



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE EL GIRÓN
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**BACTERIAS DEL GÉNERO *BACILLUS* COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO
IN VITRO DEL HONGO FITOPATÓGENO *ALTERNARIA* sp**

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
INGENIEROS EN BIOTECNOLOGÍA**

AUTORES: ANTONY SALVADOR VINUEZA PÁEZ

REBECA MARÍA NÚÑEZ LARA

TUTOR: RAMIRO DANIEL ACURIO VÁSCONEZ

Quito-Ecuador

2023

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Rebeca María Nuñez Lara con documento de identificación N° 1726626870 y Antony Salvador Vinueza Páez con documento de identificación N° 1722693320; manifestamos que:

Somos los autores y responsables del presente trabajo; y, autorizamos a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Quito, 01 de agosto del año 2023

Atentamente,



Rebeca María Nuñez Lara
1726626870



Antony Salvador Vinueza Páez
1722693320

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotros, Rebeca María Nuñez Lara con documento de identificación No.1726626870 y Antony Salvador Vinueza Páez con documento de identificación No.1722693320, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Bacterias del Género *Bacillus* como Agentes de Control Biológico *In Vitro* del Hongo Fitopatógeno *Alternaria* sp”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieros en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribimos este documento en el momento que hacemos la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 01 de agosto del año 2023

Atentamente,



Rebeca María Nuñez Lara
1726626870



Antony Salvador Vinueza Páez
1722693320

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Ramiro Daniel Acurio Vásconez con documento de identificación N° 1714819495, docente de la Universidad Politécnica Salesiana declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: BACTERIAS DEL GÉNERO *BACILLUS* COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO *IN VITRO* DEL HONGO FITOPATÓGENO *ALTERNARIA* SP, realizado por Rebeca María Nuñez Lara con documento de identificación N° 1726626870 y por Antony Salvador Vinueza Páez con documento de identificación N°1722693320, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Quito, 01 de agosto del año 2023

Atentamente,



Ing. Ramiro Daniel Acurio Vásconez M.Sc.

1714819495

Dedicatoria y agradecimiento

A mi madre que desde el momento que tomó la decisión de ser mi madre ha dado su alma y su corazón para cuidarme y amarme, que con todo su afecto, cariño, comprensión, ternura y apoyo ha sido la pieza fundamental para la construcción del rompecabezas de mi vida y que me han convertido en la persona que soy hoy en día, no tengo palabras para agradecer todo lo que ha hecho por mí. A mi padre que sin importar las circunstancias siempre ha hecho su mayor esfuerzo para permitirnos salir adelante tanto a mi como a toda mi familia, y pese a las circunstancias siempre ha buscado alternativas para nuestro bienestar y que gracias a su carácter a forjado el mío. Y a mis hermanos que sin lugar a duda han sido parte de mi camino de formación, mi hermano que a pesar de ser hermanos ha sido como un amigo y compañero en todo momento tanto en las buenas como en las malas y mi hermana que me ha demostrado que sin importar lo que sucede siempre hay que salir adelante.

A mis sobrinos, tías, tíos, primos que siempre han estado a mi lado para alegrarme hasta en los días más tristes, en especial a mi tía Olga que siempre ha sido como una madre y que ha heredado el gran amor y corazón de mi abuela para entregar cariño para cada uno de nosotros.

A mi pareja que al final del camino ha sido un gran apoyo, tanto emocional como mentalmente y que con su compañía me ha dado fuerza para mantenerme firme en el camino hacia conseguir mis más anhelados propósitos.

A la Universidad Politécnica Salesiana y a el docente tutor por todo el apoyo brindado y por permitirme realizar este trabajo brindándonos todas las herramientas necesarias para lograrlo.

Finalmente, a mi compañera de tesis que a lo largo de la carrera ha demostrado ser una gran amiga y persona, y ayudarme a mejorar en algunos aspectos que han hecho que podamos llegar hasta este punto.



.....

Antony Vinueza

A Dios, por todas las bendiciones que me ha dado a lo largo de toda mi vida y haber sido siempre la fortaleza que me impulsa a continuar hacia adelante y terminar lo que empiezo. A mi madre, a mi padre que aunque no esté en este mundo ha sido mi otra fortaleza, a mis hermanos por su apoyo incondicional y su gran amor, a mis amigos que han estado conmigo en todo momento.

A handwritten signature in black ink that reads "Rebeca Nuñez". The signature is stylized with large, sweeping loops and a cursive-like font.

Rebeca Nuñez

Resumen

Alternaria sp es un hongo fitopatógeno que afecta a un gran número de especies vegetales, como, brócoli, coliflor, rosas, col, entre otras, por lo que actualmente la mayor demanda para el control de fitopatógenos está basada en la adquisición de productos químicos y la aplicación continua de estos, sin embargo debido a los problemas ambientales y de salud generados por los mismos a largo plazo ha surgido un gran interés por el control biológico, y alternativas amigables con el medio ambiente y la utilización de bacterias. Uno de los organismos de mayor interés en el control biológico son las bacterias del género *Bacillus*, debido a la amplia variedad de metabolitos secundarios producidos por estas. Del banco de cepas bacterianas aisladas de la Universidad Politécnica Salesiana, en la fase de laboratorio se sometió a termoterapia a fin de establecer aquellas con la capacidad de producción de endosporas, tras reducir el grupo a un total de 73 cepas se realizó una identificación microscópica de *Alternaria* sp, por tinción simple y de las bacterias por tinción Gram y tinción de esporas, se identificó que las cepas son del tipo *Bacillus*, se fomentó la producción de metabolitos secundarios por medio de biorreactores simples, de tipo Batch Aireado, donde tras el transcurso de 48h se obtuvo metabolitos y se aplicó la prueba de antibiograma, tras la formación de halos de inhibición se redujo a un número de 15 cepas de las cuales se aplicó enfrentamientos duales, obteniéndose diámetros del hongo fitopatógeno para los cálculos relacionados al porcentaje de inhibición, donde se destacaron dos cepas H66 y F25 con poder antagónico demostrando porcentajes de inhibición mayores al 40%, además que en su mayoría de las cepas 14 de 15 respectivamente tienen porcentajes de inhibición de más del 30% lo que indica que estas cepas de *Bacillus* tienen un alto potencial para el biocontrol de *Alternaria* sp.

Palabras clave: *Alternaria* sp, Control biológico, *Bacillus*, Metabolitos, Inhibición

Abstract

Alternaria sp is a phytopathogenic fungus that affects a large number of plant species, including broccoli, cauliflower, roses, cabbage, among others, so currently the greatest demand for the control of phytopathogens is based on the acquisition of chemical products and the continuous application of these, however, due to the environmental and health problems generated by them in the long term, a great interest in biological control has arisen, and alternatives that are friendly to the environment and the use of bacteria. One of the organisms of greatest interest in biological control are the bacteria of the *Bacillus* genus, due to the wide variety of secondary metabolites produced by them. From the bank of bacterial strains isolated from the Salesian Polytechnic University, in the laboratory phase it was subjected to thermotherapy in order to establish those with the capacity to produce endospores, after reducing the group to a total of 73 strains, a microscopic identification of *Alternaria* sp, by simple staining and of the bacteria by Gram staining and spore staining, it was identified that the strains are of the *Bacillus* type, the production of secondary metabolites was promoted by means of simple bioreactors, of the Aerated Batch type, where after the course of 48h it was obtained metabolites and the antibiogram test was applied, after the formation of inhibition halos it was reduced to a number of 15 strains of which dual confrontations were applied, obtaining diameters of the phytopathogenic fungus for the calculations related to the percentage of inhibition, where two stood out. strains H66 and F25 with antagonistic power demonstrating inhibition percentages greater than 40%, in addition that most of the strains 13 out of 15 respectively have inhibition percentages of more than 30%, which indicates that these *Bacillus* strains have a high potential for the biocontrol of *Alternaria* sp.

Keywords: *Alternaria* sp, Biological control, *Bacillus*, Metabolites, Inhibition

Índice de contenidos

Contenido

1. Introducción.....	1
2. Fundamentación teórica.....	4
2.1 Controladores Biológicos.....	4
2.2 El género <i>Bacillus</i>	4
2.2.1 Características principales.....	4
2.2.2 Condiciones de desarrollo.....	5
2.2.3 Ciclo de desarrollo.....	5
2.3 <i>Bacillus</i> spp. como controladores biológicos.....	6
2.3.1 Mecanismos de acción de control biológico.....	7
2.4 Producción de metabolitos en bacterias del género <i>Bacillus</i> a escala o nivel de laboratorio. .	9
2.4.1 Biorreactores.....	10
2.4.2 Tipo de biorreactores.....	11
2.5 Hongo fitopatógeno <i>Alternaria</i> sp.....	13
2.5.1 Características principales.....	13
2.5.2 Condiciones de desarrollo.....	13
2.6 Mecanismos de infección de <i>Alternaria</i> sp.....	15
2.6.1 Sintomatología ocasionada por <i>Alternaria</i> sp.....	15
2.7 Principales especies afectadas por <i>Alternaria</i> sp en Ecuador.....	15
2.7.1 Impacto Económico generado por afectaciones ocasionadas por <i>Alternaria</i> sp.....	16
2.8 Pruebas <i>in vitro</i> para el biocontrol de <i>Alternaria</i> sp.....	17
2.8.1 Pasos para análisis <i>in vitro</i>	17
2.8.2 Antibiosis.....	18
2.8.3 Competencia.....	18
2.8.4 Inducción de resistencia.....	18
2.8.5 Explotación.....	19
2.8.6 Lisis.....	19
3. Materiales y métodos.....	20
3.1 Pruebas termorresistencia (termoterapia) y microscópicas.....	20
3.1.1 Tinción Gram.....	21
3.1.2 Tinción de endosporas.....	22
3.2 Siembra de cepas de interés.....	23
3.3 Producción de metabolitos.....	23
3.3.1 Medio de fermentación y cultivo bacteriano.....	23
3.3.2 Montaje de biorreactor.....	24

3.3.3	Extracción de metabolitos	24
3.4	Pruebas de antagonismo (Enfrentamiento y Antibiograma)	24
3.4.1	Antibiograma	24
3.4.2	Enfrentamiento	25
3.5	Análisis Estadístico	27
4.	Resultados esperados y discusión	28
4.1.1	Termoterapia.....	28
4.1.2	Validación microscópica.....	29
4.1.3	Pruebas de antibiosis (Antibiograma).....	30
4.1.4	Porcentaje de inhibición (Enfrentamientos).....	34
5.	Conclusiones	39
6.	Recomendaciones.....	39
7.	Bibliografía.....	40
8.	Anexos.....	45

Índice de figuras

Figura 1. Ciclo formación de endosporas	6
Figura 2. Metabolitos de interés.....	7
Figura 3. Partes comunes de un biorreactor	11
Figura 4. Tipos de biorreactores	12
Figura 5. Ciclo de vida <i>Alternaria</i>	14
Figura 6. Toma de muestras (A); Siembra(B); Caracterización(C); Proliferación(D); Prueba antagónica Antibiograma(D).....	18
Figura 7. Termoterapia, A) Toma de bacteria, B) Inoculación de bacteria, C) Preparación para termoterapia, D) Termoterapia en baño maría, E) Siembre de bacteria, F) Verificación de crecimiento.....	20
Figura 8. Tinción Gram.....	22
Figura 9. Tinción Verde brillante (A. Toma de muestra, B. Colocación verde brillante, C. Papel filtro encima de verde brillante, D. Fijación a la llama, E. Colorante de contraste.).....	23
Figura 10. Esquema de los enfrentamientos	26
Figura 11. Viabilidad tras termoterapia	28
Figura 12. A. Tinción Gram, forma bacilar y Gram+ (color morado), B. Azul de lactofenol, se observa conidios, conidióforos y vesículas. Además en C. se observa hifa.	29
Figura 13. Resultado tinción verde brillante	30
Figura 14 Resultados siembra en punto A. Testigo día 3, B. Testigo día 1	34

Índice de tablas

Tabla 1. Principales huéspedes de <i>Alternaria</i> sp.	16
Tabla 3. Resultados antibiosis bacterias F1	32
Tabla 4. Resultados antibiosis bacterias F2	33
Tabla 5. Diámetros de <i>Alternaria</i> sp en enfrentamientos después de 3 días	35
Tabla 6. Resultados % de Inhibición	35
Tabla 7. Análisis de la varianza tratamientos	36
Tabla 8. Medidas de resumen para las diferentes cepas	37
Tabla 9. Prueba Tukey (5%)	37

Índice de ecuaciones

Ec.1. Porcentaje de inhibición.....	25
Ec.2. Diámetro promedio del testigo.....	25
Ec.3. Diámetro de patógeno con bacteria.....	25

Índice de anexos

Anexo 1 Siembra de cepas de interés (<i>Bacillus</i> y <i>Alternaria</i> sp.)	45
Anexo 2. Biorreactores de tipo Bach Aireado	45
Anexo 3. Extracción de Metabolitos	46
Anexo 4. Antibiograma	46
Anexo 5. Enfrentamientos	47
Anexo 6. Antibiosis positiva	49
Anexo 7. Enfrentamientos duales Parte 1	50
Anexo 8. Enfrentamientos duales Parte 2	51

1. Introducción

Alternaria sp, es un hongo fitopatógeno que se caracteriza por causar alteraciones en las funciones fisiológicas de las especies vegetales que afecta, donde puede generar una obstrucción y alteración en los diferentes órganos por el cual ingresa, y tras la muerte de la planta el hongo permanece en el suelo con el fin de producir una infección en un nuevo huésped, entre los productos agrícolas con mayor afección están los de tipo frutales, hortalizas y ornamentales (Collaguazo & Tenorio, 2018).

Para el caso particular de *Alternaria* sp, su mecanismo de acción está relacionado a la producción de toxinas que ingresan al sistema vascular hasta afectar partes aéreas del huésped y por último su muerte (Collaguazo & Tenorio, 2018). Además, se conoce que no solo afecta a especies vegetales en el cultivo sino también a frutos en procesos de postcosecha como los cereales, ornamentales, oleaginosas, frutales y vegetales, en estos últimos de mayor interés debido a que en el Ecuador uno de los productos más afectados es el brócoli, donde de acuerdo con Ñacato & Valencia (2016), en temporadas de lluvias la afectación de la producción de brócoli alcanza un 30% en pérdidas de pellas de brócoli.

El hongo se caracteriza por tener especies saprófitas, ya que se encuentran en el suelo y en tejidos vegetales en descomposición, pero la gran problemática es su capacidad de producción de micotoxinas. De acuerdo con Macías (2020), puede producir más de 70 tipos, contaminantes de productos agrícolas, implicando una posible toxicidad para los consumidores, además de producir toxinas de tipo específicas resaltando aquellas toxinas selectivas para diferentes huéspedes.

Actualmente se conoce que el tratamiento de control de patógenos está basado en el uso de compuestos químicos, debido a que resultan más fáciles de aplicar y adquirir, sin embargo el denominado manejo integral de plagas y enfermedades ha ido estableciendo alternativas en el control de patógenos, incluso desde principios del siglo XIX, donde destaca el uso de agentes de control biológico (Villarreal, y otros, 2018), mostrando algunos beneficios de gran interés con respecto a los químicos empleados, por otro lado debido a que la microbiota propia de los suelos presenta una amplia gama de microorganismos, entre los cuales pueden existir aquellos capaces de actuar como agentes de control contra microorganismos de tipo patógeno (Valenzuela y otros, 2021).

Es así que se considera a las bacterias del género *Bacillus* como interesantes agentes de estudio dado que forman parte de la microbiota del suelo donde se desarrollan y tendrían un papel fundamental

para el control biológico debido a que producen metabolitos biológicamente activos, también por la cualidad de termorresistencia que permite la formación de endosporas, resultando en una ventaja para procesos donde existen aumentos de temperatura, un ejemplo de esto son los procesos de fermentación para elaboración de bioinsumos (Cuaspa, 2022). Dichos metabolitos de tipo secundarios presentan una acción reductora o inhibidora del desarrollo de patógenos, además de otras funciones dadas por mecanismos específicos de los cuales se destacan: la producción de lipopéptidos, sideróforos, enzimas líticas, toxinas, compuestos orgánicos volátiles (COV) e inducción de resistencia sistémica de la planta (Villarreal, y otros, 2018).

Los mecanismos específicos empleados por bacterias del género *Bacillus* resultan de gran interés, por ejemplo la producción de lipopéptidos que son capaces de generar poros en las células propias del microorganismo patógeno, llevando a una alteración en la presión osmótica, así lo establecen Valenzuela y otros (2021) en su trabajo. Otro estudio de gran interés es el realizado por Sarti (2019), donde establece que se puede dar paso a la formación de una especie de película a modo de capa protectora de las bacterias denominada Biofilm, en donde ocurre la producción de metabolitos inhibidores de patógenos.

Tanto en Ecuador como a nivel mundial uno de los sectores de mayor influencia e importancia a nivel económico y social es el sector agrícola, cuya actividad es fundamental debido a que se considera que alrededor del 80% de los alimentos consumidos son producto de esta actividad, donde el 20-30% de la producción anual sufre afectaciones por plagas y enfermedades ocasionadas por hongos (Velásquez, 2018) ,y no solo en este sentido sino además algunas toxinas producidas por *Alternaria* sp pueden presentarse en algunos alimentos generando problemas de salud severos, como es el caso del cáncer, se conoce que esta afección es producto de mutaciones en un tipo de genes, a breves rasgos estas toxinas producidas por el hongo fitopatógeno generan mutagenicidad celular que da como resultado la activación de oncogenes produciendo así esta enfermedad (Macías, 2020).

Por lo mencionado anteriormente nace el interés para la elaboración del presente trabajo, con el fin de estudiar, buscar y establecer alternativas de control biológico, principalmente enfocadas en el estudio de microorganismos que puedan ser de gran ayuda para el control de especies de tipo patógenas y más aún que formen parte de la microbiota propia del suelo en el cual se presenta los problemas relacionados a *Alternaria* sp, partiendo de un banco de cepas aisladas de bacterias que pueden presentar un alto potencial en el control biológico planteando una alternativa dirigida hacia un tratamiento diferente al convencional de tipo químico evitando así problemas a la salud de las personas, como a aquellos relacionados al medio ambiente hablese de suelo, agua y aire.

Además es importante caracterizar las bacterias del banco a fin de determinar aquellas del género *Bacillus* que resulten de interés en el control biológico, por medio de técnicas microscópicas como son tinción Gram y tinción de endosporas, además de verificar el potencial en la producción de metabolitos secundarios, mediante la aplicación de biorreactores de tipo simples aireados y consecuentemente el potencial biocontrolador a través de procedimientos in vitro como son el antibiograma verificando la formación de halos de inhibición y los enfrentamientos duales donde el crecimiento radial permitirá la determinación del porcentaje de inhibición de tal manera que sea posible establecer alternativas tanto para la producción de metabolitos en bacterias del género *Bacillus*, y para la determinación de las mejores cepas de utilidad en lo que respecta al control de *Alternaria* sp.

2. Fundamentación teórica

2.1 Controladores Biológicos

El control biológico como su nombre lo indica se define como el empleo de organismos vivos para el control o eliminación de plagas y enfermedades, donde el manejo integrado de plagas y enfermedades (MIP), cuenta con un gran número de tácticas para dicho control sin embargo ha establecido como alternativa el uso de agentes de control biológico, una técnica utilizada desde principios del siglo XIX y ha demostrado tener un menor impacto a nivel ambiental y de contaminación del suelo en comparación con los tratamientos químicos usualmente empleados (Villarreal, y otros, 2018). Estos agentes son los denominados controladores biológicos, y constituyen especies de microorganismos que son capaces de reducir o inhibir totalmente el desarrollo de otro en este caso un patógeno de interés.

2.2 El género *Bacillus*

Pertenecen al reino bacteria, filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales y familia Bacillaceae; se conoce de este género ya más de 100 años el primer reporte radica al año 1873, donde se caracterizó a la misma debido a su capacidad de producción de endosporas y termorresistencia (Cuaspa, 2022). Se conocen más de 300 especies, sin embargo, dentro de este amplio grupo se tienen: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thurigiensis*, *Bacillus sphaericus* y *Bacillus subtilis* de mayor interés; su gran distribución mundial es debido a las endosporas, resultando de gran importancia debido a que les otorga resistencia y potencia su aislamiento en gran diversidad de hábitats incluso en condiciones extremas (Villarreal, y otros, 2018).

Por otro lado, se sabe que este género de bacterias encuentra como principal reservorio el suelo, esto se establece debido a que las bacterias del género *Bacillus*, son saprófitas por su capacidad de utilizar una amplia gama de sustratos orgánicos presentes en los suelos esto ha llevado a que exista una variabilidad genética y de tipo funcional de especies en los suelos muy amplia. Por consiguiente se puede mencionar que en su mayoría se establecen o a su vez existe una mayor presencia de bacterias de este género en la zona rizosférica de los suelos (Bustamante, 2015), es importante mencionar por otro lado que existen investigaciones escasas relacionadas a la diversidad y dinámica del género *Bacillus*, donde en el caso de la rizosfera va a depender en su mayoría de los exudados radiculares de las especies vegetales presentes y de la fertilidad del suelo, de tal manera que sería interesante el estudio de este género a fin de establecer relaciones asociativas, o relaciones simbióticas que resultarían de gran ayuda en el control biológico (Villarreal, y otros, 2018).

2.2.1 Características principales

La caracterización del género *Bacillus* se establece en base a su tipo de desarrollo, tinción Gram, morfología, movilidad y tamaño en donde de acuerdo con Villarreal y otros (2018), las bacterias de

este género pueden tener un crecimiento en su mayoría aerobio, sin embargo en ocasiones pueden presentarse aquellas que se desarrollan en forma anaerobia facultativa, en el caso de la tinción son Gram positivas, en su morfología bacilar (delgada, alargada como una barra o bastón), su movilidad se da por flagelos por último se menciona que presentan un tamaño de entre 0,5 y 10 micrómetros (um).

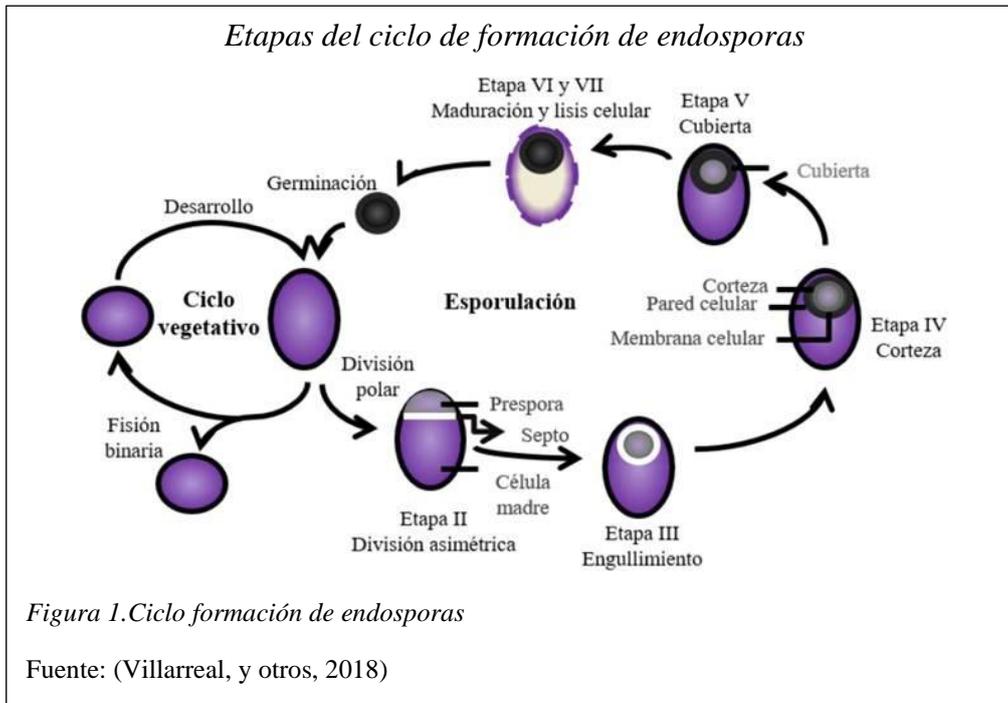
2.2.2 Condiciones de desarrollo

En cuanto a su desarrollo hay que considerar algunos factores físicos de los suelos, donde el valor óptimo de pH es neutro es decir entre valores de 6 a 7, en cuanto a la temperatura suele ser un poco amplio el rango sin embargo se ha establecido que en su mayoría las especies son mesófilas, es decir que la temperatura de desarrollo puede ir de entre 30 y 45°C. Algo importante a destacar es que en su desarrollo estas bacterias son capaces de producir endosporas ya sean de tipo ovales o cilíndricas, se tratan de células especializadas, de tipo somáticas que son producidas en bacterias en su mayoría Firmicutes, estas les otorga resistencia a diferentes condiciones de estrés, de tal manera que pueden ser capaces de diseminarse y permanecer por mucho más tiempo en el ecosistemas en el que se encuentren ya que las endosporas permanecen viables hasta que existan las condiciones favorables para el desarrollo de las bacterias (Villarreal, y otros, 2018).

2.2.3 Ciclo de desarrollo

Es importante considerar en el caso de la formación de endosporas, el ciclo que ocurre para que se de esta producción, tiene lugar en la segunda fase del ciclo de vida, esto debido a que existe dos fases la primera denominada vegetativa y otra de esporulación teniendo lugar de la siguiente manera: La primera etapa consiste en el crecimiento mediante fisión binaria es decir se da de forma exponencial esto siempre y cuando se tenga las condiciones adecuadas. Para el caso de la segunda etapa, va a tener lugar debido a un factor de estrés que obligue a la bacteria a sobrevivir, estos factores pueden variar, entre los más comunes están: densidad poblacional alta, nutrientes escasos, salinidad, temperatura y pH (Boundless, 2022).

Posterior a esto las células producidas en la fase vegetativa inician la formación de endosporas, basada en una división celular de tipo asimétrica que da lugar a la formación de una célula madre y la inserción de una denominada preespora, misma que es tragada y da paso a la formación de una célula pero al interior de la celular madre (Villarreal, y otros, 2018). Se da paso a un recubrimiento de la preespora, una deshidratación y una maduración; punto en el cual la célula madre sufre una lisis por muerte celular programada liberando la endospora como paso final del proceso así se muestra en la Figura 1.



2.3 *Bacillus* spp. como controladores biológicos

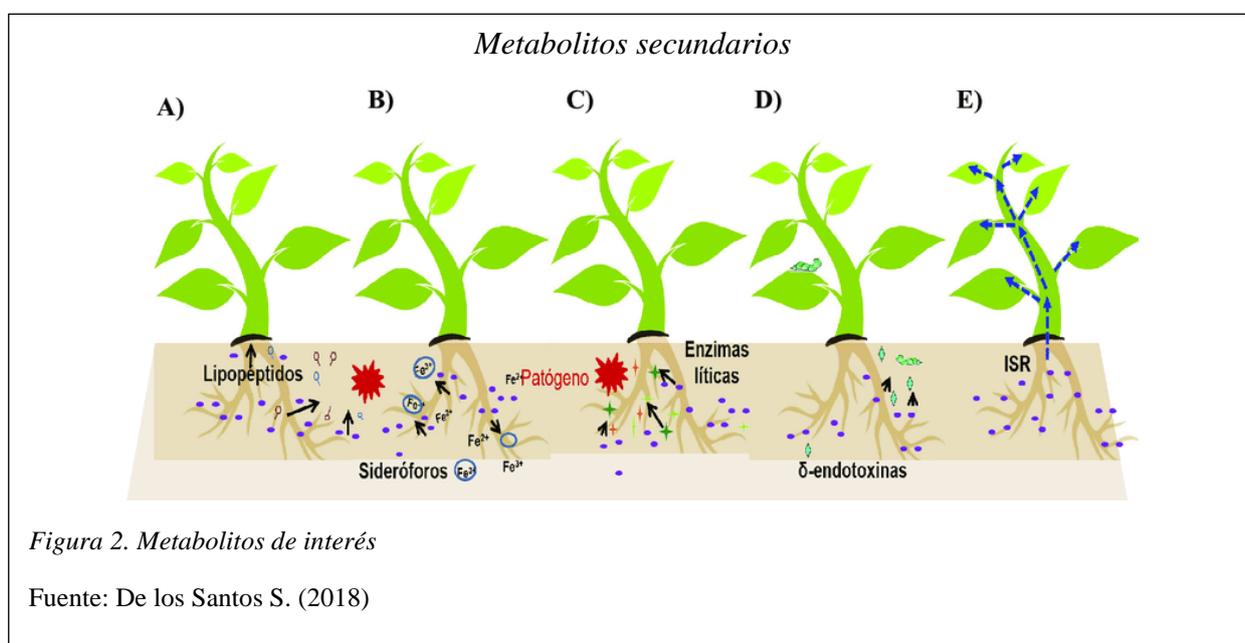
Una gran variedad de especies del género *Bacillus*, producen un amplio número de sustancias con acción antimicrobiana, donde se resalta a *B. subtilis*, que produce metabolitos que tienen un amplio espectro en la acción antifúngica y antibacteriana frente a un gran número de patógenos (Soria, Alonso, & Bettucci, 2022). Por otro lado, existen algunos mecanismos de acción y producción de sustancias biológicamente activas que tiene lugar gracias a la biodiversidad genética de este género (BOCANEGRA, 2021), permitiendo el estudio de su función antagonista para reducir el crecimiento y propagación de fitopatógenos cuyo origen fue gracias a la actividad insecticida de proteínas Cry producidas por la especie *B. thuringiensis*, por lo que actualmente se estudian un gran número de especies para el sector agrícola (Villarreal, y otros, 2018).

Además, debido a la formación de las endosporas puede resultar de interés para la elaboración de productos de tipo biotecnológico, basado en cepas de este género algo que sin lugar a duda sería de gran ayuda para el control biológico debido a la resistencia a la desecación y calor (Villarreal, y otros, 2018). Un ejemplo de esto es la elaboración de biopesticidas basados en *Bacillus*, debido al factor de toxicidad que este tipo de producto genera frente a diferentes plagas y enfermedades, además de ser inocuos para los humanos, se establece además que alrededor de 90% del mercado mundial utiliza este tipo de bioinsumos (Millas & Tapia, 2020), donde un mayor porcentaje es el relacionado a la bacteria *Bacillus thuringiensis*, cuyo uso empezó con su producción en el año 1938, y hasta la actualidad con un número considerable de productos se conoce alrededor de 30 o más aunque en su mayoría de tipo insecticidas sin embargo no se descarte su utilidad en el control microbiano.

2.3.1 Mecanismos de acción de control biológico

Como se ha mencionado el género *Bacillus*, resulta de interés debido a su actividad antimicrobiana, y no solo eso sino que dada su capacidad esporulante, favorece a su producción y almacenamiento a modo de “bioinoculante” a largo plazo, y por su desarrollo en diferentes sistemas ya sea agua, suelo o planta mayor con respecto a la mayoría de microorganismos (Valenzuela y otros, 2021), sin embargo es importante considerar que a su vez tiene un papel fundamental en lo que respecta a antagonismo, esto debido a los estudios relacionados a su acción como insecticida, sin embargo en cuanto al efecto antagónico, este ocurre por otro tipo de mecanismos, entre los cuales se incluye los siguientes: Excreción de antibióticos; producción de sideróforos, enzimas líticas, toxinas e inducción a resistencia sistémica (ISR) (Villarreal, y otros, 2018).

2.3.1.1 Metabolitos secundarios de interés



A) Antibióticos

Generalmente el género *Bacillus* tiene una alta capacidad en la producción de un gran número de antibióticos que permiten la inhibición del desarrollo de los patógenos, sin embargo los más estudiados son los lipopéptidos cíclicos de tipo no ribosomales cuya composición es un péptido cíclico, con una cadena de ácido graso que puede ser β -hidroxi o β -amino, dichos compuestos son sintetizados por NRPS (sintetasas de péptidos no ribosomales) independientes de RNAm, se clasifican en tres familias: iturinas, fengicinas y surfactinas (Villarreal, y otros, 2018). Estos lipopéptidos se relacionan debido a la interacción con la membrana plasmática fúngica, ya que son capaces de crear poros en la membrana celular de los microorganismos patógenos, ocasionando cambios en la presión osmótica de la célula e

induciendo a la muerte celular (Saldaña, 2021). Además de que pueden tener relación con los procesos de homeostasis intracelular de calcio, metabolismo energético e incluso en el procesamiento del ARN, por lo que resultan de gran interés en lo que respecta a el control de fitopatógenos de tipo fúngico.

B) Sideróforos

Se sabe que el hierro es un componente de gran importancia para el desarrollo de las funciones celulares en muchos microorganismos por lo que está relacionado a reacciones de tipo redox, en reacciones enzimáticas y además en la cadena de transporte de electrones. Es por esta razón que la disponibilidad del mismo es un factor fundamental en el desarrollo de los microorganismos, no obstante se sabe que en la naturaleza el hierro se encuentra como Fe^{3+} , dando como resultado un obstáculo para el uso por parte de los seres vivos, por tal razón algunos microorganismos han desarrollado estructuras proteicas, de bajo peso molecular y afines con el hierro en su forma férrica, de tal manera que se facilita la captación de Fe^{3+} a estas estructuras se las conoce como sideróforos (Villarreal, y otros, 2018). Ahora bien a estas estructuras se las denomina además como quelantes y estas son producidas por bacterias del género *Bacillus*, por lo que en términos generales secuestran los iones de hierro presentes ocasionando que exista una baja disponibilidad para otros microorganismos como es el caso de los hongos, debido a que este compuesto es indispensable para su metabolismo, por lo que los metabolitos secundarios de tipo sideróforos resultan muy importantes para la inhibición del desarrollo de microorganismos patógenos (Saldaña, 2021).

C) Enzimas líticas

Se conoce que la pared celular de las especies fúngicas está compuesta en su mayoría por glicoproteínas y polisacáridos además de otros componentes sin embargo en su mayoría con alrededor del 80% por polisacáridos que comprende una relación en cuanto a quitina y glucano en proporción 10:70 o 20:60 respectivamente, componentes que le otorgan la resistencia a la pared celular de los hongos (Villarreal, y otros, 2018). Ahora bien estudios demuestran que las bacterias del género *Bacillus* son capaces de producir enzimas líticas, como es el caso de las glucanasas y quitinasas que como su nombre lo indica degradan los polisacáridos quitina y glucano por hidrólisis de enlaces glucosídicos de tal manera que la pared celular del patógeno es degradada produciendo la muerte celular y por último erradicando su desarrollo por completo (Saldaña, 2021).

D) Toxinas

El género *Bacillus* produce más de 300 toxinas, las cuales en su mayoría se ha reportado que son producidas por una especie en particular y es el caso de *B. thuringiensis*, las cuales se dividen en dos grupos las Cry y Cyt que es para insectos, dípteros y mamíferos

respectivamente (Bocanegra, 2021). Dichas toxinas de tipo δ -endotoxinas son cuerpos paraesporales proteicos cuya formación ocurre en la fase de esporulación, además su gran número de toxinas, se divide a los Cry y Cyt con 73 y 3 familias respectivamente donde su nombre viene por cristal y citolítica debido a que la primera forma una estructura oligomérica que ocasiona un desequilibrio osmótico para una posterior muerte celular y para el segundo caso en el proceso de citólisis en dípteros y mamíferos (Villarreal, y otros, 2018).

E) ISR (Resistencia Sistémica Inducida)

Debido a las diferentes etapas evolutivas que han pasado las especies vegetales han generado mecanismos de defensa, cuando ocurre una invasión de diferentes fitopatógenos o plagas, estos se activan cuando existen interacciones específicas con los diferentes patógenos a estos mecanismos hoy en día se lo conoce como resistencia sistémica adquirida (SAR). Este sistema se activa por estímulos que son captados por dos tipos de receptores PRRs (receptores de reconocimiento patrón) y NB-LRRs (Repetición rica en leucina de unión a nucleótidos) (Villarreal, y otros, 2018). Donde el primero reconoce componentes como la quitina de los hongos o flagelina, ahora bien si el patógeno evita la primera línea de defensa PTI (Inmunidad activada por PAMP), se produce la segunda línea de defensa por el segundo receptor que reconoce proteínas efectoras de virulencia. Finalmente la resistencia sistémica inducida (ISR) se lleva a cabo por las bacterias del género *Bacillus* por medio de la producción MAMPs, COVs, sideróforos y lipopéptidos de tal manera que la planta reconoce estos compuestos e inicia el proceso de resistencia sistémica por estímulos en la PTI (Pedraza, López, & Uribe, 2020).

F) COVs

Además de lo mencionado anteriormente también se sabe que existe la producción de compuestos orgánicos volátiles (COVs), que son moléculas de bajo peso molecular, a este grupo pertenecen los alcoholes, aldehídos, cetonas, hidrocarburos, terpenos, entre otros; que de cierta forma son una especie de mediadores en lo que representa a la comunicación entre especies, por ejemplo planta-planta, planta-herbívoro, planta-microorganismo e incluso entre microorganismos (Pedraza, López, & Uribe, 2020), es decir para el caso de planta-microorganismos, este último produce COVs que son captados por la planta e induce una respuesta que favorece a la protección frente a un patógeno.

2.4 Producción de metabolitos en bacterias del género *Bacillus* a escala o nivel de laboratorio.

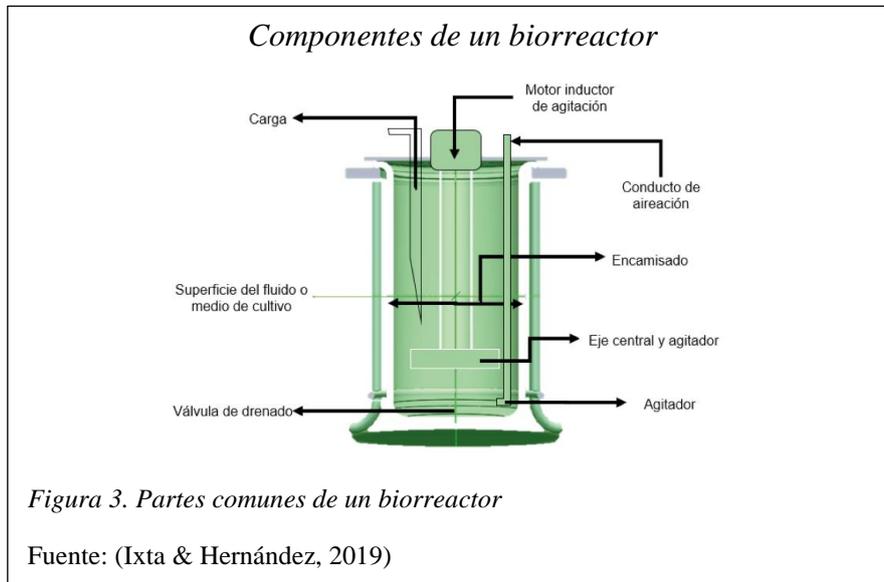
Con el paso del tiempo se ha buscado la forma en que se logre una producción a gran escala de especies microbianas o sus metabolitos debido a su amplia variedad de utilidades y aplicaciones en los diversos campos industriales con el fin de aprovechar cierta materia prima convirtiéndola en materia valiosa a estos procesos se les denomina bioprocesos que en su mayoría corresponden a procesos biotecnológicos. En los procesos comúnmente empleados existen muchas limitaciones para el desarrollo de los microorganismos a gran escala, es por esta razón que surgen y hace más de medio siglo los biorreactores con el propósito de controlar con mayor precisión los ambientes de desarrollo de cultivos vivos (Serrat & Méndez, 2015).

2.4.1 Biorreactores

Los biorreactores surgen de los conocimientos de la ingeniería y la biotecnología es el lugar donde convergen los mismos sin embargo ya hablando más en términos relacionados a los microorganismos, un biorreactor es un equipo o dispositivo diseñado con el fin de proporcionar energía, nutrientes a su vez permite el control de las condiciones y constantes en los procesos fisicoquímicos ya sean estos, agitación, aireación, pH, temperatura de tal manera que se genere un ambiente óptimo para el desarrollo microbiano (Serrat & Méndez, 2015). Sin embargo el biorreactor además de proporcionar las condiciones óptimas de desarrollo y el metabolismo celular de un sistema biológico, para la selección del biorreactor dependerá de este, además de su sistema de reacción, metabolismo, expresión de metabolitos y requerimiento celular en el entorno propio (Collaguazo G. A., 2022).

2.4.1.1 Componentes de un biorreactor

Los componentes que conforman un biorreactor van a depender del tipo de biorreactor sin embargo hay aquellos que son más comunes entre los que encontramos, la fuente de alimentación o carga, un agitador que es movido por un motor, un conducto de aireación, medio de cultivo, un encamisado y una válvula que permite el drenado, el esquema se muestra en la Figura 3.



2.4.2 Tipo de biorreactores

Es importante considerar que existen muchas clasificaciones de los biorreactores depende de la finalidad principalmente son empleados en procesos fermentativos más comúnmente se los puede clasificar por su forma de operación y la basada en el tipo de estructura y partes que lo conforman, a continuación se presenta las dos clasificaciones:

2.4.2.1 Por su operacionalidad

➤ Batch o Discontinuo

Se le denomina de esta forma al tipo de biorreactor en el cual se cultivan los microorganismos en un volumen determinado de medio, pero en este no existe una entrada o salida de flujo por lo que el proceso realizado por este tipo de biorreactor es discontinuo y termina cuando el medio de cultivo se agota, en este tipo existen muchas limitaciones sin embargo se puede proporcionar agitación de tratarse de un reactor anaerobio (Martinez, 2019).

2.4.2.2 En cuanto a su conformación

➤ Tanque agitado

Es el tipo de biorreactor más utilizado, en especial para proceso de fermentación por microorganismos aerobios, su nombre se debe a que en su conformación cuenta con un sistema de agitación automatizado, además de un sistema de aspersion de aire, lo que le permite un funcionamiento en el que al ingresar el aire por la parte inferior, el agitador rompe las burbujas producidas y da una mezcla homogénea para que todo el medio de cultivo se mantenga aireado, los agitadores más empleados son de tipo radial y axial, sin embargo se da la formación de

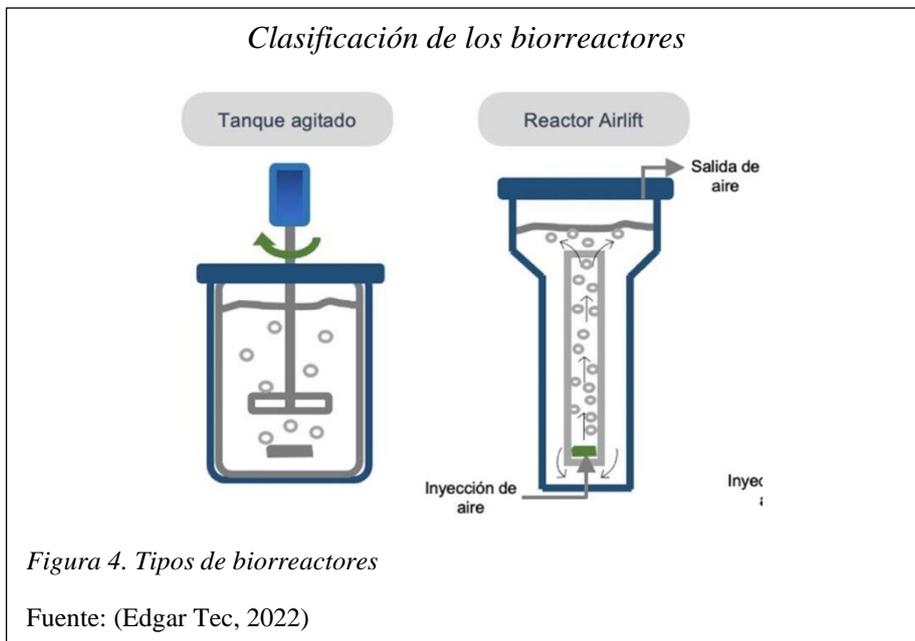
vórtices que no permiten una buena mezcla por lo que es posible la implementación de deflectores que optimizan esta mezcla (Romero, 2016).

Una de las mayores ventajas de este tipo de biorreactor es la alta eficiencia en la transferencia de oxígeno y su utilidad para el trabajo con fluidos viscosos y como desventaja el esfuerzo cortante y calor generado por el sistema de agitación que puede afectar a el desarrollo de los microorganismos (Romero, 2016).

➤ Air-Lift y Air-Lift con lazo externo

Son muy similares a los biorreactores de columna de burbujeo, pero a diferencia de estos, cuentan con un tubo central el cual tiene un aspersor que controla la circulación del aire del medio, además cumple un papel importante al separar el biorreactor en dos zonas, una de tipo ascendente y otra descendente en esta última no existe circulación de aire. Incluso se puede dar un aislamiento de estas zonas mediante tuberías interconectadas en el exterior a este sistema se lo llama Air-Lift con lazo externo (Romero, 2016).

Estos biorreactores son considerados energéticamente más eficientes tanto frente a los de tanque agitado como a los de columna de burbujeo, y más aún en aquellos cultivos sensibles a los esfuerzos cortantes, hay que considerar que en este tipo de biorreactores existe una alta formación de espuma (Romero, 2016).



2.5 Hongo fitopatígeno *Alternaria* sp

Alternaria es un hongo fitopatígeno, que se caracteriza por afectar una amplia variedad de especies vegetales, sin embargo, estudios establecen que están más relacionados a especies del género *Brassica*, afectando especies como el brócoli o la coliflor, además de algunas especies del grupo de los cítricos, este es el caso del limón. Este patógeno tiene una mayor incidencia y causa mayores problemas en especies vegetales jóvenes, siendo en estos más severos en comparación con ocasionados en plantas adultas (Collaguazo & Tenorio, 2018). Los mecanismos de infección de los fitopatógenos pueden ser variantes, no obstante para el caso de *Alternaria* se caracteriza por la producción de toxinas, dado a sus cualidades propias son capaces de ingresar al sistema vascular de las plantas, estas son atacadas y debido a que este sistema se dirige a todas las zonas de la planta huésped existe una afectación generalizada en la mayoría de los órganos (Saldaña, 2021).

2.5.1 Características principales

Existe un gran número de especies pertenecientes al género *Alternaria*, se conoce más de cien especies y en su mayoría se los puede encontrar en suelos con alta carga de materia orgánica, además en sitios con material en descomposición e incluso en el aire por lo que su desarrollo es de tipo saprofito (Rivas & Mühlhauser, 2014). Entre las características más relevantes están que son hongos de tipo filamentoso, filo Ascomycota, del grupo de los dematiáceos cuyos conidióforos son de tipo simple, de forma tabicadas o a su vez alargadas o ovoides, además en cuyos extremos pueden generar cadenas largas y ramificadas con presencia de conidios de coloración café pardo, de tamaños de entre 20-93x 9-18µm de múltiples formas y con septos verticales y transversales, por último en el caso de las hifas estas son septadas y con color, las colonias se caracterizan por presentar una coloración blanca algodonosa al inicio, pero conforme transcurre el tiempo cambia a una coloración negra al igual que el reverso (Guerra, 2018).

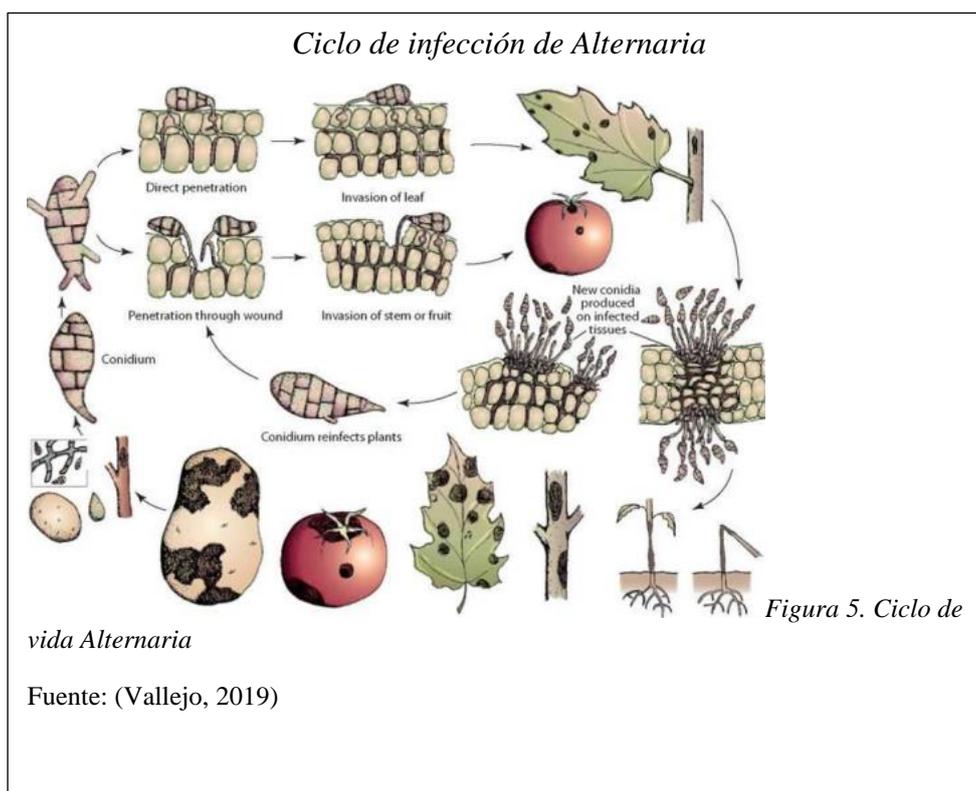
2.5.2 Condiciones de desarrollo

Para el desarrollo de este tipo de hongos es necesario de condiciones ambientales favorables, estas suelen ser en climas húmedos y cálidos, lluvia y viento, y sobrevive en los tejidos enfermos. (Terra, 2022). Por lo que las condiciones óptimas estarían fundamentadas principalmente en factores como temperatura y humedad, en cuanto al primero se conoce que existe un mejor crecimiento de *Alternaria* en temperaturas de entre 22 y 28°C, pero se establece además que 25°C sería la temperatura óptima, no obstante existen reportes de que puede incluso crecer en temperaturas de entre -3°C- a 35°C, en el caso de la humedad se establecen valores entre 88- 90% que serían los valores óptimos para el crecimiento de este hongo (Pavón, González, Martín, & García, 2015). Por último, en cuanto a las

condiciones de desarrollo en laboratorio se emplean medios de cultivo que le otorgan un crecimiento rápido estos son Sabouraud Dextrosa Agar (SDA), Patata Dextrosa Agar PDA y Agar Harina de maíz, cuyas condiciones de incubación están establecidas a una temperatura óptima de 25°C (Rivas & Mühlhauser, 2014).

2.5.2.1 Ciclo de vida *Alternaria sp*

Usualmente el ciclo de vida de *Alternaria* inicia con la infección de la semilla continúa tras la germinación de la misma y posterior desarrollo vegetativo de la planta esto debido a sus conidios, los cuales son transportados por mecanismos como el agua o el viento, en el caso del agua salpicada, de tal manera que se trasladan al huésped, posteriormente a esto en alrededor de unos 45 días tras la siembra en campo se manifiesta la infección, en donde en 7 días posteriores se empieza la producción de esporas que reiniciarán el ciclo de la enfermedad (Collaguazo & Tenorio, 2018). Sin embargo debido a que los conidios permanecen viables por un largo tiempo, pueden ocasionar la infección a las semillas, y posteriormente si existen las condiciones adecuadas de humedad y temperatura estas semillas germinarán y las plántulas producto de estas semillas infectadas empezarán a crecer pero tendrán una alta probabilidad de ser atacadas en la zona del hipocótilo por lo que existe una reducción del crecimiento y presenten lesiones oscuras, esto se debe a que este tipo de hongo absorbe los nutrientes de tejidos superiores ocasionando una muerte celular ocasionada por toxinas y por ende una descomposición de los tejidos y muerte de la planta, tras la muerte las esporas del hongo permanecen en el suelo y pueden ser diseminadas para un nuevo proceso de infección como se muestra en la Figura 5.



2.6 Mecanismos de infección de *Alternaria* sp

Es importante considerar que para que ocurra la infección de *Alternaria* se deben cumplir algunas condiciones como son la humedad en valores de un 50%, y temperaturas de entre 20 a 27°C. Algo importantes es la susceptibilidad del huésped misma que puede estar influenciada por factores como: tejidos afectados por el sol, senescentes, heridas y daños por el ambiente o insectos lo que hacen que el huésped sea más susceptible a la infección por este hongo (Herrera, 2016).

Alternaria tiene como mecanismos de infección la transmisión a través de semillas, viento y material vegetal infectado presente en el suelo, este último el más común. Para el caso de la semilla puede presentar una contaminación interna o externa, las conidias son la principal responsable de la reinfección o transmisión ya que son capaces de permanecer viables por largos periodos de tiempo mismas que a su vez pueden ser transportados por el viento (Jiménez, 2022). Si se presentan las condiciones adecuadas de humedad y temperatura, las conidias penetran los tejidos de la planta huésped, iniciando su mecanismo de patogénesis dado por dos etapas, en la primera se da una inyección de toxinas que generan muerte celular, generando así el daño a los tejidos hasta matarlos, para que en la segunda etapa por medio de enzimas se rompan estos tejidos lo que inhibe el proceso de división celular (Herrera, 2016).

2.6.1 Sintomatología ocasionada por *Alternaria* sp

Su sintomatología, y acción producida se caracteriza por afectaciones iniciales estas ocurren en tallos, hojas y frutos; en tallos se presentan manchas de formas ovaladas, de color marrón rojizo, en cuyo centro presenta una coloración grisácea o blanquecina, en hojas manchas redondas de color café oscuro o negro, con la particularidad de presentar un halo de color amarillo, mismo que permanece hasta que en la hoja queda un orificio, por último en frutos en el cáliz o pedúnculo lesiones de color café oscuro (Collaguazo & Tenorio, 2018). De igual forma puede llegar a afectar a plántulas, debido a que reduce el flujo de nutrientes de la planta, dando un crecimiento lento y causando la muerte del huésped, esto además puede ser ocasionado en plantas adultas debido a que *Alternaria* afecta a tal medida las áreas foliares que destruyen los tejidos y por ende una reducción considerable en el potencial fotosintético (Azanza, 2022).

2.7 Principales especies afectadas por *Alternaria* sp en Ecuador

De acuerdo con Jiménez (2022), *Alternaria* tiene un amplio número de huéspedes y algunos de estos de gran importancia a nivel del Ecuador entre los que se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Principales huéspedes de *Alternaria* sp.

Nombre Común	Nombre Científico
Cebolla	<i>Allum cepa.</i>
Ajo porro	<i>Allum porrum L.</i>
Acelga	<i>Beta vulgaris</i> var. <i>Cicla</i>
Coliflor	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Botrytis</i>
Col	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Capitata</i>
Espinaca	<i>Spinacia oleracea</i>
Col china	<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>Pekinensis</i>
Pimiento	<i>Capsicum annuum</i>
Pepino	<i>Cucumis sativus</i>
Lechuga	<i>Lactuca sativa</i>
Tomate riñón	<i>Solanum lycopersicum</i>
Habichuela	<i>Phaseolus vulgaris</i>
Perejil	<i>Petroselinum crispum</i>
Berenjena	<i>Solanum melongena</i>
Rosas	Rosa
Brócoli	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>Itálica</i>

Fuente: (Los Autores 2023)

2.7.1 Impacto Económico generado por afectaciones ocasionadas por *Alternaria* sp

Muchas de las especies mencionadas anteriormente son de gran importancia económica debido a que son productos de exportación sin embargo, anualmente se ve afectada por enfermedades de tipo fúngico afectado hasta el 30% de la producción.

2.7.1.1 Sector Florícola

Para el caso del Ecuador el sector florícola es uno de los más importantes ya que forma parte de la segunda mayor fuente de ingresos del Ecuador de tipo no petroleros que alcanza ingresos muy altos de hasta \$700 millones anuales, que pueden verse afectados en mayor medida por un gran número de plagas y enfermedades entre las cuales resalta *Alternaria*, que muchas veces debido a su sintomatología tiende a confundirse con *Botrytis* y en la mayoría de los casos se emplean tratamientos químicos para su control (Herrera, 2016).

2.7.1.2 Sector Agrícola

Otro de los sectores más importantes económicamente es el agrícola entre los que se destaca el brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) como uno de los productos de exportación de interés debido a su afectación por *Alternaria* además de que la mayoría del producto está dirigido a exportación que en

el estudio de Ñacato & Valencia (2016), se establece que para el año 2000 la producción anual era de alrededor a 50 mil toneladas, sin embargo para el año 2014 la producción aumento en un 59,59% con respecto al año 2013. Sin embargo este porcentaje ha ido aumentando hasta el año 2019 donde se dice que se ha tenido un aumento del 8% promedio anual desde el 2014 por lo que se sabe que este producto abarca más de 9000 hectáreas sembradas y en lo que respecta a exportaciones se ha tenido ingresos de \$69-70 mil dólares en cinco meses lo que representaría más de \$100 mil anuales (Sánchez, Vayas, Mayorga, & Freire, 2020). Por último establecen que las perdidas por *Alternaria* pueden llegar hasta el 30% de pellas producidas lo que representaría una pérdida económica considerable, sin embargo las lesiones y mecanismos de infección de este patógeno alcanzaría a una afectación de esta hortaliza de hasta valor mayores del 50% resultando en un impacto económico muy grande a nivel del país (Herrera, 2016).

2.8 Pruebas *in vitro* para el biocontrol de *Alternaria* sp

Actualmente se busca alternativas para el control de las enfermedades generadas por hongos fitopatógenos, esto debido a que se quiere evitar o reducir el empleo de agroquímicos de origen sintético debido a los problemas que han generado en los usuarios por lo que se han tomado en cuenta las técnicas de biocontrol, a través del uso de microorganismos antagonistas, que permiten una reducción en el desarrollo y propagación de enfermedades en las plantas, esto puede darse por medio de: una competencia, antibiosis, inducción de resistencia y otros. Entre los géneros más utilizados se encuentran *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium* y *Trichoderma*, donde se resalta al género *Bacillus* como un referente debido a su actividad de control de enfermedades fúngicas (Collaguazo & Tenorio, 2018). Además en cuanto al estudio de los diferentes mecanismos de biocontrol a resultado de gran interés el análisis de estos a escala de laboratorio ya que permite realizar un gran número de pruebas para determinar el potencial antagonista de un alto número de microorganismo a nivel *in vitro*.

2.8.1 Pasos para análisis *in vitro*

Si se desea realizar un análisis *in vitro* del antagonismo microbiológico es necesario realizar una serie de pasos en primer punto es necesario realizar un aislamiento de los microorganismos patógenos y antagónicos, muchas veces el patógeno se lo encuentra en especies vegetales contaminadas mientras que el antagónico en el suelo, por lo que se toma muestras de suelo y de vegetales (Figura 6A), después se hace la siembra de los microorganismos en medios de cultivos específicos mayormente Patata Dextrosa Agar (PDA) (Figura 6B), posteriormente es necesaria la caracterización de las cepas de interés mediante características propias de las mismas (Figura 6C), se las incuba bajo condiciones adecuadas para su proliferación, y se realiza pruebas para potencial antagónico por ejemplo antibiograma (Figura 6D) (Coromoto & Reyes, 2018).

Procesos de asilamiento, identificación y antibiosis

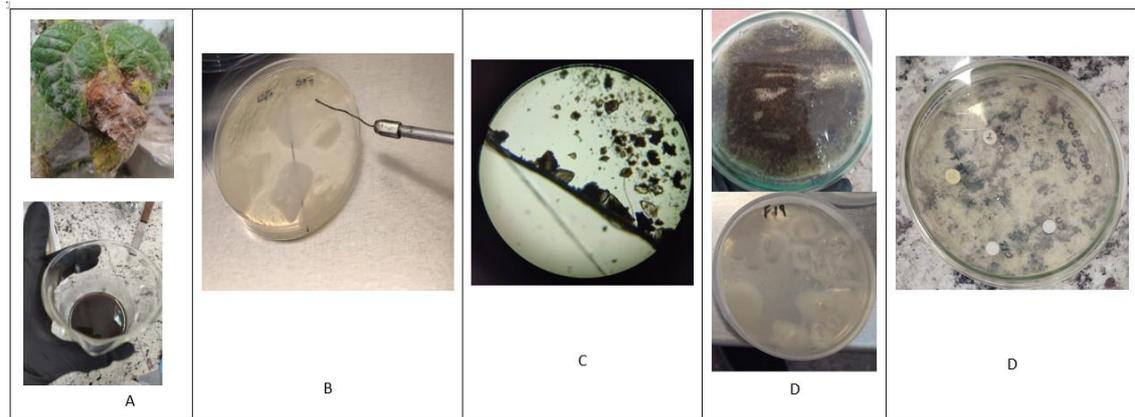


Figura 6. Toma de muestras (A); Siembra(B); Caracterización(C); Proliferación(D); Prueba antagonista (E).

Fuente: (Los Autores 2023)

2.8.2 Antibiosis

Este mecanismo de acción antagonista está basado en la producción *in vitro* de sustancias por parte del microorganismo biocontrolador, estas sustancias pueden ocasionar una inhibición del crecimiento o una reducción en la actividad metabólica del microorganismo patógeno. Se caracteriza por no ser una metodología directa es decir que exista un contacto íntimo entre el antagonista y el patógeno, se trataría de una especie de antibiótico que permanecería intacto inclusive hasta que el antagonista muera, por otro lado a fin de establecer si en realidad existe un antibiótico producido, se han empleado mutantes generados biotecnológicamente de microorganismos antagonistas sin esta capacidad de producir metabolitos dando a relucir el no control del patógeno (Nuero, 1995).

2.8.3 Competencia

Como su nombre lo indica, consiste en una especie de contienda entre el microorganismos patógeno y el antagonista esto por el sustrato en un medio de cultivo, ya que para este caso en particular el mismo es insuficiente para ambos por lo que se busca inhibir el desarrollo del fitopatógeno, este mecanismo va a depender de algunos factores y se lo puede dividir en tres tipos que son: competencia por nutrientes y agua (Fase previa a la penetración del patógeno), por oxígeno (Anaerobiosis en la rizosfera) y por espacio (Relación de velocidades de crecimiento patógeno-antagonista) (Nuero, 1995).

2.8.4 Inducción de resistencia

La resistencia que presentan las plantas naturalmente a ciertas afectaciones ha resultado de gran interés a nivel *in vitro* ya que es posible preparar de cierta forma el mecanismo de defensa propio de las plantas para generar una resistencia frente a diferentes tipos de patógenos, esto puede ser por parte

de producción de compuestos por microorganismos antagonistas para generar una respuesta inmune, o a su vez también se puede hacer modificaciones menos dañinas de los diferentes patógenos, denominadas cepas avirulentas, de tal manera que se dé un reconocimiento y respuesta frente a estas generando así una resistencia inducida (Nuero, 1995).

2.8.5 Explotación

Este tipo de antagonismo, ya se caracteriza por ser directo, esto quiere decir que existe un contacto íntimo entre el hospedador y el patógeno, donde este último toma los nutrientes del primero, sin embargo esto debe ocurrir en presencia de otro patógeno que cumplirá la función de depredador, es decir que elimine al patógeno de interés a esto se le denomina hiperparasitismo sin embargo esto puede ser contraproducente por lo que se considera que el empleo de hiperparásitos debería hacerse para reducciones de inóculo patógeno en infecciones de tipo secundarias es decir posteriores a una primera infección ya tratada (Nuero, 1995).

2.8.6 Lisis

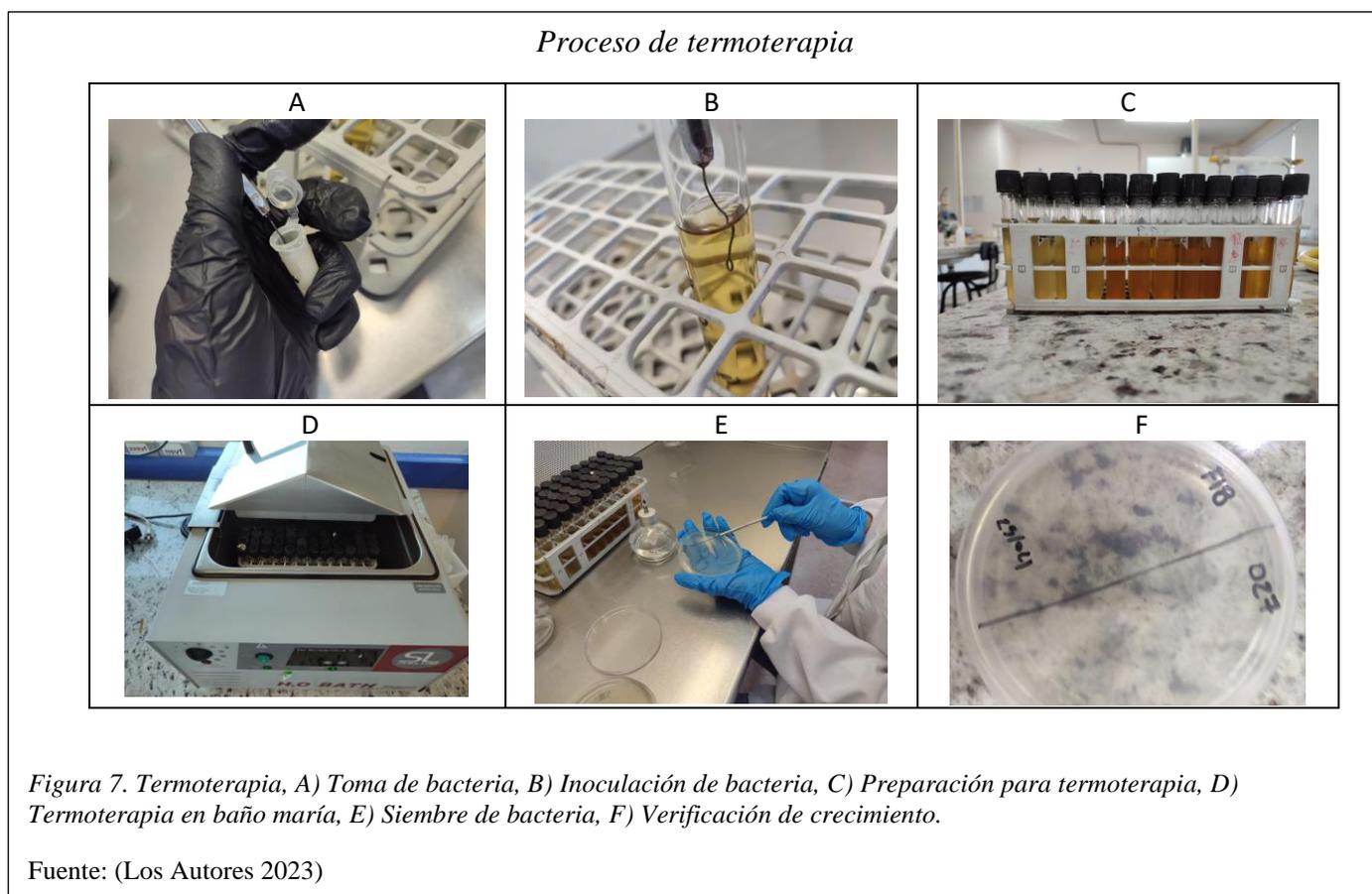
Por último este tipo de control está relacionado a la acción enzimática, lo que se busca con este mecanismo es que se dé una degradación total o parcial de las paredes celulares, es decir generando la muerte celular en los microorganismos, por lo que a nivel *in vitro* lo que se busca es la producción de enzimas ya sean de organismos antagonistas o de los propios organismos patógenos, denominados hidrólisis o autólisis respectivamente a fin de reducir o inhibir en su totalidad el desarrollo del microorganismo patógeno (Nuero, 1995).

3. Materiales y métodos

3.1 Pruebas termorresistencia (termoterapia) y microscópicas

Las bacterias del banco de cepas fueron reactivadas para lo cual se realizó su siembra en caldo de triptona y soya, y se incubaron a 35°C por 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo se las sometió a termoterapia, para esto se introdujo los tubos de ensayo dentro de una gradilla en un equipo de baño María, previamente calentado a 70°C y se los sumergió por un tiempo 20min (Figura 7).

Después de esto se sembró las bacterias en cajas Petri en medio Agar Nutritivo, se incubó a 35°C y por 48 horas, esto se realizó con el fin de determinar que bacterias son termorresistentes en función del crecimiento positivo y negativo. De donde se obtuvo un número de cepas que pasen este proceso mismas que fueron colocadas en fundas ziploc etiquetadas por separado como F1 y F2 (Fuente de recolección 1 y Fuente de recolección 2), donde F1 es un banco de la localidad de Cajas y F2 es un banco de la localidad de Puenbo estos códigos permitieron mantener un orden para la aplicación de los procesos y diferenciar las bacterias de la Fuente 1 y 1 Fuente 2 considerando que ambas son provenientes de cultivo de fresas.

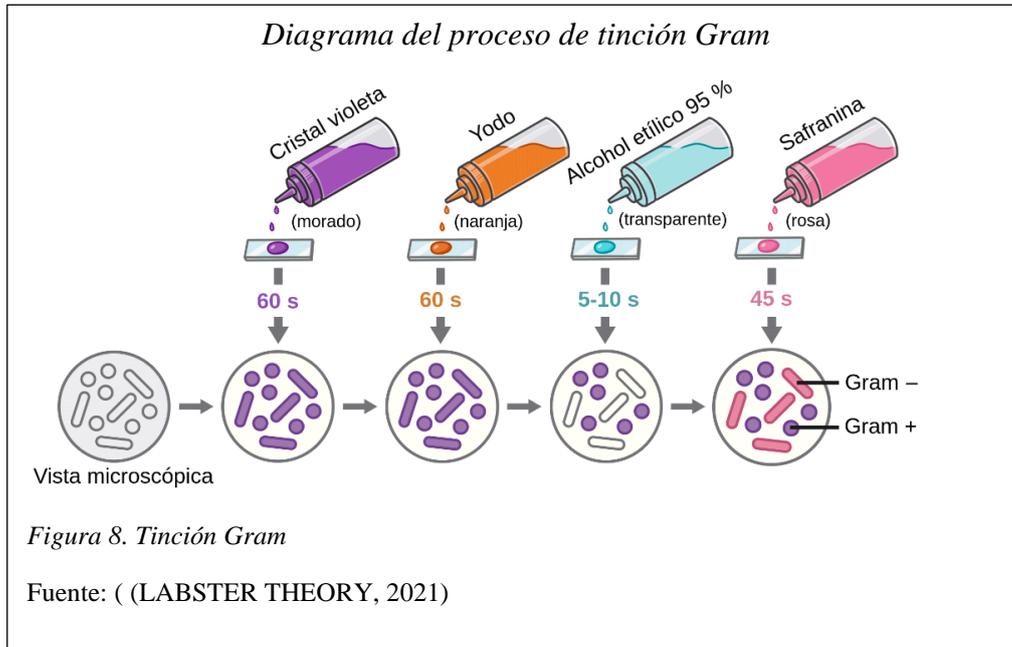


Previo al cultivo se aplicó técnicas de identificación microscópicas a las cepas con resultados positivos en el proceso de termoterapia, basadas en la fisiología de estas bacterias por lo que se realizó una tinción Gram, y una tinción de endosporas.

3.1.1 Tinción Gram

Al tratarse de bacterias del tipo Gram positivas se hace necesaria la aplicación de un método de tinción para su identificación, y confirmación de que estas bacterias pertenecen a este género para este procedimiento se aplicó cristal violeta 2%, Lugol 1%, Etanol 95% y Safranina donde se realizó el siguiente procedimiento:

- Se preparó un frotis para lo cual se tomó una muestra de la bacteria sembrada en medio PDA o agar nutritivo por medio de una aza estéril y se la extiende sobre una gota de agua que se encuentra en el portaobjetos
- Tras la extensión en la gota de agua se procedió a secar al aire.
- Una vez que la muestra se secó, se realizó una fijación de la muestra por calor, se pasó varias veces el portaobjetos con una pinza por la llama del mechero hasta que se fije correctamente.
- Con la muestra fijada se procedió a la tinción para lo cual se empleó el colorante cristal violeta, se añadió sobre la muestra y se deja reposar por un minuto, es importante mencionar que este tiñe todas las células de color morado.
- Se retiró el exceso de cristal violeta y se procedió a agregar el Lugol, este actuó como mordiente es decir ayuda a la fijación del colorante a la bacteria, se cubrió toda la zona de tinción por un minuto
- Se retiró el Lugol y se hizo una decoloración con ayuda de alcohol al 95%, se retiró el alcohol con agua
- Se añadió safranina como colorante de contraste se dejó por 45s y se procedió a observar en el microscopio empezando por el lente 10X.



3.1.2 Tinción de endosporas

Debido a que las bacterias presentan la cualidad de termorresistencia por la presencia de endosporas es necesaria la confirmación de la presencia de estas por eso se empleó una técnica de tinción denominada Schaefer Fulton, donde se utilizó como reactivos: verde brillante al 1% disuelta en agua y safranina al 1% disuelta en agua y se siguió el procedimiento descrito a continuación:

- De las bacterias sembradas en medio PDA, se tomó una muestra del microorganismo con ayuda de un asa metálica y se lo colocó en el portaobjetos al que se le agregó una gota de agua y se extendió totalmente la muestra y se dejó secar al aire.
- Una vez seco el portaobjetos con el microorganismo, se cubrió el mismo con verde brillante al 1% hasta cubrirlo en su totalidad y se dejó que actúe por un minuto.
- Después se colocó encima del portaobjetos y cubriendo la verde brillante un trozo de papel filtro y con ayuda de una pinza se llevó a la llama del mechero y se lo pasó por la llama hasta que se evapore y se fije el colorante en un tiempo de 5 minutos aproximadamente, es importante evitar que se seque el verde de malaquita si sucede esto se añade un poco más.
- Pasados los 5 minutos se retiró el papel filtro que se colocó encima del portaobjetos por encima del colorante con esto las esporas y células se pintaron, se limpió la muestra con agua con ayuda de una piceta retirando el exceso de verde de brillante.
- Tras el lavado se empleó la safranina al 1% se colocó sobre la muestra y se dejó actuar por dos minutos, este colorante servirá como un color de contraste de tal manera que se diferencien las células de las endosporas teñidas con verde malaquita.
- Pasados los 2 minutos se lavó con agua de la misma forma que se hizo con la verde brillante y se dejó secar al aire.

- Se observó los resultados en el microscopio, empezando con el lente 10X , y se observó las células de color rosa por la safranina y las endosporas de verde brillante (Figura 8)



3.2 Siembra de cepas de interés

Transcurrido el proceso de termoterapia, se pudo establecer un total de bacterias de tipo termorresistentes, mediante pruebas de crecimiento positivo tras siembra en cajas Petri, por lo que se depuró el banco de cepas reduciendo su número, además se estableció una relación en cuanto a la producción de endosporas, ya que estas son las que le otorgan la resistencia a altas temperaturas a las bacterias, estas últimas se emplearon a continuación, por lo que se realizó un estriado con asa metálica en cajas Petri con medio Agar Papa Dextrosa (PDA) para las bacterias y se incubaron a 35°C por un periodo de 48h. Por otro lado, también se realizó la siembra del hongo fitopatógeno, se aplicó una siembra con isopos estériles de igual manera en medio PDA, teniéndose así cajas muestra del hongo para los procesos posteriores. (Anexo 1).

3.3 Producción de metabolitos

3.3.1 Medio de fermentación y cultivo bacteriano

Para las bacterias que pasaron el proceso de termoterapia se preparó medio líquido digerido de soja y caseína (TSB) con un volumen total de 150mL para 10 tubos de ensayo, se hizo una suspensión de las colonias bacterianas en incubación durante 48h en medio PDA a un volumen de 5mL de agua destilada a temperatura ambiente, para obtener un 10% del inóculo en el medio en cada tubo de ensayo, hasta un 3 en la escala McFarland que corresponde aproximadamente a una concentración de la bacteria de 1.2×10^9 UFC. .

3.3.2 Montaje de biorreactor

Para la , se realizó biorreactores pequeños en tubos de ensayo, a modo de biorreactores aireados de tipo Batch, para lo cual se utilizó, tubos de ensayo de alrededor de 25mL de capacidad, en los cuales se colocó 15 mL de medio de cultivo líquido digerido de soja y caseína (TSB), se le agregó la suspensión de bacterias con la escala McFarland 3 se selló el tubo de ensayo al cual se le colocarán 2 mangueras una para el suministro de aire por medio de una bomba de pecera y otra para la verificación del proceso, esta última se conectó a un tubo con etanol al 70% se fijó las mangueras con ayuda de algodón y cinta adhesiva para evitar que la manguera con etanol entre al medio y se dejó en funcionamiento el biorreactor por 48h para la posterior extracción de metabolitos; el número de biorreactores corresponde al número de cepas que se obtuvieron del proceso de termoterapia (Anexo 2).

3.3.3 Extracción de metabolitos

Los metabolitos secundarios son el resultado de someter a las bacterias a condiciones de estrés, entre estas resalta la falta o disminución de nutrientes, por esta razón se colocó una cantidad determinada de medio de cultivo y de bacterias dado que tras el transcurso de 48h los nutrientes del medio son escasos y obligan a las bacterias a formar endosporas que inician la producción de los metabolitos.

Por lo que para su extracción se aplicó el protocolo establecido por Miizumoto(2006, págs. 869-875), para lo cual se tomó 15mL de caldo bacteriano en fase estacionaria, es decir después de la fase exponencial en los medios presentes en el biorreactor, y se formó una solución en conjunto con 6,9mL de etanol al 95%(solvente), se colocó en vasos de precipitación de 50mL, se sometieron a agitación de 150rpm/ 1h a temperatura ambiente, con ayuda de un shaker, el líquido obtenido se colocó en tubos ependorf de 50mL de capacidad y se centrifugaron a 4000rpm/15min (Anexo 3).Se filtró el sobrenadante con un filtro 0,22 μ m con ayuda de una jeringa y se almacenó el filtrado a 6°C. La verificación de la obtención de metabolitos se estableció por la obtención del sobrenadante alcohólico, obtenido tras la eliminación bacteriana por medio de agitación con etanol al 95% y centrifugación.

3.4 Pruebas de antagonismo (Enfrentamiento y Antibiograma)

3.4.1 Antibiograma

Con el fin de verificar la presencia de metabolitos en el sobrenadante alcohólico y establecer las mejores cepas antagonistas de *Alternaria* sp, se realizó la prueba de antibiograma, por tanto se inoculó el hongo fitopatógeno por medio de un hisopado en

toda la caja Petri con medio Agar papa dextrosa (PDA) a partir de las cajas muestras obtenidas en el proceso de siembra inicial. Para las prueba propia del antibiograma se usaron discos de papel filtro mismos que fueron sumergidos por medio de una pinza estéril en líquido obtenido de la centrifugación, y de líquido filtrado proveniente del proceso de la extracción de metabolitos, por lo cual se tomaron las cajas Petri con el hongo ya sembrado y se colocó un disco en la parte superior uno en la parte inferior tanto para el filtrado como para el sin filtrar además en algunos casos se empleó un control negativo, de tal manera que se sumergieron discos de papel filtro en agua destilada, se colocaron los mismos en la superficie del medio PDA separados, el conjunto se colocó en una incubadora de hongos y se dejó por un periodo de 7 días y se observó si existe la formación de halos de inhibición que son un indicativo de la obtención de metabolitos secundarios (Anexo 4). De los datos obtenidos se realizaron tablas en las cuales se presenta la concentración de bacteria que entró al biorreactor, si existe halos, y si el metabolito fue filtrado o no Tabla 3 y Tabla 4 mismas que nos proporcionan una idea de si existe alguna relación en la producción de metabolitos con la concentración de bacteria inicial que entra al biorreactor, si el proceso de filtrado es necesario o no y si estos influyen en la formación de halos de inhibición.

3.4.2 Enfrentamiento

Las cepas bacterianas con resultados positivos de antibiosis en los antibiogramas se las enfrentó de forma dual según se reporta por Ñacato & Valencia (2016), para *Alternaria* sp pero se modificó la misma, y se utilizó la técnica de punta donde se tomó muestra de hongo con una aza de punta y jeringas de insulina y se pinchó el medio PDA, de manera equidistante en los bordes derecho e izquierdo, esto se lo hizo con ayuda de una plantilla, y se incubó a 24°C por 24h.

Para las bacterias se colocó el caldo previamente incubado por 24 horas en una caja Petri vacía y estéril, con una pinza se tomará un portaobjetos estéril, se sumergirá el borde más largo del mismo en el caldo y se hunde suavemente en el medio con *Alternaria* sp, por último se incubó en conjunto a 24°C. Se tomó como testigo una caja Petri con *Alternaria* sp sin bacteria Figura 10 (Anexo 5).

Esquema enfrentamientos

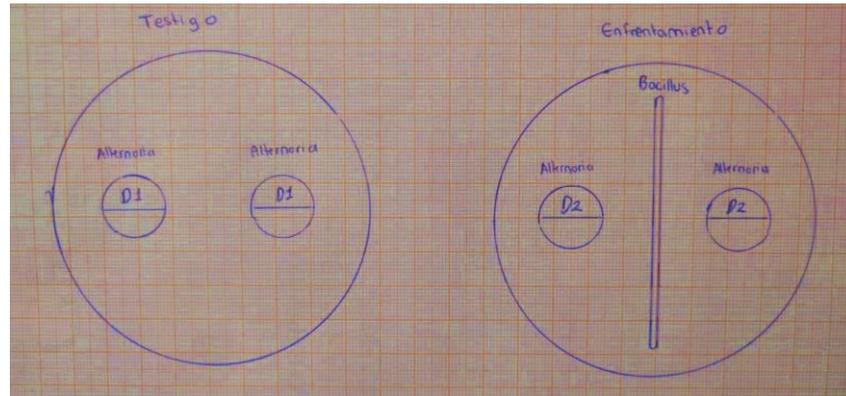


Figura 10. Esquema de los enfrentamientos

Fuente: (Los Autores 2023)

El porcentaje de inhibición se realizaron pasado 5 días y se determinaron por la siguiente formula:

$$\%I = \frac{D1-D2}{D1} \times 100 \text{ (Ec. 1)}$$

D1: Diámetro promedio testigo

D2: Diámetro patógeno en tratamiento dual

Diámetro promedio del testigo:

$$D1 = \frac{(Dt_{i1}+Dt_{d1})+(Dt_{i2}+Dt_{d2})+(Dt_{i3}+Dt_{d3})}{3} \text{ (Ec. 2)}$$

Donde:

Dt_{i1} : Diámetro testigo lado izquierdo en la repetición 1

Dt_{d1} : Diámetro testigo lado derecho en la repetición 1

Dt_{i2} : Diámetro testigo lado izquierdo en la repetición 2

Dt_{d2} : Diámetro testigo lado derecho en la repetición 2

Dt_{i3} : Diámetro testigo lado izquierdo en la repetición 3

Dt_{d3} : Diámetro testigo lado derecho en la repetición 3

Diámetro del patógeno con la bacteria:

$$D2 = D_{iB} + D_{dB} \text{ (Ec. 3)}$$

Donde:

D_{iB}: Diámetro izquierdo del patógeno con bacteria

D_{dB}: Diámetro derecho del patógeno con bacteria

3.5 Análisis Estadístico

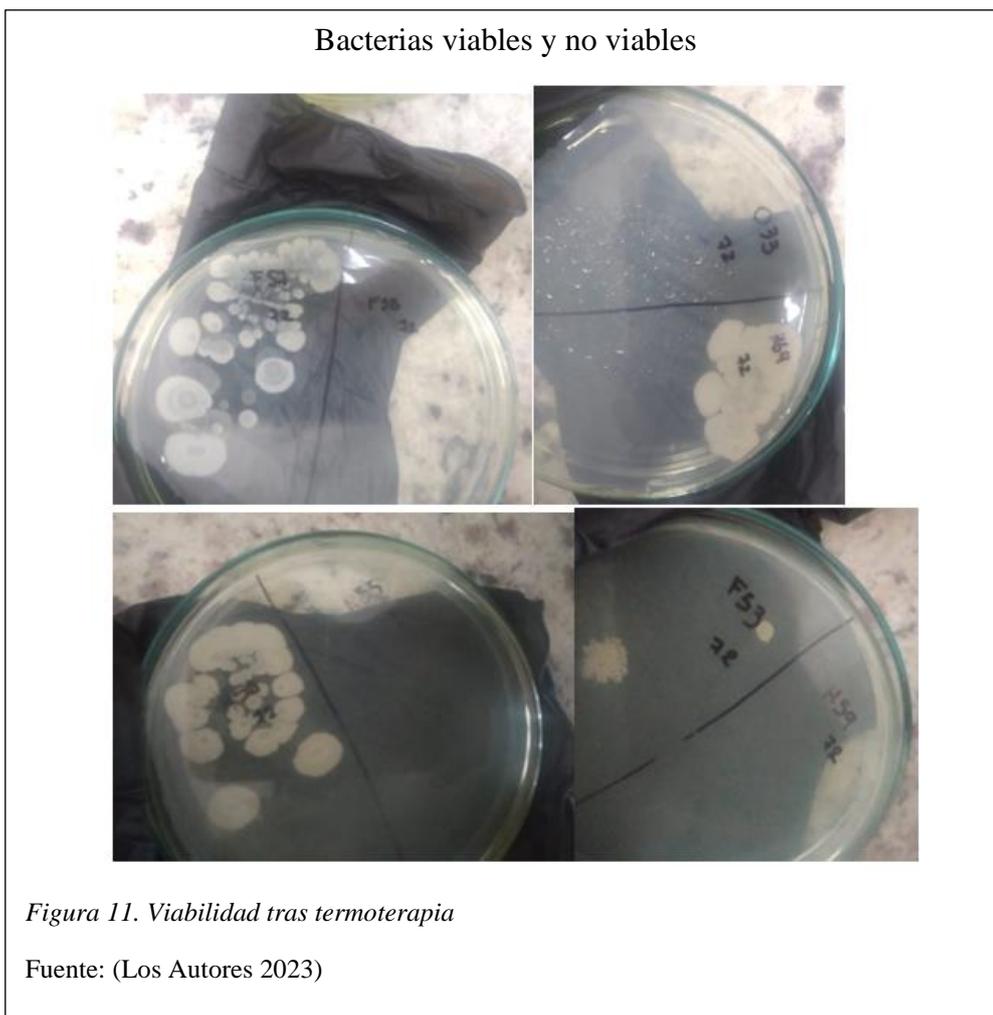
Se aplicó un análisis estadístico ANOVA en un diseño completamente al azar (DCA), para lo cual se planteó las hipótesis nula y alternativa, donde la primera establece que los “tratamientos son iguales”(H₀:T₁=T₂=T₃=T₄...=T₁₅), y la segunda establece que “al menos un tratamiento se diferencia de los demás”(H_a: al menos un T es diferente) en lo que respecta al control biológico de *Alternaria* sp, donde el porcentaje inhibición de las diferentes bacterias obtenidos en la técnica de enfrentamiento corresponde a la variable dependiente, mientras que la variable de clasificación fueron los tratamientos que en este caso corresponden a las bacterias que se emplearon en la técnica de enfrentamientos duales.

Se utilizó el programa estadístico InfoStat versión 2020, donde se colocó la tabla con los porcentajes de inhibición con 3 repeticiones, además se realizó comparaciones de los tratamientos por medio de pruebas Post hoc, en este caso se aplicó la prueba de Tukey con un nivel de significancia $\alpha=0,05$ por lo que se comparó los tratamientos en base a sus medias y se estableció la mejor cepa antagonista.

4. Resultados esperados y discusión

4.1.1 Termoterapia

Tras el proceso de termoterapia se obtuvo un total de 73 cepas de bacterias con propiedades de termorresistencia debido a que resultaron viables en el medio de cultivo en el cual fueron sembradas, esto tras ser sometidas a altas temperaturas de hasta 70°C, por ende se estableció como aquellas con la capacidad de formar endosporas y de producir de metabolitos secundarios de interés, como se muestra en la figura 11 donde están algunas de las bacterias que resultaron viables tras el proceso de termoterapia.

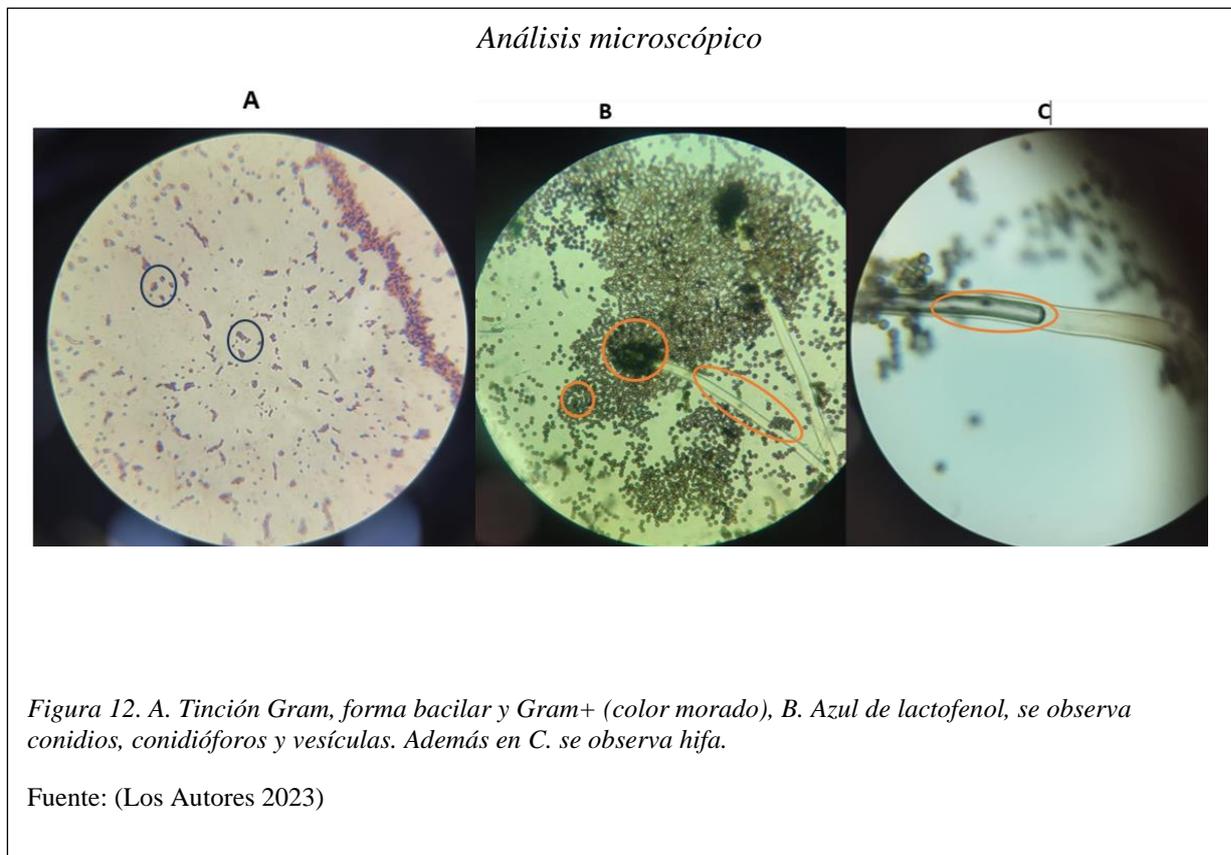


La termoterapia permitió clasificar las bacterias de interés debido a la producción de endosporas, ya que estas le otorgan la capacidad de sobrevivir a condiciones de estrés, en este caso *Bacillus*, con propiedades de esporulación, microorganismos que no solo están presentes en los suelos, sino en productos de gran interés como es el caso de los lácteos, en donde de igual forma para realizar una identificación de estos se aplica termoterapia a temperaturas altas, y una posterior siembra en medios

de cultivo y una incubación a diferentes temperaturas de igual forma para identificar microorganismos viables que en su mayoría corresponden a *Bacillus* (Calvo, 2018).

4.1.2 Validación microscópica

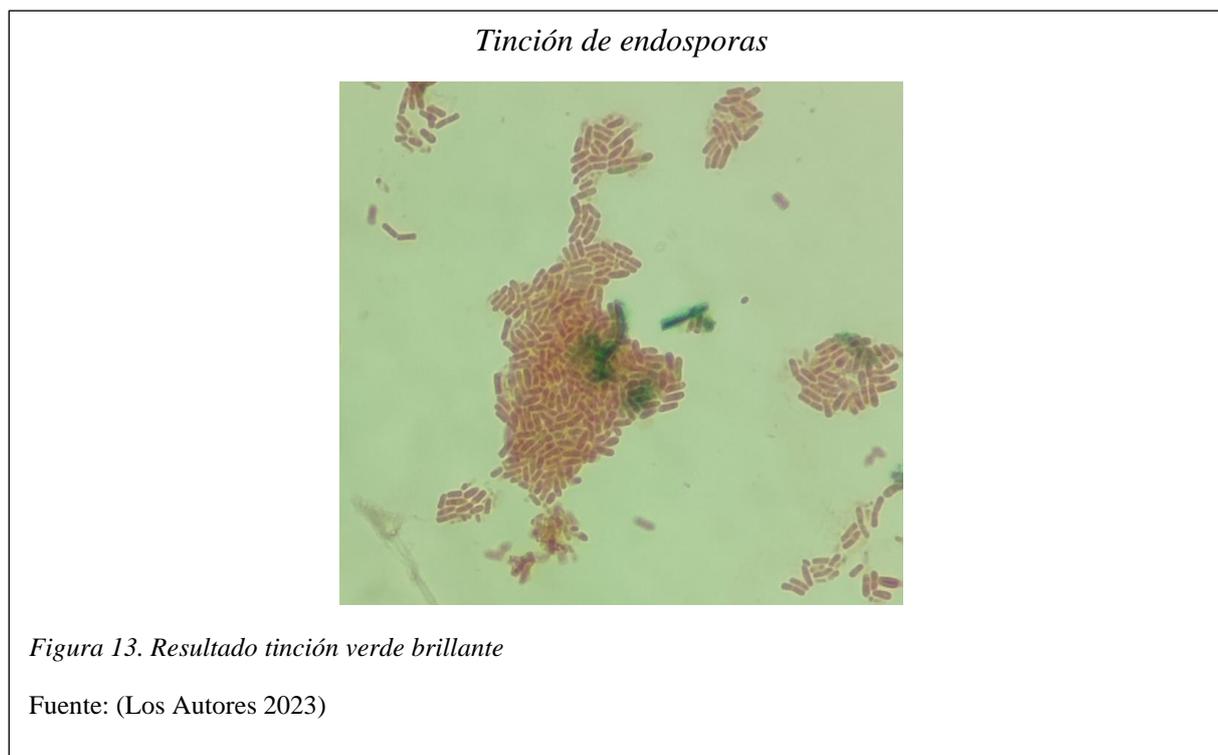
Debido a que en el banco de cepas establecía que estas son del género *Bacillus* fue necesaria la validación microscópica por lo que se empleó la técnica de tinción diferencial Gram, donde se estableció las características propias de las bacterias del género *Bacillus*. Además, a fin de establecer la morfología del hongo fitopatógeno *Alternaria* sp, fue necesaria una tinción simple con Azul de lactofenol en donde se puede apreciar la morfología de este hongo tal como se muestra en la (Figura 11).



La morfología de *Alternaria* sp, varía en gran medida por ejemplo con (insst, 2022), en donde se muestra claramente los conidióforos, algo que para este caso no se logró la identificación, sin embargo se pueden distinguir vesículas, conidios y un gran número de esporas, además de que el colorante no se distingue claramente, además en la morfología propia de los conidióforos, son tabicados, alargados y de forma ovoide.

Tinción de endosporas

En la figura 12 se observa la tinción con verde brillante, que se aplica de la misma forma que la tinción con verde de malaquita y permite la observación de endosporas, en donde debido a la safranina permite identificar los *Bacillus* de color rojo, mientras que con el verde brillante se distinguen las endosporas.



Usualmente la tinción de endosporas se realiza por medio del uso de verde de malaquita, sin embargo el verde brillante también es útil aunque no pinta una gran cantidad de endosporas es posible lograr una fijación del colorante verde brillante a las mismas como se observó en este proceso, al igual de los resultados obtenidos por Ñacato & Valencia (2016), en donde obtuvieron una tinción de endosporas con un mayor visualización, con un mayor aumento y de igual forma con la aplicación de verde brillante.

4.1.3 Pruebas de antibiosis (Antibiograma)

Las bacterias son capaces de producir metabolitos secundarios, cuando existe un factor de estrés en este caso una disminución en la cantidad de nutrientes del medio de cultivo y de acuerdo con (Nuero, 1995), estos son capaces de inhibir el desarrollo de otros microorganismos ya que debido a la presencia de estos puede existir esta disminución de nutrientes, es por esto que se empleó biorreactores de tipo Batch en donde se observó que en un periodo de 48h estas bacterias del género

Bacillus producen la mayor cantidad de metabolitos secundarios y se ve reflejado en la formación de halos de inhibición.

En este punto se analizó el proceso de producción de metabolitos, basado en las concentraciones empleadas de bacteria para cada uno de los biorreactores en cada uno de los casos, donde se consideró a un proceso de 48h de tal manera que se pudo establecer relaciones en cuanto a las diferentes variables de interés y se las relacionó con los resultados de antibiosis.

Los metabolitos obtenidos son lipopéptidos de tipo surfactina o iturina, esto debido a que en estudios la identificación de este tipo de compuestos se la realizó por medio de cromatografía en fase reversa (Yesid & Ligia, 2012) , sin embargo los procesos de extracción y purificación está basada en el protocolo usado en este proyecto en la fase de laboratorio; incluso en lo que respecta al solvente empleado en este caso etanol al 95%; en el trabajo de Bustamante (2015), recomienda el uso de otros solventes a parte de este como son el agua destilada estéril o a su vez ácido fórmico lo que permitiría una obtención mayor de metabolitos de tipo lipopéptidos.

En la Tabla 3 y 4 se observa las 73 bacterias a las cuales se les sometió a la producción de metabolito secundarios con su respectivo código del banco de cepas, además se muestra la concentración inicial de estas que entraron a los biorreactores en este caso de tipo Batch aireado, en base a la turbidez por medio de la escala McFarland en UFCs, por otro lado se empleó símbolos de positivo (+) y negativo (-) en base a la obtención de halos de inhibición, donde se obtuvo un total de 15 cepas con resultados positivos y en la última columnas se estableció si el metabolito de la bacteria empleado en el antibiograma es decir de aquellas bacterias con formación de halos fue filtrado o no, se utilizó las valoraciones de SI y NO para hacer referencia a esto (Anexo 6). Se obtuvo que 11 de las 15 bacterias positivas y sus metabolitos sin filtrar tuvieron mayor incidencia en la formación de halos de inhibición.

Tabla 2. Resultados antibiosis bacterias F1

F1			
Código bacteria	Concentración inicial Biorreactor (UFC)	Inhibición	Filtración metabolito
		(+ /-)	Solo positivas (SI/NO)
H35	1,2x10 ⁹	+	NO
O26	1,2x10 ⁹	-	
S56	1,2x10 ⁹	-	
F35	1,2x10 ⁹	-	
H45	1,2x10 ⁹	-	
F21	9x10 ⁸	-	
F19	9x10 ⁸	-	
H32	1,2x10 ⁹	+	NO
S40	1,2x10 ⁹		
F26	1,5x10 ⁹	+	NO
F28	1,2x10 ⁹		
F22	1,2x10 ⁹	+	NO
S42	1,5x10 ⁹	-	
F20	1,5x10 ⁹	-	
O27	1,2x10 ⁹	-	
O32	1,2x10 ⁹	-	
H34	9x10 ⁸	-	
H31	1,5x10 ⁹	+	NO
F29	1,2x10 ⁹	-	
O23	1,5x10 ⁹	+	NO
H40	1,2x10 ⁹	-	
S37	1,2x10 ⁹	-	
S45	1,2x10 ⁹	-	
H43	1,5x10 ⁹	-	
S38	1,5x10 ⁹	-	
S51	1,2x10 ⁹	-	
F18	9x10 ⁸	-	
H41	1,2x10 ⁹	-	
S54	1,2x10 ⁹	-	
S55	1,5x10 ⁹	-	
F25	1,5x10 ⁹	+	SI
S43	1,2x10 ⁹	-	
H36	1,5x10 ⁹	-	
O30	1,2x10 ⁹	-	
H37	1,2x10 ⁹	-	
S41	1,2x10 ⁹	+	NO

Tabla 3. Resultados antibiosis bacterias F2

F2			
Código bacteria	Concentración inicial Biorreactor (UFC)	Inhibición	Filtración metabolito
		(+ /-)	Solo positivas(SI/NO)
O35	1x10 ⁹	-	
F59	1,2x10 ⁹	-	
F54	1,2x10 ⁹	-	
O40	1,2x10 ⁹	-	
H66	1,2x10 ⁹	+	SI
S62	1,2x10 ⁹	-	
H57	1x10 ⁹	-	
S58	1,5x10 ⁹	-	
H47	1,2x10 ⁹	-	
F52	1,2x10 ⁹	+	SI
H53	1,2x10 ⁹	-	
H61	1,5x10 ⁹	-	
F39	1,5x10 ⁹	+	SI
S69	1,5x10 ⁹	-	
O36	1,2x10 ⁹	-	
O37	1,2x10 ⁹	-	
S77	1,2x10 ⁹	-	
F46	1,2x10 ⁹	-	
S66	1,2x10 ⁹	-	
O41	1,5x10 ⁹	+	NO
S60	1,2x10 ⁹	+	NO
H52	1,5x10 ⁹	+	NO
H58	1,2x10 ⁹	-	
S63	1,5x10 ⁹	-	
F42	1x10 ⁹	-	
F40	1x10 ⁹	-	
H56	9x10 ⁸	-	
H49	1,5x10 ⁹	+	NO
F57	1,5x10 ⁹	-	
F50	1,5x10 ⁹	-	
F48	1,2x10 ⁹	-	
H64	1x10 ⁹	-	
S75	1,2x10 ⁹	-	
F51	1x10 ⁹	-	
F45	1,2x10 ⁹	-	
F53	1x10 ⁹	-	
S76	1,2x10 ⁹	-	

es importante considerar que estos datos son útiles de igual forma para establecer una idea de la capacidad antagonista inicial antes del correspondiente cálculo del porcentaje de inhibición, existe la escala Bell (Ñacato & Valencia, 2016) que está relacionado con el crecimiento del antagonista en este caso, donde de acuerdo a la escala ≥ 60 mm es considerado como muy bueno, entre $60 > X > 40$ bueno, $40 > X > 30$ deficiente, $30 > X > 0$ malo y por último $= 0$ muy malo algo dándonos una idea del poder antagonista de las bacterias.

Por otra parte la inhibición con la respectiva formación de halos están estrechamente relacionadas puesto que estos pueden tener un efecto en el crecimiento de los hongos patógenos, donde de acuerdo con Caro & León (2014), el crecimiento de los hongos fitopatógenos se ve afectado por la presencia de SLC (Sobrenadantes libres de la célula), en el medio de cultivo disminuye la velocidad de desarrollo del hongo y por tanto le toma más tiempo de adaptación para crecer, y se da paso a la formación de halos. El cálculo del diámetro de la bacteria con el patógeno Ec.3 se lo realizó para cada una de las bacterias, y se calculó el porcentaje de inhibición como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 4. Diámetros de *Alternaria sp* en enfrentamientos después de 3 días

Tratamiento	Diámetro					
	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
	Izquierdo(mm)	Derecho(mm)	Izquierdo(mm)	Derecho(mm)	Izquierdo(mm)	Derecho(mm)
T0 Testigo	29,46	29,57	30,03	29,73	30,07	29,54
T1(H31)	19,27	18,85	17,73	18,53	19,2	18,33
T2(F26)	20,17	19,74	18,57	19,36	21,04	20,47
T3(H35)	19,15	18,9	19,73	20,15	17,9	19,83
T4(H32)	19,52	18,89	18,3	20,47	20,32	19,54
T5(F22)	19,84	18,62	20,77	19,13	18,27	17,84
T6(O23)	22,17	19,6	20,15	19,48	22,17	19,45
T7(F25)	17,32	17,13	16,91	16,97	16,57	17,69
T8(S41)	19,72	18,14	16,74	17,2	18,25	17,49
T9(H66)	16,11	17,93	16,54	17,12	16,98	17,34
T10(F52)	18,47	19,16	17,52	18,33	17,45	16,94
T11(F39)	20,14	19,87	20,34	18,82	19,76	18,94
T12(O41)	16,44	17,43	18,7	19,27	17,98	18,64
T13(S60)	20,24	21,53	20,34	21,12	22,03	19,33
T14(H52)	21,43	26,16	22,11	24,27	22,12	21,47
T15(H49)	17,41	19,49	18,45	20,23	19,73	20,19

Tabla 5. Resultados % de Inhibición

Tratamiento	Suma de diámetros			% Inhibición		
T1(H31)	38,12	36,26	37,53	35,9	39,0	36,9
T2(F26)	39,91	37,93	41,51	32,9	36,2	30,2
T3(H35)	38,05	39,88	37,73	36,0	32,9	36,6
T4(H32)	38,41	38,77	39,86	35,4	34,8	33,0
T5(F22)	38,46	39,9	36,11	35,3	32,9	39,3
T6(O23)	41,77	39,63	41,62	29,8	33,4	30,0
T7(F25)	34,45	33,88	34,26	42,1	43,0	42,4
T8(S41)	37,86	33,94	35,74	36,3	42,9	39,9
T9(H66)	34,04	33,66	34,32	42,8	43,4	42,3
T10(F52)	37,63	35,85	34,39	36,7	39,7	42,2
T11(F39)	40,01	39,16	38,7	32,7	34,1	34,9
T12(O41)	33,87	37,97	36,62	43,0	36,1	38,4
T13(S60)	41,77	41,46	41,36	29,8	30,3	30,4
T14(H52)	47,59	46,38	43,59	20,0	22,0	26,7
T15(H49)	36,9	38,68	39,92	37,9	35,0	32,9
T0(Testigo)	59,03	59,76	59,61	Promedio	59,47	

Como se observa en la (Tabla 6), se obtuvo un p-valor < 0.01 en los tratamientos por lo que se negó la hipótesis nula que dice que los tratamientos son iguales, y se acepta la hipótesis alternativa, y por tanto al menos un tratamiento es diferente y es necesario el análisis individual.

En la Tabla 8. Se observa valores considerables en las medias, además de que existen valores considerables en ellos donde en su mayoría sobrepasan valores del 20%, y en otros mayores al 40% con errores muy bajos, además se establece el mínimo y máximo valor de inhibición obtenido por cada cepa.

Tabla 6. Análisis de la varianza tratamientos

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1109,73	14	79,27	14,43	$<0,0001$
Tratamientos	1109,73	14	79,27	14,43	$<0,0001$
Error	164,84	30	5,49		
Total	1274,57	44			

Tabla 7. Medidas de resumen para las diferentes cepas

CEPA	MEDIA(MM)	DE	EE (mm)	Min(mm)	Max(mm)
F22	35,83	3,23	±1,87	32,9	39,3
F25	42,5	0,46	±0,26	42,1	43
F26	33,1	3	±1,73	30,2	36,2
F39	33,9	1,11	±0,64	32,7	34,9
F52	39,53	2,75	±1,59	36,7	42,2
H31	37,27	1,58	±0,91	35,9	39
H32	34,4	1,25	±0,72	33	35,4
H35	35,17	1,99	±1,15	32,9	36,6
H49	35,27	2,51	±1,45	32,9	37,9
H52	22,9	3,44	±1,99	20	26,7
H66	42,83	0,55	±0,32	42,3	43,4
O23	31,07	2,02	±1,17	29,8	33,4
O41	39,17	3,51	±2,03	36,1	43
S41	39,7	3,3	±1,91	36,3	42,9
S60	30,17	0,32	±0,19	29,8	30,4

Con ayuda de la prueba de Tukey es posible establecer el mejor tratamiento, se obtuvo que existen dos bacterias con un mayor porcentaje de inhibición a pesar de que estadísticamente desde la cepa F22 a la H66 son iguales ya que tienen la misma letra (E), sin embargo gracias a que no comparten otras letras con los grupos se establece el análisis y se considera que tanto F25 como H66 son las mejores en lo que respecta a la inhibición de *Alternaria* sp, y además es posible identificar que las cepas H52, S60 y O23 fueron aquellas que tuvieron resultados no favorables con porcentajes menores al 32% Tabla 9.

Tabla 8. Prueba Tukey (5%)

Cepa	Media	Diferenciación de medias			
H52	22,9	A			
S60	30,17	B			
O23	31,07	B	C		
F26	33,1	B	C	D	
F39	33,9	B	C	D	
H32	34,4	B	C	D	
H35	35,17	B	C	D	
H49	35,27	B	C	D	
F22	35,83	B	C	D	E
H31	37,27	C		D	E
O41	39,17	D			E
F52	39,53	D			E
S41	39,7	D			E
F25	42,5	D			E
H66	42,83	D			E

Las bacterias del género *Bacillus*, han resultado de gran interés como agentes de control biológico, debido a las diferentes formas de antagonismo, en este caso la producción de metabolitos secundarios, se obtuvo la formación de halos de inhibición que permitieron establecer que existen metabolitos producidos por las bacterias del género *Bacillus* del banco de cepas, que son capaces de inhibir el desarrollo de *Alternaria* sp, además esto se puede corroborar ya que con ayuda de los enfrentamientos se obtuvo que todas las bacterias obtenidas debido a la formación de halos de inhibición regulan el crecimiento del hongo fitopatógeno con % de inhibición mayores al 22 % en su mayoría, además que se tienen resultados favorables para el caso de dos bacterias F25 y H66 con valores mayores al 40% algo que resulta de gran interés para el descubrimiento de cepas controladoras de *Alternaria* sp. Además si comparamos los resultados del porcentaje de inhibición obtenido con los planteados por Ñacato & Valencia (2016), donde se obtuvieron porcentajes de antagonismo del 58% máximos, por lo que se puede establecer que los resultados son aceptables además debido a que la mayoría sobrepasan el 20% y por último que se restringe considerablemente el crecimiento de *Alternaria* sp, observable en los diámetros obtenidos y comparados con el testigo. Por otro lado es importante también considerar el inóculo bacteriano ya que se lo realizó una siembra en la parte central sin embargo en estudios como el de (Rios, y otros, 2016), se aplicó enfrentamientos con siembra central del hongo y siembra de bacterias en los puntos cardinales por medio de papel filtro y obtuvieron resultados mayores al 60% en inhibición por lo que se puede considerar que un abarcamiento mayor de la bacteria podría reducir aún más el desarrollo de hongos fitopatógenos. Esto también se observó en el estudio realizado por Mejía, Cristóbal, Tun & Reyes (2016), donde obtuvieron porcentajes de inhibición altos con la aplicación de discos de bacterias alrededor del hongo por lo que el desarrollo de *Alternaria* tendría una reducción aún mayor si se abarca mayor número de zonas con las bacterias a analizar.

Los tiempos de incubación para determinar el potencial antagonista es muy variante que se puede obtener resultados en los días inmediatamente después a la siembra, o a su vez puede tomar mayores tiempos, en este caso se obtuvo un mayor crecimiento y mejores resultados al tercer día, además las bacterias del género *Bacillus*, ejercerán su mayor efecto antagonista inmediatamente debido a su velocidad de desarrollo para llegar a la fase estacionaria y producir metabolitos, además si se consideran tiempos muy largos el hongo puede producir de igual forma metabolitos que contrasten a los de las bacterias y se pierda su efecto (Tejera, Heydrich, & Rojas, 2012).

5. Conclusiones

- La termoterapia permitió identificar aquellas cepas que tengan la capacidad de formar endosporas donde de 129 bacterias se identificó a 73 como termorresistentes por lo que fueron seleccionadas para la producción de metabolitos, y se evaluó por medio del antibiograma es decir por halos de inhibición.
- Se logró identificar por tinción que las 15 bacterias con resultado positivo de antibiosis pertenecen al género *Bacillus* mostrando que todas eran de tipo Gram + por su coloración morada y la presencia de endosporas verificada por tinción de endosporas con verde brillante.
- Los metabolitos de tipo lipopéptidos obtenidos restringieron el crecimiento de *Alternaria* sp, mediante la formación de halos de inhibición donde las 15 bacterias: H31, F26, H32, H32, F22, O23, F25, S41, H66, F52, F39, O41, S60, H52 y H49, en su mayoría formaron halos de inhibición considerablemente pequeños mientras que H66, H49, y F25 formaron halos de mayor tamaño.
- La mayoría de las bacterias presentan un porcentaje de inhibición mayor al 22%, sin embargo tanto las cepas H66 y F25 mostraron un porcentaje mayor de 42.5 y 42.83 % respectivamente, que son porcentajes un poco bajos sin embargo aceptables al tratarse de biorreactores pequeños.

6. Recomendaciones

- Se recomienda realizar investigaciones para la validación de procesos de filtrado de metabolitos, dándole un enfoque al empleo de filtros con niveles de porosidad mayor y menor de tal manera que sea posible analizar el punto óptimo para la obtención de metabolitos purificados y de alto nivel.
- Se recomienda un análisis en perspectiva a la identificación y cuantificación de metabolitos por medio del empleo de técnicas como la cromatografía a fin de establecer los metabolitos de mayor importancia o aquellos de mayor incidencia en los procesos de inhibición de patógenos.
- Sería de gran interés el estudio del género *Bacillus* y de estas cepas a fin establecer relaciones de asociación, o a su vez relaciones simbióticas que favorezcan a obtener un banco de conglomerados de bacterias que actúen como controladores biológicos de mayor efectividad.

7. Bibliografía

(s.f.).

André, C., Caro, & León, Á. (2014). *Inhibición del crecimiento Aspergillus ochraceus Mediante Paneta Fermentada con gránulos kefir de agua*. Obtenido de Scielo:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042014000300004

Azanza, J. B. (2022). *Efectos del hongo Alternaria sp. en el cultivo de pitahaya (Hylocereus spp.) en el Ecuador*. Obtenido de Universidad Técnica de Babahoyo:

<http://dspace.utb.edu.ec/bitstream/handle/49000/13326/E-UTB-FACIAG-AGRON-000033.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Bocanegra, S. N. (19 de Mayo de 2021). *REVISIÓN DOCUMENTAL SOBRE BIOFORMULACIONES A BASE DE Bacillus sp. PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE Botrytis cinerea*. Obtenido de Repositorio unicolmayor:

<https://repositorio.unicolmayor.edu.co/bitstream/handle/unicolmayor/2840/Sara%20Natalia%20Bocanegra%20Dur%C3%A1n%20Presentaciones%20Sara%20Bocanegra%20FINAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Boundless. (29 de Octubre de 2022). *Microbiología (Sin límites)*. Obtenido de LibreTexts:

[https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_\(Sin_1%C3%ADmites\)](https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Libro%3A_Microbiolog%C3%ADa_(Sin_1%C3%ADmites))

Bustamante, M. (Noviembre de 2015). *Obtención y evaluación in vitro de metabolitos secundarios de dos cepas de Bacillus subtilis contra el hongo fitopatógeno Fusarium spp.* Obtenido de Biblioteca Zamorano: <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/a47ca5c1-79b6-4ae3-9457-e14acd69c61f/content>

Calvo, M. (2018). *Identificación de micrororganismos termodúricos provenientes de leche cruda productores de enzimas de deterioro, y evaluación de su actividad en biofilms*. Obtenido de Universidad de la República de Uruguay:

<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/21393/1/uy24-19243.pdf>

Collaguazo, G. A. (Agosto de 2022). *Escalado de la producción de proteínas cristalinas con potencial insecticida a partir de aguas residuales con Bacillus Thuringiensis sp. Kurstaki*. Obtenido de Escuela Politécnica Nacional: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/23095/1/CD%2012519.pdf>

Collaguazo, L. A., & Tenorio, E. M. (Febrero de 2018). *ELABORACIÓN DE BIOPREPARADOS A BASE DE Bacillus sp. PARA CONTROLAR Alternaria spp. EN EL CULTIVO DE Brassica oleracea var. italica*. Obtenido de Universidad Politécnica Salesiana:

<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15116/1/UPS-QT05244.pdf>

- Coromoto, Y., & Reyes, I. (Abril de 2018). *Microorganismos promotores de crecimiento en el biocontrol de Alternaria alternata en tomate (Solanum lycopersicum L.)*. Obtenido de Scielo: https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1316-33612018000100006
- Cuaspa, M. M. (2022). "Evaluación del efecto de la aplicación de *Bacillus subtilis* como controlador biológico de mancha chocolate (*Botrytis fabae*) en el cultivo de haba (*Vicia faba*) variedad semi verde en la Provincia del Carchi, Cantón Huaca, Centro Experimental San Francisco. Obtenido de Repositorio Universidad Politécnica Estatal de Carchi: <http://190.15.129.74/bitstream/123456789/1682/1/444-%20CUASPA%20JIM%20C3%29NEZ%20MELANY%20MARSHELY.pdf>
- Edgar Tec. (26 de Septiembre de 2022). *Bioprocesos, Biorreactores y Modelamiento matemático*. Obtenido de La Genoteca: <https://lagenoteca.com/articulos/bioprocesos-biorreactores-y-modelamiento-matematico/>
- Guerra, C. L. (2018). *Caracterización morfológica y molecular de Alternaria alternata hongo fitopatógeno causante del secamiento descendente del cáliz, en frutos de Physalis peruviana en la Sierra centro-norte del Ecuador*. Obtenido de Pontificia Universidad Católica del Ecuador: <http://repositorio.puce.edu.ec/bitstream/handle/22000/14682/Carolina%20Bosquez%20disertaci%20c3%29b3n%20final.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Herrera, F. A. (14 de Diciembre de 2016). *Aislamiento, Caracterización Molecular y Análisis de Patogenicidad de Alternaria spp. sobre botones de Rosa (Rosa sp) y plantas de brócoli (Brassica oleracea var. Italica)*. Obtenido de Universidad San Francisco de Quito: <https://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/6158/1/128912.pdf>
- insst. (10 de Febrero de 2022). *Alternaria spp.* Obtenido de insst: <https://www.insst.es/agentes-biologicos-basebio/hongos/alternaria-spp#:~:text=Alternaria%20es%20un%20hongo%20filamentoso,de%20forma%20alargada%20u%20ovoide.>
- Ixta, S. H., & Hernández, J. C. (2019). *Biorreactores: Protagonistas de los bioprocesos*. Obtenido de Sabermás: <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/tecnologia/519-numero-58/1016-biorreactores-protagonistas-de-los-bioprocesos.html>
- Jiménez, J. I. (2022). *EVALUACIÓN IN VITRO DE AISLADOS DE Trichoderma spp. SOBRE EL CRECIMIENTO DE Alternaria sp., EN Selenicereus sp. (PITAHAYA), EN LA JOYA DE LOS SACHAS*. Obtenido de Escuela Superior Politécnica de Chimborazo: <https://repositorio.iniap.gob.ec/bitstream/41000/5826/1/TESIS%20J.%20JIM%20C3%29NEZ%20CU MBICUS.pdf>
- LABSTER THEORY. (29 de Octubre de 2021). *Reactivos utilizados en la tinción de Gram*. Obtenido de LABSTER THEORY: <https://theory.labster.com/reagents-es/>

- Macías, M. (Enero de 2020). *ALTERNARIA: ALTERACIONES POSTCOSECHA EN FRUTAS*. Obtenido de Universidad de Extremadura:
https://dehesa.unex.es/bitstream/10662/10973/1/TFMUEX_2020_Macias_Miranda.pdf
- Martinez, D. F. (2019). *Diseño y construcción de un biorreactor tipo Fed Batch para fines experimentales*. Obtenido de Repositorio Universidad Santo Tomas:
<https://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/18145/2019diegomartinez?sequence=11&isAllowed=y>
- Mejía, M., Cristóbal, J., Tun, J., & Reyes, A. (2016). *Actividad in vitro de Bacillus spp. en la inhibición de crecimiento micelial de Fusarium equiseti Y Fusarium solani aislado de chile habanero (Capsicum chinense Jacq.)*. Obtenido de Scielo:
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952016000801123
- Millas, P., & Tapia, E. (1 de Octubre de 2020). *Bacillus: bacterias clave para el futuro de la sanidad vegetal en contexto de cambio climático*. Obtenido de INIA:
<https://biblioteca.inia.cl/bitstream/handle/20.500.14001/67190/NR42371.pdf?sequence=4>
- Nuero, O. M. (1995). *ESTUDIO BIOQUÍMICO DE P-1,3-GLUCANASAS DE Aspergillus nidulans PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici raza 2*. Obtenido de Universidad Complutense de Madrid: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/2145/1/T20714.pdf>
- Ñacato, C., & Valencia, M. F. (Marzo de 2016). *AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PRUEBAS in vitro DE CEPAS AUTÓCTONAS DE Bacillus subtilis COMO AGENTE DE BIOCONTROL DE Alternaria spp EN Brassica oleracea var.italica*. Obtenido de dspace.ups:
<https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/12144/1/UPS-QT09671.pdf>
- Pavón, M. Á., González, I., Martín, R., & García, T. (Enero de 2015). *Importancia del género Alternaria como patógeno de cultivos vegetales (I)*. Obtenido de Phytoma:
https://www.phytoma.com/images/pdf/265_ENERO_2015_TT_fitopatologia_alternaria.pdf
- Pedraza, L. A., López, C. E., & Uribe, D. (Abril de 2020). *MECANISMOS DE ACCIÓN DE Bacillus spp. (Bacillaceae) CONTRA MICROORGANISMOS FITOPÁTOGENOS DURANTE SU INTERACCIÓN CON PLANTAS*. Obtenido de Scielo:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2020000100112
- Rios, C., Caro, J., Berlanga, D., Ruiz, M., Ornelas, J., Salas, M., & Guerrero, V. (2016). *Identificación y actividad antagónica in vitro de aislados de Bacillus spp. y Trichoderma spp. contra hongos fitopatógenos comunes*. Obtenido de Scielo: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0185-33092016000100085&script=sci_arttext&tlng=es
- Rivas, L. M., & Mühlhauser, M. (Octubre de 2014). *Alternaria spp.* Obtenido de Scielo:
https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182014000500013

- Romero, A. A. (Enero de 2016). *Desarrollo de un programa de computador para el diseño del proceso de producción por lotes de la levadura Saccharomyces cerevisiae*. Obtenido de Escuela Politécnica Nacional: <https://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/20258/1/CD%209709.pdf>
- Saldaña, J. (Febrero de 2021). *Control de hongos patógenos con Bacillus subtilis y Trichoderma koningii en un cultivo de fresa en condiciones de campo*. Obtenido de tesis.ipn: <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/30374/Tesis-Jorge%20Salda%c3%b1a%20Jaramillo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Sánchez, A. M., Vayas, .. T., Mayorga, F., & Freire, C. (2020). *Producción de Brócoli en Ecuador*. Obtenido de Universidad Técnica de Ambato: https://fca.uta.edu.ec/v4.0/images/OBSERVATORIO/dipticos/Diptico_N38.pdf
- Sarti, G. (Julio de 2019). *METABOLITOS CON ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA PRODUCIDOS POR EL*. Obtenido de UCES: http://dspace.uces.edu.ar:8180/xmlui/bitstream/handle/123456789/5377/Metabolitos_Sarti.pdf?sequence=1
- Serrat, M., & Méndez, A. A. (2015). *Construcción y Validación Experimental de un Biorreactor Artesanal Tipo Tanque Agitado para Fermentaciones Sumergidas a Escala de Laboratorio*. Obtenido de Scielo: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-61852015000300010
- Soria, S., Alonso, R., & Bettucci, L. (s.f.). *Bacillus subtilis COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO*. Obtenido de ainfo inia: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/12558/1/SAD629P37-39.pdf>
- Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. (Agosto de 2012). *Antagonismo de Bacillus spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo del arroz (Oryza sativa L.)*. Obtenido de Scielo: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522012000200008
- Valenzuela, V., Gálvez, G., Villa, E., Parra, F., Santoyo, G., & Santos, S. d. (15 de Marzo de 2021). *Lipopéptidos producidos por agentes de control biológico del género Bacillus: revisión de herramientas analíticas utilizadas para su estudio*. Obtenido de Scielo: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342020000200419
- Vallejo, O. E. (2019). *EFECTO DE TRES CONCENTRACIONES DEL RESIDUO DEL ENDULZADO DE CHOCHO SOBRE Alternaria sp y Brevicorine brasicae L. (PULGÓN) EN EL CULTIVO DE BRÓCOLI (Brassica oleracea L.) EN LABORATORIO*. Obtenido de Escuela Politécnica De Chimborazo: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/10355/1/13T0871.pdf>
- Velásquez, O. (Octubre de 2018). *Aislamiento, selección y evaluación de microorganismos controladores biológicos de Botrytis sp*. Obtenido de UNAD: <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/21043/80100966.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Villarreal, M. F., Villa, E., Cira, L. A., Estrada, M. I., Parra, F. I., & Villalobos, S. d. (Abril de 2018). *El género Bacillus como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola*. Obtenido de Scielo: https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092018000100095

Yesid, A., & Ligia, S. (Diciembre de 2012). *Determinación de metabolitos secundarios a partir de Bacillus subtilis efecto biocontrolador sobre Fusarium sp.* Obtenido de Scielo: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-24702012000200002

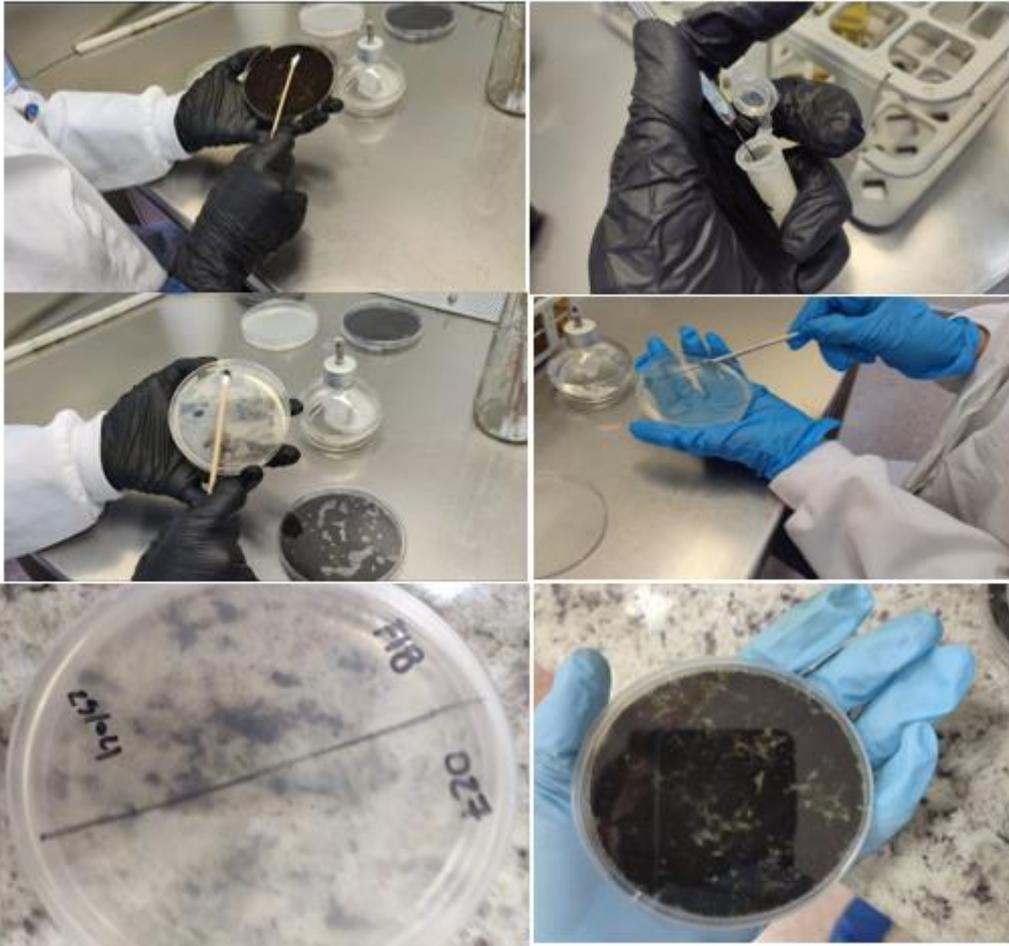
The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity - Scientific Figure on ResearchGate. Available from: https://www.researchgate.net/figure/Figura-3-Principales-mecanismos-de-control-biologico-del-genero-Bacillus-Produccion-de_fig7_322259714 [accessed 18 Apr, 2023]

Miizumoto. (2006). Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd desidue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state ermentation. *Appl Microbiol Biotechnology*. 869-875.

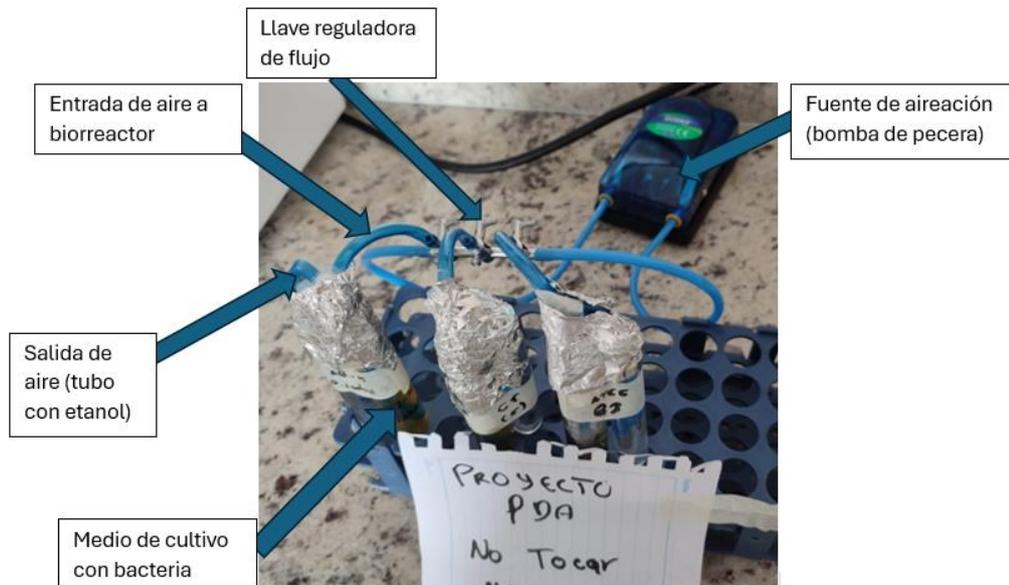
Díaz R Gamazo C y López Goñi I. (1999). *Manual práctico de microbiología*. Edición Masson

8. Anexos

Anexo 1 Siembra de cepas de interés (*Bacillus* y *Alternaria* sp.)



Anexo 2. Biorreactores de tipo Bach Aireado

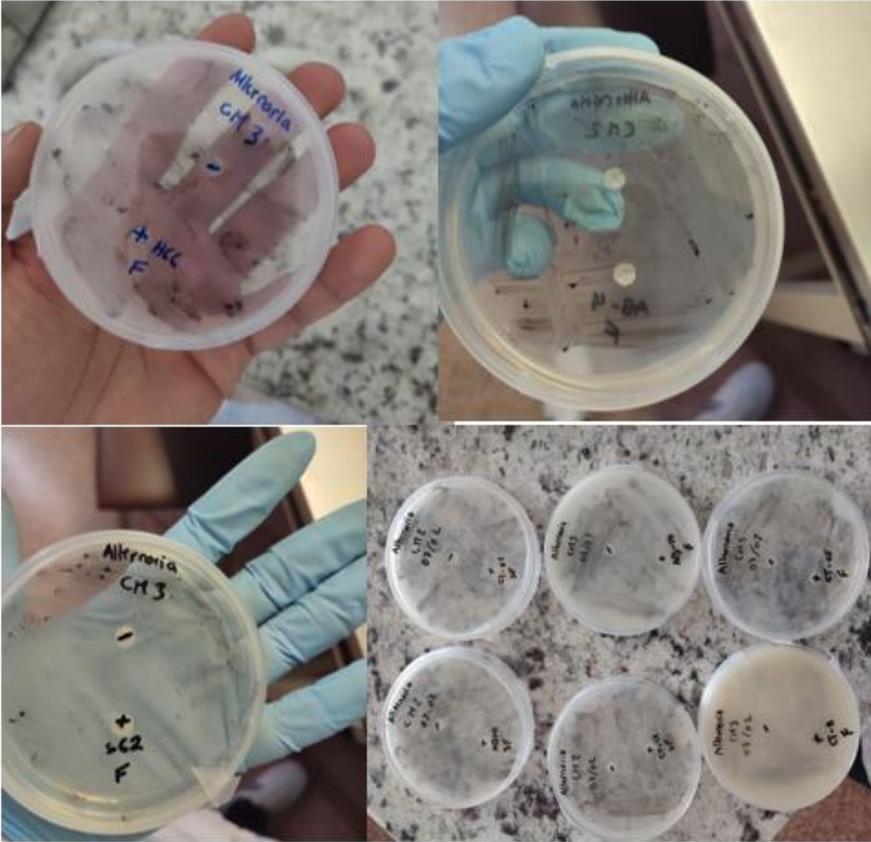




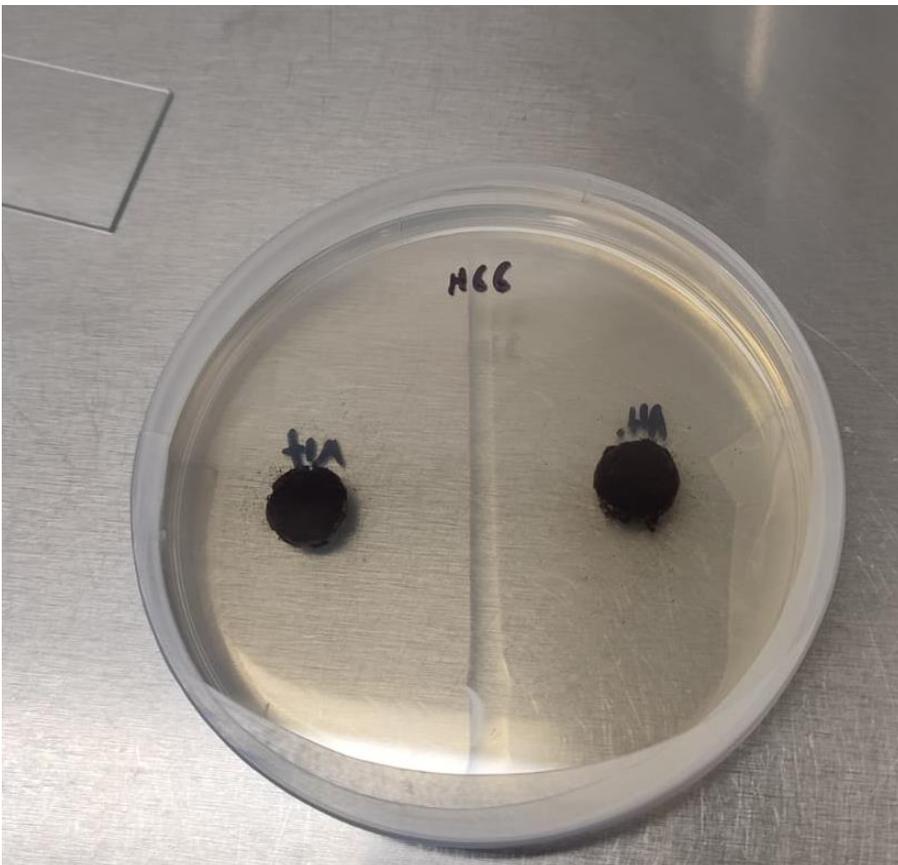
Anexo 3. Extracción de Metabolitos

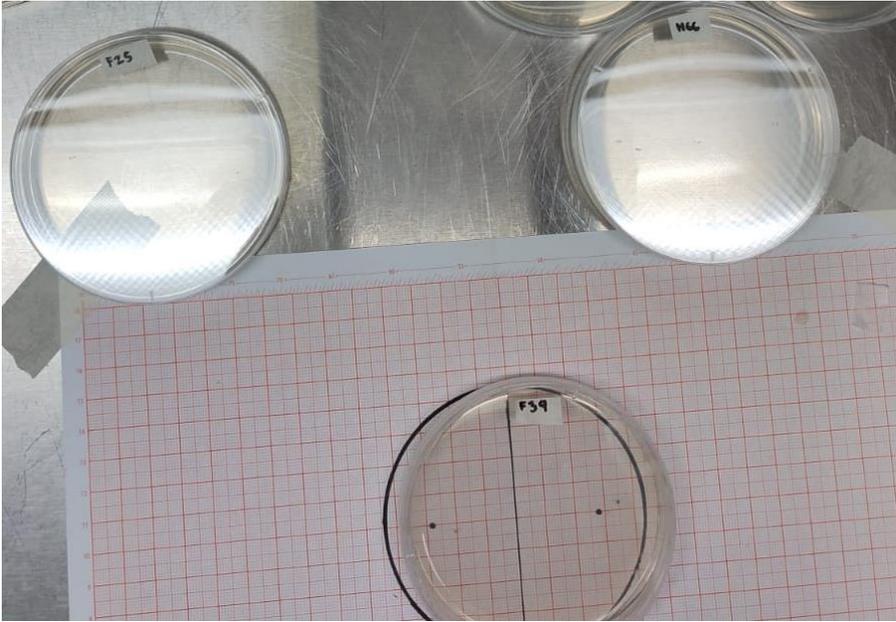


Anexo 4. Antibiograma



Anexo 5. Enfrentamientos disco y en punta





Anexo 6. Antibiosis positiva



