontación. Las tasas de crecimiento se normalizaron para cada sistema evaluado. *E. coli* se utilizó como control en todos los sistemas evaluados.