



Artículo Científico

Valorización del nejayote como medio de cultivo para *Pseudomonas fluorescens* y producción de extractos antifúngicos

Víctor Manuel Rodríguez-Romero, Ramón Villanueva-Arce, Enrique Durán-Páramo* Laboratorio de Biotecnología Alimentaria, Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI), Instituto Politécnico Nacional (IPN), Av. Acueducto s/n, Barrio La Laguna Ticomán, Ciudad de México, CP 07340, México.

RESUMEN

Antecedentes / Objetivo. El nejayote es un residuo agroindustrial alcalino que se genera a partir del proceso de nixtamalización del maíz. El propósito de este trabajo fue demostrar que el nejayote puede ser utilizado como medio de cultivo para el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* NR113647 y para la producción de metabolitos con actividad antifúngica para el manejo sustentable de *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium solani*.

Materiales y Métodos. Se formularon medios de cultivo con nejayote y nejayote con glicerol, con pH 6 y 12. La biomasa bacteriana fue separada por centrifugación y filtración y se determinó la capacidad antifúngica *in vitro* de los extractos contra *A. niger*, *B. cinerea* y *F. solani*. Además, se realizó la determinación de los metabolitos presentes en los extractos. *P. fluorescens* NR113647 fue capaz de crecer en todos los medios.

Resultados. Los extractos provenientes de nejayote a pH 12 mostraron inhibición del crecimiento de todos los hongos evaluados; se identificaron al menos cinco metabolitos producidos por *P. fluorescens* NR113647 involucrados en el biocontrol de fitopatógenos.

Conclusión. El nejayote puede ser usado como medio de cultivo para *P. fluorescens* NR113647, para la producción de biomasa y metabolitos secundarios con capacidad antifúngica; además, el nejayote podría usarse para el cultivo de otros microorganismos.

Palabras clave: Control-biológico, nixtamalización, actividad antifúngica.

*Autor de correspondencia:
Enrique Durán-Páramo
eduran@ipn.mx

Sección:
Edición periódica

Recibido:
01 Mayo, 2024

Aceptado:
30 Junio, 2024

Publicado:
16 July, 2024

Cita:
Rodríguez-Romero VM,
Villanueva-Arce R y Durán-Páramo E. 2024. Valorización del nejayote como medio de cultivo para *Pseudomonas fluorescens* y producción de extractos antifúngicos. Revista Mexicana de Fitopatología 42(3): 28. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2405-3>



INTRODUCCIÓN

Uno de los enfoques principales de la biotecnología moderna es el uso del control biológico de fitopatógenos en la agricultura, que se define como la acción de agentes naturales efectivos para combatir enfermedades en cultivos, los cuales representan una alternativa para reducir el uso de productos químicos potencialmente dañinos para el medio ambiente y para la salud humana (Thambugala *et al.*, 2020). De los distintos tipos de agentes de control biológico, los agentes microbianos y en particular, bacterias del género *Pseudomonas* son una excelente opción para aplicarse en la agricultura (Santoyo *et al.*, 2012).

El biocontrol mediado por cepas de *Pseudomonas* se realiza a través de mecanismos como la antibiosis directa, la competencia por nutrientes y por el espacio, la promoción del crecimiento vegetal y la inducción de resistencia sistémica en las plantas (Dimkić *et al.*, 2022). Diversos productos comerciales se han elaborado a partir de biomasa de *Pseudomonas*, por ejemplo: BioJect Spot-Less™, Bio-Save® 10LP, AtEze™, Cedemon, entre otros (Mark *et al.*, 2006). La producción de biomasa microbiana y metabolitos en medios de cultivo líquidos, es indispensable para el desarrollo de productos a base de cepas bacterianas como *Pseudomonas*; sin embargo, el uso de medios de cultivo comerciales en la multiplicación de los microorganismos representa un alto costo; por lo tanto, el uso de subproductos o desechos de la industria alimentaria representa una opción para reducir los costos asociados a la producción y recuperación de agentes de control biológico, al mismo tiempo que se logra la gestión y conversión de residuos en productos utilizables mediante la aplicación de tecnologías biotecnológicas. (Khalil *et al.*, 2016; Sivakumar *et al.*, 2022; Suryanti *et al.*, 2015).

Uno de los principales desechos de la industria alimentaria proviene del procesamiento del maíz (*Zea mays*), el cual está íntimamente relacionado con la cultura mexicana. La tortilla representa el principal alimento derivado del procesamiento del maíz (Hellin *et al.*, 2010); al respecto, se estima que en México el consumo anual actual de tortillas per cápita es de 120 kg (FAOSTAT, 2023). Para la producción de tortillas, los granos de maíz se someten a un proceso térmico alcalino llamado nixtamalización que consiste en la cocción de granos de maíz maduros con cal, los cuales son molidos para obtener una masa y finalmente son procesados (Serna-Saldivar, 2021). La nixtamalización produce cambios químicos y nutricionales en el maíz y el principal subproducto del proceso de nixtamalización es el 'nejayote', considerado el agua alcalina de cocción del maíz; se estima que por cada kilogramo de maíz procesado se obtienen entre 7-8 litros de nejayote (Díaz-Montes *et al.*, 2020).

El nejayote es considerado uno de los efluentes más contaminantes de la industria alimentaria. Este líquido contiene altas concentraciones de materia orgánica

disuelta, correspondiente a las estructuras del grano de maíz que se desprenden durante la cocción (principalmente endospermo y el pericarpio) y a la cal usada en el proceso ($DQO > 28450 \text{ mg L}^{-1}$). Además, el nejayote se caracteriza por tener un pH alcalino con un valor superior a 10 (Meraz *et al.*, 2015). El nejayote representa una fuente importante de azúcares fermentables y compuestos como proteínas, fibras, grasas, etc. Por lo anterior, la utilización del nejayote en otros procesos o purificación de componentes, lo vuelven potencialmente aplicable en la industria biotecnológica (Xu *et al.*, 2021).

Se ha demostrado que el nejayote puede usarse como un medio de cultivo alternativo para desarrollo de distintos microorganismos como *Arthrospira maxima*, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus thuringiensis*, *Chlorella vulgaris*, *Lactobacillus casei*, *L. helveticus* *L. rhamnosus*, así como para la producción de distintos metabolitos secundarios como enzimas, pigmentos o antibióticos (Bacame-Valenzuela *et al.*, 2020; López-Pacheco *et al.*, 2019; Ramírez-Romero *et al.*, 2013; Salazar-Magallon *et al.*, 2015).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el uso del nejayote como medio de cultivo alternativo para el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* NR113647 y para la producción de metabolitos secundarios con actividad antifúngica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico. Se usó la cepa de *Pseudomonas fluorescens* NR113647 identificada previamente con base a las características morfológicas, culturales y bioquímicas del organismo, la identificación molecular se realizó por amplificación y secuenciación del rARN 16s y alineación con las bases de datos del Banco de Genes del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (Rodríguez-Romero *et al.*, 2019). La bacteria se cultivó en Agar King B (KB) (King *et al.*, 1954) durante 7 días e incubó a temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) para los ensayos posteriores. Las cepas de *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* y *Fusarium solani*, utilizadas fueron aisladas y proporcionados por el Laboratorio de Tecnología Postcosecha del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos del Instituto Politécnico Nacional de México (CEPROBI-IPN). Se realizó la identificación molecular (Harwood, 1996) en el Laboratorio de Diagnóstico Integral Fitosanitario (LADIFIT) del Colegio de Postgraduados. Los hongos se cultivaron de forma individual en medio Papa Dextrosa Agar (PDA, BD Bioxon, México) durante 4-7 días e incubaron a temperatura ambiente ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) para los ensayos posteriores.

Obtención, acondicionamiento de nejayote y formulación del medio de cultivo. El nejayote utilizado fue colectado de dos negocios procesadores de maíz ubicados

en la localidad de La Laguna Ticomán, Ciudad de México (19° 31' 12" N, 99° 07' 45" W y altitud de 2248 msnm) y posteriormente se mezclaron. Para eliminar materia orgánica sedimentable, el nejayote se centrifugó (Centrífuga Beckman Coulter® J2-MC, California, EE.UU.) a 10000 rpm durante 15 min a una temperatura de 4 °C, se recuperó el sobrenadante y se midió el pH por electrodo de inmersión (HANNA pHep5®, Romania). Para la elaboración de los medios de cultivo, se realizó un diseño de tratamientos completamente al azar en arreglo factorial que resultó en un total de cuatro tratamientos; 1) Nejayote a pH 6 (N6), 2) Nejayote a pH 12 (N12), 3) Nejayote a pH 6 con 10 g L⁻¹ de glicerol (Ngly 6) y 4) Nejayote a pH 12 con 10 g L⁻¹ de glicerol (Ngly12). El pH del nejayote se ajustó con NaOH o HCl 1 N según fuera necesario. Se usó caldo de cultivo King B (KB) pH 6 como testigo.

pH y evaluación de la producción de biomasa de *P. fluorescens*. El cultivo se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de cada uno de los diferentes tratamientos, se realizaron tres repeticiones independientes por cada tratamiento. Los matraces se esterilizaron (Autoclave Yamato Scientific co. Ltd, SM510, Japón) durante 15 min a 121 °C, se inocularon con 10 mL de *Pseudomonas fluorescens* NR113647 (10⁶ UFC mL⁻¹) y se incubaron a 25 ± 2 °C durante 72 h en agitación constante (120 rpm). Al finalizar el cultivo, el pH de los medios de cultivo se determinó por electrodo de inmersión (HANNA pHep5®, Romania) y se evaluó el desarrollo de biomasa de *P. fluorescens* NR113647 por el método de extensión en placa; para ello, se realizaron diluciones seriadas a partir de cada uno de los medios de cultivo, se sembraron en placas con agar cuenta estándar (ACS, BD Bioxon, México) y se incubaron a 25 °C durante 48 h.

Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de *P. fluorescens*. Para la obtención de los extractos antifúngicos, después de la incubación, cada uno de los tratamientos se centrifugaron (Centrífuga Beckman Coulter® J2-MC, California, EE.UU.) 15 min a 10015 xg a 4°C, se recuperó el sobrenadante, se filtró con membranas estériles (Cole Palmer, EUA) de 0.22 µm. El efecto antifúngico de los extractos se determinó con la técnica del medio de cultivo envenenado (Erhonyota *et al.*, 2023); para ello, se preparó Agar Papa Dextrosa (PDA, BD Bioxon, México) al doble de la concentración recomendada por el fabricante (78 g L⁻¹), el cual se esterilizó (Autoclave Yamato Scientific co. Ltd, SM510, Japón) durante 15 min a 121 °C. Posteriormente, el medio PDA (BD Bioxon, México) se enfrió a una temperatura de 45 °C, se mezcló con el sobrenadante filtrado de cada uno de los tratamientos en proporción 1:1, se depositaron en cajas Petri (90 x 15 mm) y se dejaron solidificar. Se usó medio PDA (BD Bioxon, México) a la concentración recomendada por el fabricante (39 g L⁻¹) como testigo, se realizaron cinco repeticiones independientes por tratamiento. En el centro de las cajas Petri, se sembraron discos

de 5 mm de diámetro con micelio de cada uno de los hongos. El ensayo terminó una vez que el crecimiento de los hongos en el testigo negativo alcanzó el borde de la caja. El porcentaje de inhibición se calculó mediante la medición del diámetro de la colonia de cada unidad experimental, después se usó la fórmula: Inhibición (%) = $[(Da-Db) / Da] \times 100$, donde Da (mm) es el diámetro de crecimiento de los hongos en la placa usada como testigo negativo y Db (mm) es el diámetro de crecimiento de los hongos en las placas del ensayo (Al-Hetar *et al.*, 2011).

Identificación de los metabolitos antifúngicos de *P. fluorescens*. Para la identificación de los metabolitos se utilizó el extracto de medio de nejayote con mayor actividad antifúngica *in vitro*; el tratamiento se mezcló con acetato de etilo en una relación 1:1 y se agitó durante 2 h a 120 rpm. La fracción acuosa se desechó y la fracción orgánica se evaporó a presión reducida, para obtener extracto crudo seco. El extracto seco se suspendió en acetato de etilo a una concentración de 1 mg mL⁻¹. Los estándares de fluoroglucinol y fenazina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU.) se suspendieron en acetato de etilo a una concentración de 0.5 mg mL⁻¹, se tomaron alícuotas de 50 µL y se sometieron a cromatografía de capa fina (TLC; silica gel. 60 F254, 20 X 20, 0.5 mm, Merck and Co, Inc) con un sistema solvente hexano:acetona 3:2. La placa se secó completamente y los compuestos se recuperaron y se detectaron a 254 nm (Suleimana *et al.*, 2010).

Para la identificación de cianuro de hidrógeno (HCN), se utilizó el método descrito por Verma *et al.* (2007). Se inocularon cajas Petri con agar de soya tripticaseína (AST, BD Bioxon, México) con 100 µL del extracto del medio de nejayote con mayor actividad antifúngica, extracto de medio KB (testigo positivo) y agua destilada (testigo negativo); en la parte superior de la caja, se colocaron discos de papel filtro (Whatman no. 1) impregnados de ácido pícrico 0.5 % y carbonato de sodio 2 %, las cajas se sellaron y se incubaron a 30 °C durante 24 h. Después de la incubación, un cambio de color en el papel filtro indica producción de HCN positiva.

Para la identificación de sideróforos se usó el método de ensayo en placa CAS-agar (Schwyn y Neilands, 1987). Se usó el complejo de cromo azulol S (CAS)/Fe³⁺/Hexadeciltrimetilamonio bromuro (HDTMA) como indicador. Para preparar 1 L de agar azul, se disolvieron 60.5 mg de CAS en 50 mL de agua mezclada con 10 mL de Fe III (1 mM FeCl₃·6H₂O en 50 mL de 10 mM HCl), después se mezcló con 900 mL de agar bacteriológico (15 g L⁻¹) a pH 7. Las placas se inocularon con 1 mL del extracto de nejayote con mayor actividad antifúngica, 1 mL de extracto de KB (testigo positivo) y 1 mL de agua destilada (testigo negativo). Las placas se incubaron durante 6 días. La producción de sideróforos se clasificó visualmente en el medio de cultivo en cuatro categorías: 1. Sin producción, 2. Baja producción (amarillo claro), 3. Alta producción (amarillo moderado) 4. Muy alta producción (amarillo).

Análisis estadístico. Los datos experimentales fueron analizados con el software SAS® Studio 3.82 (SAS Institute, Cary, NC), se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey ($*=p \leq 0.05$) para la comparación de medias de los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

pH y evaluación de la producción de biomasa de *P. fluorescens*. Se recolectaron aproximadamente 40 L de nejayote, el pH después de la centrifugación fue 12.21, por lo que se ajustó a los valores correspondientes para cada tratamiento. *P. fluorescens* NR113647 fue capaz de crecer en todos los medios de cultivo de este estudio. La concentración de biomasa producida en los diferentes medios de cultivo fue variable, donde el mayor desarrollo celular se obtuvo en el medio KB6 (testigo) y no hubo diferencias estadísticas con relación a los medios 3 y 4; los tres medios fueron suplementados con glicerol en su formulación inicial. Los medios 1 y 2 (sin adición de glicerol) presentaron una menor concentración de biomasa con respecto al testigo y a los medios con nejayote que se les adicionó glicerol (Cuadro 1). *Pseudomonas* tiene requerimientos nutricionales simples debido a su capacidad para degradar una gran variedad de sustratos orgánicos, desde compuestos aromáticos hasta derivados halogenados y otros residuos orgánicos (Sah *et al.*, 2021). En este sentido, se ha demostrado la capacidad del nejayote para ser usado como medio de cultivo, ya que contiene azúcares fermentables a una concentración aproximada de 148.6 mg L⁻¹ (García-Depraect *et al.*, 2017). Por otra parte, *Pseudomonas* es capaz de utilizar el glicerol como fuente de carbono para la producción de biomasa (Poblete-Castro *et al.*, 2020), además, se ha observado que *Pseudomonas* produce una mayor concentración de biomasa en los medios que contienen glicerol como fuente

Cuadro 1. Evaluación del crecimiento de *P. fluorescens* NR113647 y valores de pH de los distintos tratamientos después de 72 h de incubación.

Tratamiento	Medio de cultivo	Biomasa (Ln UFC mL ⁻¹)	pH final
Testigo	KB6	20.52±0.03 ^a	6.93±0.05 ^a
1	N6	19.55±0.17 ^b	8.40±0.06 ^b
2	N12	19.72±0.25 ^b	8.46±0.06 ^b
3	Ngly6	20.17±0.11 ^a	8.02±0.09 ^c
4	Ngly12	20.22±0.03 ^a	8.03±0.03 ^c

Resultados expresados con la media ± desviación estándar para cada muestra (n = 3). *Letras diferentes en cada columna indican una diferencia significativa ($*=p \leq 0.05$) según la prueba de Tukey.

de carbono, con respecto a los que tienen otras fuentes de carbono como glucosa o succinato (Nikel *et al.*, 2014).

Los valores de pH variaron durante el cultivo en todos los medios de cultivo utilizados. En los tratamientos que iniciaron con un pH 6.0 se observó un incremento del valor pH, mientras que en los cultivos que iniciaron con un pH 12 se observó un decremento de este (Cuadro 1). En los medios 1 y 2, donde había únicamente nejayote, no se observaron diferencias estadísticas ($*=p \leq 0.05$). El valor de pH entre los tratamientos 3 y 4 tampoco mostró diferencias estadísticas ($*=p \leq 0.05$). Por otra parte, el medio de cultivo utilizado como testigo, mantuvo un valor de pH bajo y significativamente diferente con respecto a los demás tratamientos (Cuadro 1).

P. fluorescens, y en general las células bacterianas, dependen de manera crucial del pH del medio en el que se desarrollan. Valores de pH cercanos a 7 son los adecuados para la mayoría de las bacterias. La autorregulación del pH que incluye la detección y adaptación al pH exterior es un mecanismo importante para el desarrollo microbiano. Al respecto, se han identificado numerosas adaptaciones que contribuyen a la homeostasis en un pH alcalino (Sánchez-Clemente, 2018). Cuando las bacterias se encuentran en condiciones alcalinas ($pH < 10$), el transporte activo de protones o fuerza motriz de protones es fundamental para su adaptación a su nicho ecológico; el mecanismo incluye niveles elevados de transportadores y enzimas que promueven la captura y retención de protones (ATP sintasa y antiportadores de protones/cación monovalente). Además, se presentan cambios metabólicos, que conducen a una mayor producción de ácido y cambios en las capas de la superficie celular que contribuyen a la retención de protones en el citoplasma (Krulwich *et al.*, 2011; Padan *et al.*, 2005). La tolerancia al medio alcalino y disminución del pH inicial (de 12 a 8 aproximadamente), resulta importante considerando que en México se establece que el intervalo permisible de pH para aguas residuales que se descargan a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal es de entre 5.5 y 10.0 (NOM-002-ECOL-1996). Por lo anterior, el nejayote no debe depositarse en el alcantarillado municipal; por el contrario, podría en efecto ser utilizado como medio de cultivo para el desarrollo de biomasa y producción de metabolitos, considerando que el caldo de cultivo final usado tendría un valor de pH acorde a las normas de México y podría desecharse.

Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de los extractos de *P. fluorescens*. El periodo de incubación, hasta que los hongos en el testigo negativo (PDA, BD Bioxon, México) alcanzaron el borde de la placa Petri, fue de 9 días para *Aspergillus niger* y *Botrytis cinerea*, mientras que para *Fusarium solani* fue de 14 días. El Cuadro 2 muestra los valores de crecimiento (mm) e inhibición (%) que generaron los distintos tratamientos en los hongos.

Cuadro 2. Evaluación del efecto antifúngico de los extractos obtenidos de *P. fluorescens* NR113647, sobre el crecimiento micelial y la inhibición de *Fusarium solani*, *Botrytis cinerea* y *Aspergillus niger*.

Medio de cultivo	<i>F. solani</i>		<i>B. cinerea</i>		<i>A. niger</i>	
	Crecimiento (mm)	Inhibición (%)	Crecimiento (mm)	Inhibición (%)	Crecimiento (mm)	Inhibición (%)
PDA	90.0±0.0 ^a	0.0	90.0±0.0 ^a	0.0	90.0±0.0 ^a	0.00
KB6	30.5±1.4 ^b	66.0	0.0±0.0 ^c	100.0	48.6±2.5 ^d	45.9
N6	90.0±0.0 ^a	0.0	90.0±0.0 ^a	0.0	90.0±0.0 ^a	0.00
N12	31.9±1.4 ^b	64.5	21.0±4.5 ^d	76.6	66.0±3.6 ^c	26.5
Ngly6	90.0±0.0 ^a	0.0	60.9±1.6 ^b	32.3	90.0±0.0 ^a	0.00
Ngly12	67.4±2.3 ^c	25.0	27.3±2.2 ^c	69.5	76.9±2.16 ^b	14.5

Testigo negativo=PDA. Testigo positivo=KB6. Resultados expresados con la media ± desviación estándar para cada muestra (n = 5). Letras diferentes en cada columna indican una diferencia significativa (*=p ≤ 0.05) según la prueba de Tukey.

Los hongos utilizados en este estudio y cultivados en medio PDA tuvieron un crecimiento radial. Los extractos obtenidos del medio KB6 (testigo positivo) produjeron los mayores niveles y porcentajes de inhibición *in vitro* de todos los tratamientos. *Botrytis cinerea* fue el más sensible, ya que su crecimiento se inhibió en un 100 %. En otros estudios se ha observado distintos valores de inhibición que van desde 60 % hasta un 75-99 %, con extractos obtenidos de caldo nutritivo (Mikani *et al.*, 2008; Wallace *et al.*, 2019).

En los tratamientos del testigo positivo para la cepa de *Fusarium solani* se obtuvo una inhibición de 66%, en comparación con otros estudios donde cepas de *P. fluorescens* mostraron una inhibición que va desde 43 % hasta una completa inhibición (100 %) del crecimiento micelial de *Fusarium* spp. (Al-Fadhal, 2019; Trejo-Raya *et al.*, 2021). La cepa de *Aspergillus niger* fue la que desarrolló un mayor crecimiento, con una inhibición del 45 %; sin embargo, se ha reportado en otros estudios que *P. fluorescens* mostró una inhibición entre un 20-30 % en comparación con el control (Akocak *et al.*, 2015) y hasta un 78.77% del crecimiento micelial (Deshmukh, 2015).

Los extractos obtenidos del medio N6 no inhibieron el crecimiento de ninguno de los hongos evaluados *in vitro* en este estudio; este comportamiento fue similar para los extractos obtenidos del medio Ngly6 que no inhibieron el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Fusarium solani*, aunque para *Botrytis cinerea* se registró inhibición de 32 % aproximadamente. En contraparte, los extractos obtenidos de Ngly12 generaron valores de inhibición entre 14 y 25 % para *Aspergillus niger* y *Fusarium solani*, sin embargo, se observó una inhibición de casi 70 % en *Botrytis cinerea*. Los extractos obtenidos de N12 para los hongos *Botrytis cinerea* y

Aspergillus niger, generaron valores de inhibición numéricamente similares, pero significativamente diferentes a los obtenidos con los extractos del testigo positivo (KB6); para el hongo *Fusarium solani* no hubo diferencia estadística entre el medio KB6 y N12.

Debido a que la composición de los medios de nejayote es básicamente la misma en todos los tratamientos, los resultados de este estudio podrían sugerir que las diferencias en el efecto de inhibición está ligada a los valores iniciales de pH y a la adición de glicerol a los medios de cultivo; Saleh-Lakha *et al.* (2009) determinaron que los niveles de expresión génica para la producción de metabolitos por *Pseudomonas mandelii* fueron entre 539 y 6190 veces más bajos en medio con un pH de 5, que para valores de pH 8. Por otra parte, Zhou *et al.* (2012) observaron que para que una cepa de *Pseudomonas* exprese actividad antifúngica, el valor del pH del medio de cultivo debe ser al menos de 10. Los genes implicados en la producción de metabolitos se relacionan de forma directa con la transcripción de genes involucrados en la protección contra el estrés, así como daños en la membrana y pared celular; estos genes forman parte del sistema regulador global para la activación de la síntesis de antibióticos y cianuro (GaC) y el sistema represor de metabolitos secundarios (RsM), los cuales se ven influenciados de forma positiva por señales ambientales donde destacan valores de pH 8 (Anderson *et al.*, 2017; Xue *et al.*, 2013). Con respecto a la adición de glicerol al medio, Nickel *et al.* (2014) concluyeron que el crecimiento de *Pseudomonas* en presencia de glicerol, altera la transcripción de alrededor de 104 genes que codifican actividades metabólicas y no metabólicas, las cuales podrían estar involucradas en la producción de metabolitos antifúngicos. En el caso del presente estudio, es probable que el cultivo de *P. fluorescens* NR113647 a pH 12 podría incrementar la expresión de la producción de metabolitos relacionados con el biocontrol.

Identificación de los metabolitos involucrados en la actividad antifúngica. La cromatografía en capa fina de los extractos crudos secos de *P. fluorescens* NR113647 cultivada en el medio de cultivo N12, mostró la presencia de al menos cinco compuestos, los cuales se compararon con los estándares de fenazina y fluoroglucinol (Cuadro 3). Los recorridos de los componentes eluidos podrían indicar que el extracto crudo seco contiene al menos un compuesto antifúngico que puede ser derivado del fluoroglucinol y que corresponde a la mancha 1. El fluoroglucinol es un metabolito con numerosos derivados y ampliamente reconocido por su capacidad antifúngica, algunas cepas de *Pseudomonas* producen 2,4-diacetilfluoroglucinol y sus intermedios monoacetilfluoroglucinol y fluoroglucinol (Biessy y Filion, 2021). Por otro lado, la mancha 5 es la más próxima al estándar de fenazina lo que podría indicar la presencia de algún derivado de este componente, ya que se conoce que el género *Pseudomonas* produce ácido fenazina-1-carboxílico y 2-hi-

Cuadro 3. Factores de retención de los extractos de *P. fluorescens* NR113647 obtenidos del tratamiento N12, comparación contra compuestos estándar.

Sustancia	Rf
Mancha 1	0.20
Mancha 2	0.31
Mancha 3	0.47
Mancha 4	0.52
Mancha 5	0.92
*Fenazina	0.83
*Fluoroglucinol	0.21

*Estándares [0,5 mg mL⁻¹] y extractos de *P. fluorescens* NR113647 [1 mg mL⁻¹]. Sistema hexano: acetona (2:1). Los compuestos fueron detectados con UV a 254 nm.

droxifenazina, los cuales son metabolitos con actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos (Castaldi *et al.*, 2021). A pesar de que no se pudieron identificar todos los metabolitos presentes en el extracto crudo seco, Zhang *et al.*, (2020), observaron que *Pseudomonas* alberga genes involucrados en la producción de más de diez metabolitos como el diacetilfluoroglucinol, pioverdinas, pioquelinas, pirrolnitrina, HCN, etc., los cuales podrían corresponder al resto de los componentes eluidos en el ensayo de cromatografía de capa fina. Sin embargo, los resultados podrían no ser extrapolables en su totalidad y se requieren estudios profundos para la determinación de metabolitos en este estudio.

Para la identificación de la producción de HCN (Figura 1), en la placa testigo (A) no se observó cambio de coloración. Los extractos obtenidos del medio KB6 (testigo) mostraron un color naranja en la periferia que indica que *P. fluorescens* NR113647 produce HCN en este medio de cultivo. La placa del extracto del medio N12 mostró un ligero color naranja-amarillo, por lo que se puede asumir que también hay una presencia de HCN, pero en cantidades menores con respecto a KB6. La producción de HCN por microorganismos juega un papel importante en la inhibición del crecimiento de diversos hongos y otros agentes bióticos fitopatógenos que incluyen malezas, insectos y nematodos, tiene un amplio espectro ya que interfiere directamente con la respiración celular en patógenos eucariotas, por lo que puede ser usada ampliamente como metabolito de biocontrol (Sehrawat *et al.*, 2022).

Con relación a la producción de sideróforos, según el ensayo en placa CAS-agar, descrito en la metodología (Figura 2), no se observó cambio de coloración en la placa de Petri con agua destilada estéril. En el medio KB6 se observó una coloración amarilla intensa que evidencia una gran proporción de estos metabolitos. Para

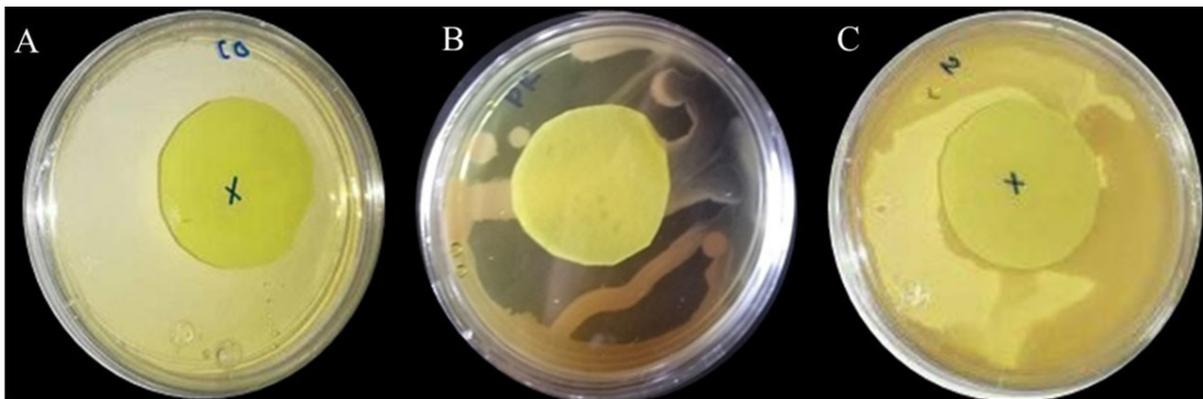


Figura 1. Identificación de la producción de cianuro de hidrógeno en placa de Petri. Testigo negativo de agua destilada (A), extractos libres de células de *P. fluorescens* NR113647 en medio KB6 (B) y extractos libres de células de *P. fluorescens* NR113647 en medio N12 (C).

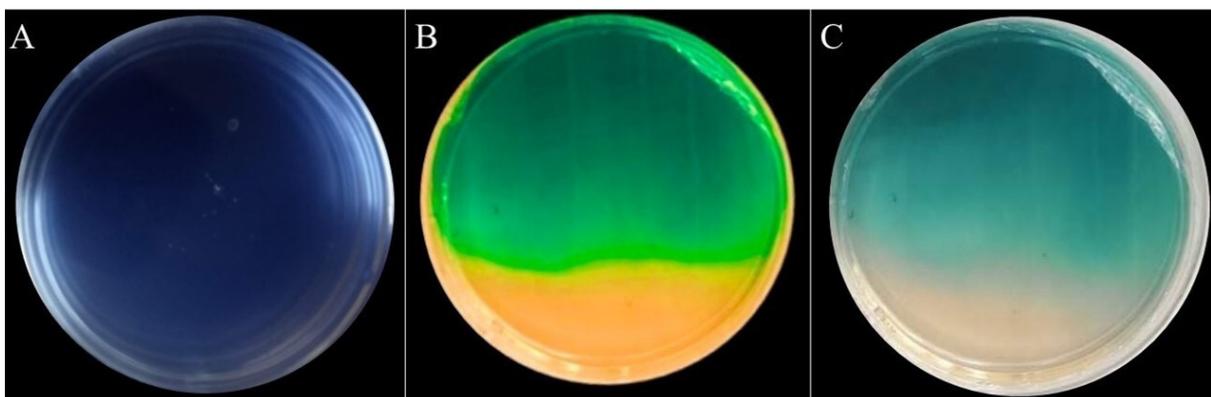


Figura 2. Identificación de sideróforos, placa de Petri con agua destilada estéril como testigo (A) y extractos libres de células de *P. fluorescens* NR113647 (B) (Trejo-Raya *et al.*, 2021) y extractos libres de células de *P. fluorescens* NR113647 en medio N12 (C).

el caso del medio N12, se apreció una coloración amarilla pálida que evidencia una producción limitada de sideróforos. Estos metabolitos se reportan como uno de los principales compuestos de control biológico con efecto antifúngico por parte de *P. fluorescens*, los cuales permiten la adquisición de Fe del medio o sitio de colonización y así mantener el crecimiento normal de la bacteria (Rizzi *et al.*, 2019). Sin embargo, en el presente estudio, se observó que las condiciones del medio N12 no favorece la producción de sideróforos debido a la baja producción con respecto al testigo y por lo tanto no fueron los principales metabolitos de biocontrol.

El complejo de *Pseudomonas fluorescens* incluye a más de cincuenta especies diferentes de cepas asignadas taxonómicamente, la mayoría de ellas con aplica-

ciones potenciales en el biocontrol. Una alta proporción de estas cepas no se han secuenciado completamente y presentan una alta homología molecular, además se describen nuevas especies de forma frecuente (Garrido-Sanz *et al.*, 2016), por lo tanto, los resultados de esta investigación no se pueden correlacionar de forma directa para todas las poblaciones de *P. fluorescens*, sin embargo el uso de *P. fluorescens* NR113647 y este medio de cultivo propuestos, podría ser útil para la valoración del metabolismo de otras cepas y/o poblaciones genéticas del complejo *P. fluorescens*.

CONCLUSIONES

En este estudio se investigó el uso potencial del nejayote como un medio de cultivo alternativo de *Pseudomonas fluorescens* NR113647. La cepa fue capaz de crecer en todos los tratamientos conteniendo nejayote; entre los extractos evaluados, el extracto de Nejayote pH 12 mostró los mejores resultados, ya que inhibió el crecimiento micelial *in vitro* de los hongos *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani* y *Aspergillus niger* en 76.66, 64.55 y 26.56%, respectivamente. En el análisis de metabolitos antifúngicos del extracto de Nejayote de pH 12, se identificó la producción de cianuro de hidrógeno y sideróforos, así como la posible producción de compuestos derivados de fenazina y fluoroglucinol. La valorización del nejayote y uso a pH 12 sin adición de glicerol, representa una alternativa viable y amigable con el medio ambiente para su utilización como medio de cultivo de *P. fluorescens* NR113647, en la producción de biomasa y de extractos que contengan metabolitos secundarios de interés en la industria agrícola para el control de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos.

LITERATURA CITADA

- Akocak P B, Churey J J, and Worobo R W. 2015. Antagonistic effect of chitinolytic *Pseudomonas* and *Bacillus* on growth of fungal hyphae and spores of aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. Food Bioscience 10, 48–58. <https://doi:10.1016/j.fbio.2015.01.005>
- Al-Fadhal F A, Al-Abedy A N, and Alkhafije D A. 2019. Isolation and molecular identification of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani* isolated from cucumber (*Cucumis sativus* L.) and their control feasibility by *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis*. Egyptian Journal of Biological Pest Control 29, 1-11. <https://doi.org/10.1186/s41938-019-0145-5>
- Al-Hetar M Y, Zainal Abidin M A, Sariah M, and Wong M Y. 2011. Antifungal activity of chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Journal of applied polymer science 120(4), 2434-2439. <https://doi.org/10.1002/app.33455>
- Anderson A J, Kang, B R, and Kim Y C. 2017. The Gac/Rsm signaling pathway of a biocontrol bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6. Research in Plant Disease 23(3), 212-227. <https://doi.org/10.5423/RPD.2017.23.3.212>
- Bacame-Valenzuela F J, Pérez-García J A, Figueroa-Magallón M L, Espejel-Ayala F, Ortiz-Frade L A, and Reyes-Vidal Y. 2020. Optimized production of a redox metabolite (Pyocyanin) by *Pseudomonas aeruginosa* nej01r using a maize by-product. Microorganisms 8(10), 1–17. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101559>

- Biessy A, and Filion M. 2021. Phloroglucinol derivatives in plant-beneficial *Pseudomonas spp.*: biosynthesis, regulation, and functions. *Metabolites* 11(3), 182. <https://doi.org/10.3390/metabo11030182>
- Castaldi S, Masi M, Sautua F, Cimmino A, Istatico R, Carmona M, and Evidente A. 2021. *Pseudomonas fluorescens* showing antifungal activity against *Macrophomina phaseolina*, a severe pathogenic fungus of soybean, produces phenazine as the main active metabolite. *Biomolecules* 11(11), 1728.
- Deshmukh S, Bishi S, and Vakharia D. 2015. *Pseudomonas fluorescens* modulate *in-vitro* lytic enzyme production and inhibit the growth of collar rot pathogen (*Aspergillus niger*) in groundnut (*Arachis hypogaea L.*). *J Pure Appl Microbiol* 9, 1531-1538. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20173288182>
- Díaz-Montes E, Barragán-Huerta B E, and Yáñez-Fernández J. 2020. Identification and Evaluation of Antioxidant Activity of Hydroxycinnamic Acids Extracted by Ultrafiltration from Three Varieties of Mexican Maize. *Waste and Biomass Valorization* 11(5), 1799–1808. <https://doi.org/10.1007/s12649-018-0420-9>
- Dimkić I, Janakiev T, Petrović M, Degrassi G, and Fira D. 2022. Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. In *Physiological and Molecular Plant Pathology* (Vol. 117). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2021.101754>
- Erhonyota C, Edo G I, and Onoharigho F O. 2023. Comparison of poison plate and agar well diffusion method determining the antifungal activity of protein fractions. *Acta Ecologica Sinica* 43(4), 684-689. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2022.08.006>
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2023. FAOSTAT Statistics Database. <http://www.fao.org/faostat/> (February 2023).
- García-Depraect O, Gómez-Romero J, León-Becerril E, and López-López A. 2017. A novel biohydrogen production process: Co-digestion of vinasse and Nejayote as complex raw substrates using a robust inoculum. *International Journal of Hydrogen Energy* 42(9), 5820-5831. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.11.204>
- Garrido-Sanz D, Meier-Kolthoff J P, Göker M, Martín M, Rivilla R, and Redondo-Nieto M. 2016. Genomic and genetic diversity within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *PloS one* 11(2), e0150183. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150183>
- Harwood, A. J. (1996). Basic DNA and RNA protocols. *Methods in molecular biology* (ISSN 1064-3745, 58. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19960103443>
- Hellin J, Keleman A, and Bellon M. 2010. Maize diversity and gender: Research from Mexico. *Gender and Development* 18(3), 427–437. <https://doi.org/10.1080/13552074.2010.521989>
- Khalil S, Ali T A, Skory C, Slininger P J, and Schisler D A. 2016. Evaluation of economically feasible, natural plant extract-based microbiological media for producing biomass of the dry rot biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* P22Y05 in liquid culture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(2). <https://doi.org/10.1007/s11274-015-1984-1>
- King E O, Ward M K, and Raney D E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 44(2), 301-307. <https://doi.org/10.5555/uri:pii:002221435490222X>
- Krulwich T A, Sachs G, and Padan E. 2011. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis. *Nature Reviews Microbiology* 9:5 330–343. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2549>
- López-Pacheco I Y, Carrillo-Nieves D, Salinas-Salazar C, Silva-Núñez A, Arévalo-Gallegos A, Barceló D, Afewerki S, Iqbal H M N, and Parra-Saldívar R. 2019. Combination of nejayote and swine wastewater as a medium for *Arthrospira maxima* and *Chlorella vulgaris* production and wastewater treatment. *Science of the Total Environment* 676, 356–367. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.278>
- Mark G L, Morrissey J P, Higgins P, and O’Gara F. 2006. Molecular-based strategies to exploit *Pseudomonas* biocontrol strains for environmental biotechnology applications. *FEMS Microbiology Ecology* 56:2, 167–177. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00056.x>
- Meraz S, Karla A, Vargas P, Trinidad J, Maldonado L, Manuel J, Bravo C, Oropeza M T, Alberto E, and Maldonado L. 2015. Eco-friendly innovation for nejayote coagulation-flocculation process using chitosan: Evaluation through zeta potential measurements. *Chemical engineering journal* 284. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.026>
- Mikani A, Etebarian H R, Sholberg P L, O’Gorman D T, Stokes S, and Alizadeh A. 2008. Biological control of apple gray mold caused by *Botrytis mali* with *Pseudomonas fluorescens* strains. *Postharvest Biology and Technology* 48:1, 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.09.020>

- Nikel P I, Kim J, and de Lorenzo V. 2014. Metabolic and regulatory rearrangements underlying glycerol metabolism in *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology* 16(1), 239–254. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12224>
- NORMA Oficial Mexicana NOM-002-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. Diario Oficial de la Federación https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4881304&fecha=03/06/1998#gsc.tab=0
- Padan E, Bibi E, Ito M, and Krulwich T A. 2005. Alkaline pH homeostasis in bacteria: New insights. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1717:2 67–88. <https://doi.org/10.1016/j.bbmem.2005.09.010>
- Poblete-Castro I, Wittmann C, and Nikel P I. 2020. Biochemistry, genetics and biotechnology of glycerol utilization in *Pseudomonas* species. *Microbial Biotechnology* 13:1 32–53 <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13400>
- Ramírez-Romero G, Reyes-Velazquez M, and Cruz-Guerrero A. 2013. Study of nejayote as culture medium for probiotics and production of bacteriocins. *Revista Mexicana de Ingeniera Química* 12(3), 463–471. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1665-27382013000300009&script=sci_abstract&tlng=en
- Rizzi A, Roy S, Bellenger J P, and Beauregard P B. 2019. Iron homeostasis in *Bacillus subtilis* requires siderophore production and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 85(3), e02439-18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02439-18>
- Rodríguez-Romero V M, Villanueva-Arce R, Trejo-Raya A B, y Bautista-Baños S. 2019. Quitosano y extractos de *Pseudomonas fluorescens* para el control de *Alternaria alternata* en jitomate (*Solanum lycopersicum*). *Revista Mexicana de Fitopatología* 37:2 202-219 <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1812-2>
- Sah S, Krishnani S, and Singh R. 2021. *Pseudomonas* mediated nutritional and growth promotional activities for sustainable food security. *Current Research in Microbial Sciences* 2:100084. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100084>
- Schwyn B, & Neilands J. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry* 160 (1), 47-56.
- Salazar-Magallon J A, Hernandez-Velazquez V M, Alvear-García A, Arenas-Sosa I, and Peña-Chora G. 2015. Evaluation of industrial by-products for the production of *Bacillus thuringiensis* strain GP139 and the pathogenicity when applied to *Bemisia tabaci* nymphs. *Bulletin of Insectology* 68:1 103–109. <http://www.bulletinofinsectology.org/pdfarticles/vol68-2015-103-109salazar-magallon.pdf>
- Saleh-Lakha S, Shannon K E, Henderson S L, Goyer C, Trevors J T, Zebarth B J, and Burton D. L. 2009. Effect of pH and temperature on denitrification gene expression and activity in *Pseudomonas mandelii*. *Applied and environmental microbiology* 75(12), 3903-3911. <https://doi.org/10.1128/AEM.00080-09>
- Sánchez-Clemente R, Igeño M I, Población A G, Guijo M I, Merchán F, and Blasco R. 2018. Study of pH Changes in Media during Bacterial Growth of Several Environmental Strains. *Proceedings* 2, 1297. <https://doi.org/10.3390/proceedings2201297>
- Santoyo G, del Orozco-Mosqueda M C, and Govindappa M. 2012. Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: A review. *Biocontrol Science and Technology*. 22:8 855–872. <https://doi.org/10.1080/09583157.2012.694413>
- Schwyn B, and Neilands J B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry* 160(1), 47-56. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90612-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90612-9)
- Shrawat A, Sindh S. S, and Glick B R. 2022. Hydrogen cyanide production by soil bacteria: Biological control of pests and promotion of plant growth in sustainable agriculture. *Pedosphere* 32(1), 15-38. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60058-9](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60058-9)
- Serna-Saldivar S O. 2021. Understanding the functionality and manufacturing of nixtamalized maize products. *Journal of Cereal Science* 99: 103205. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2021.103205>
- Sivakumar D, Srikanth P, Ramteke P W, and Nouri J. 2022. Agricultural waste management generated by agro-based industries using biotechnology tools. *Global Journal of Environmental Science and Management* 8(2), 281-296. <https://doi.org/10.22034/GJESM.2022.02.10>
- Suleimana M M, McGaw L J, Naidoo V, and Eloff J N. 2010. Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species. *Afr J Tradit Complement Altern Med* 7:64–78. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v7i1.57269>

- Suryanti V, Marliyana S D, and Wulandari A. 2015. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* growing on molasses and its application in phenol degradation. AIP Conference Proceedings 1699. <https://doi.org/10.1063/1.4938318>
- Thambugala K M, Daranagama D A, Phillips A J L, Kannangara S D, and Promputtha I. 2020. Fungi vs. Fungi in Biocontrol: An Overview of Fungal Antagonists Applied Against Fungal Plant Pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10:604923. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.604923>
- Trejo-Raya A B, Rodríguez-Romero V M, Bautista-Baños S, Quiroz-Figueroa F R, Villanueva-Arce R, and Durán-Páramo E. 2021. Effective *in vitro* control of two phytopathogens of agricultural interest using cell-free extracts of *Pseudomonas fluorescens* and chitosan. *Molecules* 26(21), 6359. <https://doi.org/10.3390/molecules26216359>
- Verma R, Naosekham A S, Kumar S, Prasad R, and Shanmugam V. 2007. Influence of soil reaction on diversity and antifungal activity of fluorescent pseudomonads in crop rhizospheres. *Bioresource technology* 98(7), 1346-1352. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.05.030>
- Wallace R L, Hirkala D L, and Nelson L M. 2019. *Pseudomonas fluorescens* and low doses of chemicals inhibit postharvest decay of apples in commercial storage. *Canadian Journal of Plant Pathology* 41:3, 355–365. <https://doi.org/10.1080/07060661.2019.1605539>
- Xu C, Fu Y, Liu F, Liu Z, Ma J, Jiang R, Song C, Jiang Z, and Hou J. 2021. Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* 1.0320. *Lwt* 137:600, 110338. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110338>
- Xue Wei, Xianqing Huang, Lulu Tang, Daqiang Wu, and Yuquan Xu. 2013. Global Control of GacA in Secondary Metabolism, Primary Metabolism, Secretion Systems, and Motility in the Rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* M18. *Journal of bacteriology* 195(15), 3387-3400. <https://doi.org/10.1128/jb.00214-13>
- Zhang Q X, Kong X W, Li S Y, Chen X J, and Chen X J. 2020. Antibiotics of *Pseudomonas protegens* FD6 are essential for biocontrol activity. *Australasian plant pathology* 49, 307-317. <https://doi.org/10.1007/s13313-020-00696-7>
- Zhou T, Chen D L C, Sun Q, Li L, Liu F, and Shen B. 2012. Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* and identification of its antimicrobial components. *Microbiological research* 167(7), 388-394. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2012.01.003>