UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

SEDE QUITO

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE CEPAS DE *Bacillus spp.*, EN EL CONTROL DE *Fusarium oxysporum*

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

Ingeniera en Biotecnología.

AUTOR: MARÍA LIZBETH ORTEGA CUENCA

TUTOR: RAMIRO DANIEL ACURIO VÁSCONEZ

Quito-Ecuador

2024

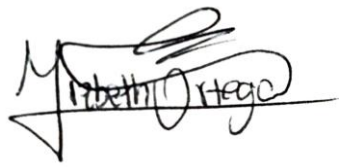
CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, María Lizbeth Ortega Cuenca con documento de identificación N° 1726793746 manifiesto que:

Soy la autora responsable del presente trabajo; y, autorizo 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, 5 de agosto del año 2024.

Atentamente,



María Lizbeth Ortega Cuenca

1726793746

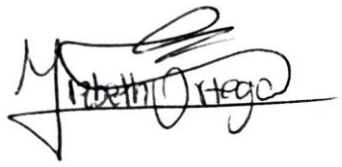
CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA

Yo María Lizbeth Ortega Cuenca con documento de identificación N° 1726793746, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos primordiales en virtud de que soy autora del trabajo experimental: "**Evaluación *in vitro* de cepas de *Bacillus spp.*, en el control de *Fusarium oxysporum*",** el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingeniera en Biotecnología en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

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

Quito, 5 de agosto del año 2024.

Atentamente,



María Lizbeth Ortega Cuenca

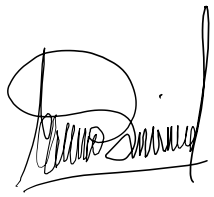
1726793746

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: **EVALUACIÓN *IN VITRO* DE CEPAS DE *Bacillus spp.*, EN EL CONTROL DE *Fusarium oxysporum***, realizado por María Lizbeth Ortega Cuenca con documento de identificación N° 1726793746, 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, 5 de agosto del año 2024.

Atentamente,



Ing. Ramiro Daniel Acurio Vásconez. MSc.

DEDICATORIA

María Lizbeth Ortega Cuenca

Dedico este logro a Dios, a Gladys y Luis mis queridos padres, a mi tío Ángel por su apoyo incondicional, sus consejos sabios y su fe inquebrantable en mí. Ustedes me han enseñado el valor del esfuerzo, la perseverancia y la integridad. Sin su amor y su sacrifico este logro no hubiera sido posible.

A mis queridos amigos, gracias por estar a mi lado en cada paso de este camino.

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, Agrocalidad, por haberme brindado la oportunidad de utilizar sus instalaciones, equipos y reactivos necesarios, para la realización de mi trabajo experimental, en especial al Laboratorio de Fitopatología.

De igual forma agradezco personalmente al Ing. Jairo Guevara, al Ing Hernando Regalado y al PhD Diego Jauregui por haberme guiado y brindarme su apoyo conocimiento y tiempo.

Al MSc. Daniel Acurio le agradezco por el apoyo brindado como mi tutor de tesis.

¡Gracias!

Lizbeth Ortega

RESUMEN

La amplía superficie agrícola del Ecuador (5,1 millones de hectáreas), distribuida en diferentes zonas geográficas, cada una de ellas con sus propias características climáticas donde se desarrollan cultivos desde los trópicos hasta zonas altas, estas áreas producen y exportan productos no petroleros tales como el banano, cacao, flores etc. Los cuales se ven amenazados por la patogénesis del hongo *F. oxysporum*, este hongo ocasiona pérdidas económicas en muchos países. El biocontrol de enfermedades en plantas con microorganismos antagonistas es una estrategia útil para aminorar el uso de plaguicidas en la agricultura y disminuir costos de producción e impacto ambiental. En este estudio se utilizaron dos cepas conservadas de la Universidad Politécnica salesiana (CT11 y Bs) y un aislado fúngico del Laboratorio de Fitopatología - AGROCALIDAD (FP-24-0190) las cuales fueron caracterizadas mediante indicadores morfológicos, bioquímicos y moleculares para su identificación y confirmación, obteniendo como resultado el diagnóstico de *Fusarium oxysporum* mediante primers específicos y la confirmación de dos cepas de *B. megaterium* y una cepa de *B. subtilis* mediante secuenciación. Estas cepas (CT11 y Bs) se utilizaron para los ensayos de evaluación *in vitro* del porcentaje de inhibición mediante siembra duales, teniendo como resultado que los tratamientos T1 y T2, presentaron un porcentaje de inhibición del 34,32% y 42,54% respectivamente, por lo tanto, se concluye que la cepa de *B. subtilis* (T2), presenta mejor antagonismo en contraste con *B. megaterium* (T1). Estos resultados permiten establecer que es factible el uso de las cepas evaluadas para el control de *Fusarium oxysporum.*

Palabras clave: *Bacillus, Fusarium,* antagonismo, porcentaje de inhibición.

ABSTRACT

The large agricultural area of Ecuador (5.1 million hectares), distributed in different geographical areas, each with its own climatic characteristics where crops are grown from the tropics to highlands, these areas produce and export non-oil products such as bananas, cocoa, flowers etc. These products are threatened by the pathogenesis of the fungus *F. oxysporum*, which causes economic losses in many countries. Biocontrol of plant diseases with antagonistic microorganisms is a useful strategy to reduce the use of pesticides in agriculture and to reduce production costs and environmental impact. In this study, two conserved strains from the Salesian Polytechnic University (CT11 and Bs) and a fungal isolate from the Phytopathology Laboratory - AGROCALIDAD (FP-24-0190) were used, which were characterized by morphological, biochemical and molecular indicators for identification and confirmation, resulting in the diagnosis of *Fusarium oxysporum* by specific primers and the confirmation of two strains of *B. megaterium* and one strain of *B. subtilis* by sequencing. These strains (CT11 and Bs) were used for the in vitro evaluation tests of the percentage of inhibition by means of dual sowing, with the result that treatments T1 and T2 presented a percentage of inhibition of 34.32% and 42.54% respectively, therefore, it is concluded that the strain of *B. subtilis* (T2), presents better antagonism in contrast to *B. megaterium* (T1). These results allow establishing that the use of the evaluated strains for the control of *Fusarium oxysporum* is feasible.

Key words: *Bacillus, Fusarium*, antagonism, percentage inhibition**.**

Tabla de contenido

1. Introducción 1

1. Fundamentación teórica 4

1.1 Género *Bacillus* 4

A. *Bacillus megaterium* 4

B. *Bacillus subtilis* 5

1.1.1 Distribución geográfica 6

1.1.2 Ciclo de vida 7

1.1.3 Control biológico 8

1.1.4 Métodos de identificación 11

A. Identificación macroscópica 11

B. Características culturales, morfología celular y formación de esporas 11

C. Reacción de Gram 12

D. Pruebas bioquímicas 13

E. Métodos moleculares 13

1.2 Género Fusarium 14

1.2.1 *Fusarium oxysporum* 14

1.2.2 Ciclo de la enfermedad 16

1.2.3 Métodos de control de la enfermedad 18

1.2.4 Métodos de identificación de *Fusarium* 19

1.3* Pruebas de antagonismo entre *Bacillus y Fusarium 20

2. Materiales y métodos 22

2.1 Ubicación del ensayo 22

2.2* Siembra, masificación y conservación de los aislados de *Bacillus* y *Fusarium

22

2.2.1 Siembra de bacterias y hongos 22

2.2.2 Conservación de hongos y bacterias 22

2.2.3 Masificación del hongo y bacteria 23

2.3* Pruebas de diagnóstico de aislados de *Bacillus* y *Fusarium 23

2.3.1 Identificación macroscópica 23

2.3.2 Tinción Gram y pruebas bioquímicas para la identificación de *Bacillus* . 23

A. Tinción Gram 24

B. Prueba de la catalasa 24

C. Crecimiento anaeróbico 24

D. Crecimiento a 50 °C 24

E. Crecimiento en 7% NaCl 25

F. Prueba de nitrato 25

G. Hidrolisis de almidón 25

H. Ácido y gas en glucosa 25

I. Ácido de glucosa 26

J. Hidrolisis de caseína 26

2.3.3 Identificación morfológica de *Fusarium* 26

2.3.4 Evaluación de perfil metabólico de bacterias mediante el sistema de identificación BIOLOG 26

2.3.5 Extracción de ADN de *Fusarium* y *Bacillus* 27

2.3.6 Cuantificación de ADN de *Fusarium* y *Bacillus* 28

2.3.7 Amplificación de secuencias del gen 16S (*Bacillus*) e ITS (*Fusarium*) del ADN ribosomal 29

2.3.8 Electroforesis de productos de PCR 30

2.3.9 Secuenciación 30

2.4 Pruebas de antagonismo *(Bacillus-Fusarium oxysporum*) mediante siembra duales 30

2.5 Análisis estadístico 31

3. Resultados y Discusión 33

3.1 Siembra, masificación de los aislados de *Bacillus* y *Fusarium* 33

3.1.1 Siembra de los microorganismos 33

3.1.2 Masificación y conservación de los microorganismos 34

3.2. Pruebas de diagnóstico de aislados de *Bacillus* y *Fusarium* 34

3.2.1 Identificación macroscópica 34

3.2.2 Tinción Gram y pruebas bioquímicas para la identificación de *Bacillus* 35

3.3. Identificación morfológica de *Fusarium* 36

3.4. Evaluación de perfil metabólico de bacterias mediante el sistema de identificación BIOLOG 37

3.5. Cuantificación de ADN de *Fusarium* y *Bacillus* 38

3.6. Amplificación de secuencias del gen 16S (*Bacillus*) e ITS (*Fusarium*) del ADN ribosomal 39

3.8. Secuenciación 40

3.9. Pruebas de antagonismo *(Bacillus-Fusarium oxysporum*) mediante siembra duales 40

3.10. Análisis estadístico 41

4. Conclusiones y Recomendaciones 44

Conclusiones 44

Recomendaciones 44

5. Bibliografía 45

6. Anexos 52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Especie del género *Bacillus* que son considerados como un enemigo natural para otros microorganismos. 10

Tabla 2 Determinación de la singularidad presente en las cepas de *Bacillus*..... 13

Tabla 3 Esquema ANOVA 32

Tabla 4 Singularidad metabólica de las cepas de *Bacillus*. 36

Tabla 5 Identificación de los aislados de *Bacillus* mediante el sistema de identificación microbiana BIOLOG. 37

Tabla 6 Valores de pureza en muestra de ADN 38

Tabla 7 Secuenciación de productos PCR 40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esporas y morfología de aislados bacterianos 6

Figura 2 Ubicación geográfica referencial de cepas de *Bacillus*..... 7

Figura 3 Ciclo de esporulación de *B. subtili*s. Esquema simplificado de las etapas claves del ciclo. 8

Figura 4 Características morfológicas de las colonias en medio de cultivo. 11

Figura 5 Distribución geográfica d*e Fusarium oxysporum* 15

Figura 6 Ciclo de la enfermedad del marchitamiento del tomate causado por *F. oxysporum* f. sp. licopersici. 18

Figura 7 Formula porcentaje de inhibición. 31

Figura 8 Morfotipos de aislados fúngicos y de las bacterias desarrollados en medios de cultivos. 33

Figura 9 Ensayos de masificación y conservación de los aislados fúngicos y bacterianos caracterizados. 34

Figura 10 Morfología de aislados bacterianos desarrollados en agar nutritivo. 35

Figura 11 Esporas bacterianas fotografiadas a 40x. 35

Figura 12 Estructuras fúngicas fotografiadas a 40x. 37

Figura 13 Productos de PCR en gel de agarosa (1,5%). 39

Figura 14 Pruebas de antagonismo de *Bacillus-Fusarium oxysporum* 41

Figura 15 Porcentaje de inhibición de la cepa fúngica (FP-24-0190), en cultivo dual con cepas bacterianas (T1 y T2) y un control (T3). 42

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1 Convenio específico..... 52

1. Introducción

En la actualidad en nuestro país, existen varios cultivos de interés comercial y agrícola, la superficie de labor agropecuaria en el año 2023 fue de 5,1 millones de hectáreas, distribuidos de la siguiente manera; 1.380.405 hectáreas poseen cultivos permanentes (banano, plátano, caña de azúcar, palma africana, flores, palmito, tomate de árbol, uva, uvilla, pimienta, piña, pitahaya, mango, etc.) y 812.294 hectáreas son de cultivos transitorios y barbecho (arroz, maíz, papa, hortalizas, legumbres, etc.), 2.323.582 hectáreas son de pastos cultivados y 617.688 hectáreas pertenecen a pastos naturales (la Costa concentra el 55,2 % de la superficie total). Dentro de los cultivos permanentes el cacao posee el más alto porcentaje de superficie plantada (42,2 %), seguido de palma africana (13,4%), banano (12,7%) y otros cultivos permanentes (31,7%) (INEC, 2023).

Todos los cultivos agrícolas mencionados anteriormente se ven afectados por la patogénesis de *Fusarium,* su incidencia limita mucho la producción y comercialización de estos cultivos, este género ha adquirido una amplia distribución mundial y representa una amenaza significativa para la agricultura en todo el mundo (Abdelmoteleb et al., 2023). Este patógeno es conocido por causar la enfermedad de la pudrición de la raíz en varios cultivos (Wachid & Sutarman, 2019), la importancia de este género se refleja en la existencia de especies complejas y su capacidad para adaptarse a varios hospederos (Sampaio et al., 2021), se conocen más de 100 formas especiales, que inducen diferentes síntomas, el proceso infectivo inicia con el ingreso del patógeno al tejido vascular afectando el suministro de agua, repercutiendo en la turgencia de las hojas y brotes; produce signos de marchitez, clorosis, amarillamiento y caída prematura, si en la planta estos síntomas se incrementan, la planta muere finalmente (Agrios, 2005).

El control de este patógeno en los cultivos agrícolas, se lo realiza mediante el uso indiscriminado de varios principios activos registrados, los cuales tienen incidencia en la

contaminación ambiental y en la calidad del producto exportado. Actualmente, existe una amplia gama de formulados biológicos empleados en el control y prevención de enfermedades, los cuales se basan en la aplicación de microorganismos antagonistas, que van acorde a las Buenas Prácticas Agrícolas y al desarrollo de ambientes más saludables. Los microorganismos mayormente empleado en el control biológico de enfermedades, son las bacterias del género *Bacillus* pertenecientes a la familia Bacillaceae, considerada una familia de bacterias bioquímicamente activas ya que son bacilos Gram positivos que producen endosporas resistente a las diferentes condiciones ambientales; una de las especies más importantes con propiedades antagónicas es *Bacillus subtilis*, esta bacteria presenta una mayor eficiencia *in vitro* en el control de más de 23 fitopatógenos diferentes (Agrios, 2005; Alonso et al., 2017).

El biocontrol del género *Bacillus*, posee varios mecanismos tales como: antibiosis directa (produce compuestos lipopeptídicos como iturina, surfactina y fengicina), estimulación del crecimiento vegetal y la inducción de resistencia sistémica de las plantas hospedantes (mediante la producción de sustancias volátiles, incluidos alcoholes, aldehídos sulfuros y cetonas). Este género, se considera ideal por su rápido crecimiento, facilidad de manejo y excelentes propiedades colonizadoras (Dimkić et al., 2022). La actividad biocontroladora mediante la producción de sustancias (antibióticos) con amplio espectro de actividad antagónica convierte a este género en una alternativa prometedora en la gestión de problemas causados por hongos fitopatógenos, como por ejemplo la enfermedad producida por la especie *Fusarium oxysporum* (Alonso et al., 2017).

Varios aislados de *Bacillus* spp., han sido desarrollados como biocontroladores de plagas y patógenos vegetales, pero sigue siendo un considerable desafío la exploración e identificación de rasgos implicados en la capacidad de control y la determinación de los niveles suficientes para ejercer efectos sobre el crecimiento de las plantas, competir

efectivamente con los microrganismos endémicos, interactuar cooperativamente con otros miembros beneficiosos de la biota rizosférica. El comprender estos mecanismos permitirá la identificación de nuevas cepas compatibles con los sistemas de cultivo (Kumar et al., 2011).

Al conocer la importancia del control biológico del hongo *Fusarium oxysporum*, mediante el uso de bacterias del género *Bacillus* el Laboratorio de Fitopatología (AGROCALIDAD) en función de indicadores morfológicos, perfiles metabólicos y moleculares, caracterizó dos cepas de *Bacillus* y una de *Fusarium*, estas cepas se emplearon en bioensayos *in vitro*, permitiendo evaluar la capacidad antagónica de la bacteria mediante la aplicación de cultivos duales, los resultados obtenidos permitieron aceptar la hipótesis de la presencia de antagonismo entre las cepas (Agrocalidad, 2018).

1. Fundamentación teórica

1.1 Género *Bacillus*

Los miembros del género *Bacillus* y afines (Firmicutes) son organismos que con algunas excepciones son capaces de producir endosporas (*B. thermoamylovorans* y *B. halodenitrificans*), algunas tienen forma de bastón (*Halobacillus halophilus*), y pueden crecer aeróbicamente y de manera similar organismos anaerobios estrictos también se incluyen dentro del taxón. La mayoría son móviles y Gram-positivas de bajo Guanina + Citosina, sin embargo, se han asignado varias especies Gram-negativos (*B. thermosphaericus, B. horti, B. oleronius y B. azotoformans*) o que se tiñen sólo débilmente positivamente (Henrique et al., 2022). Este género abarca más de 60 especies con una gran diversidad genética, los cuales se pueden dividir en 7 grupos (Grupo II, incluye *B. megaterium*, entre otros*; Grupo VI B. subtilis* entre otros), basados en la filogenia del ARNr 16S o características fenotípicas, respectivamente (Priest, 1989; Xu & Côté, 2003).

A continuación, se describen características morfológicas y bioquímicas de las especies utilizadas en esta investigación:

A. *Bacillus megaterium*

Bacilos aeróbicos, Gram positivos, móviles, células grandes 1,2–1,5 por 2,0 a 5,0 μm, que se presentan solos, en pares y cadenas, formando esporas elipsoidales y a veces esféricas que se localizan central, paracentral o subterminalmente y que no hinchan los esporangios (ver A y B **Figura 1**). Células cultivadas en agar glucosa producen grandes cantidades de material de almacenamiento, dando una apariencia vacuolada o espumosa, presentan colonias brillantes, redondas a irregulares y tienden a ondular los márgenes. La temperatura mínima para crecimiento 3–15 °C, máximo 35–45 °C, con el óptimo

alrededor de 30°C; catalasa positiva; hidroliza la caseína, gelatina y almidón la mayoría de las cepas desamina la fenilalanina; la degradación de la tirosina es variable; la mayoría de las cepas crecen en presencia de 7% de NaCl (sin crecimiento al 10%), el citrato se utiliza como única fuente de carbono; la mayoría de las cepas no reducen el nitrato; se produce ácido sin gas de la glucosa y de una amplia gama de carbohidratos (Logan & Vos, 2015).

B. *Bacillus subtilis*

Aerobio, de bastones generalmente de 0,7-0,8 por 2,0-3,0 µm, Gram positivos, el protoplasma de células cultivadas en agar glucosa se tiñe uniformemente, en su mayoría móviles, tienen flagelos periticos largos y abundantes; espora elipsoidal o cilíndrica, central o paracentral, esporangios distendidos ligeramente (ver C y D **Figura 1**); temperatura máxima de crecimiento 45-55 °C; temperatura mínima 5-20 °C. Reacciones positivas a catalasa, Voges-Proskauer (variable a VP con pH de 5,0-8,0); crecimiento en 7 % NaCl (variable a NaCl 10 %) y a pH 5,7; producción de ácido de glucosa, arabinosa, xilosa y manitol; hidrólisis de almidón; utilización de citrato como fuente de carbono; reducción de nitrato a nitrito; procesamiento de caseína y digestión alcalina de la leche de tornasol. Reacciones negativas a yema de huevo, utilización de propionato, degradación de la tirosina, la formación de un pigmento negro soluble en agar glucosa o agar tirosina y la hidrólisis de hipurato lo realiza después de 4 semanas a 28 °C (Logan & Vos, 2015).

Esporas y colonias desarrolladas en medios de cultivo

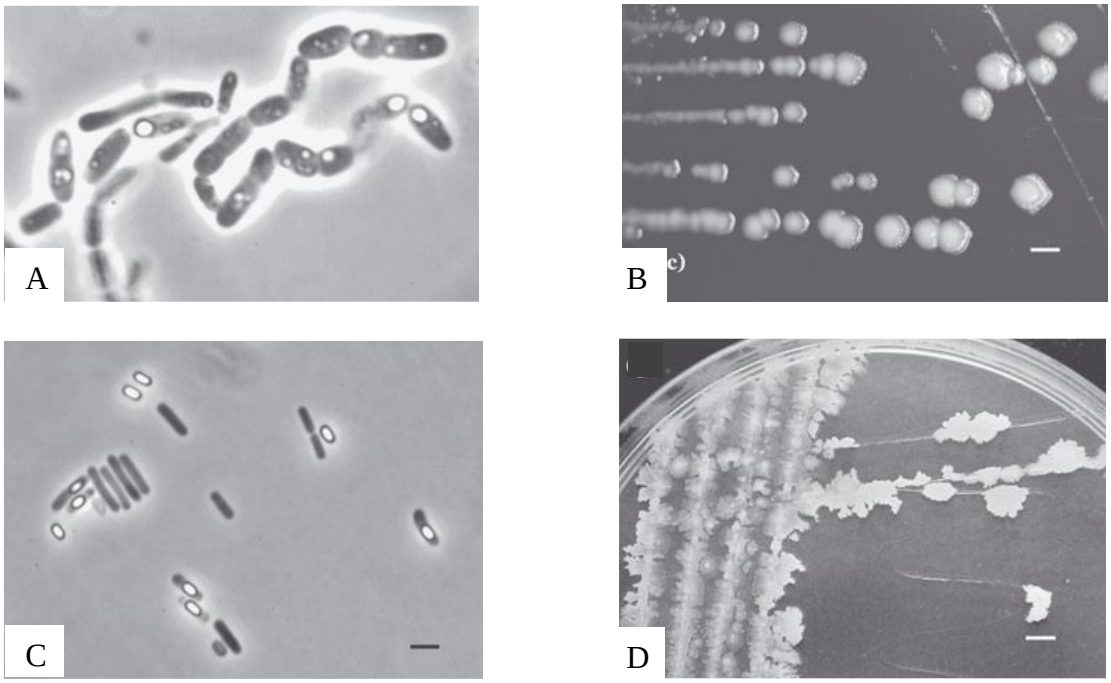


Figura 1 Esporas y morfología de aislados bacterianos.

Nota: Espora (A) y colonia (B) de *B.megaterium* en agar sangre; espora (C) y colonia (D) de *B. subtilis* en agar nutritivo; incubadas a 37 °C por 24-36 horas.

Fuente: A, (Saint-Pierre et al., 2023) ;B, (Yuan et al., 2012) ;C-D (Logan & Vos, 2015).

1.1.1 Distribución geográfica

En la **Figura *2*** se puede apreciar la distribución geográfica de los géneros, *B. subtilis*, *B. B. megaterium* información obtenida de reportes generados en diferentes países y publicados por el Centro de Biociencia Agrícola Internacional (Centre for Agricultural Bioscience International - CABI). La ausencia de un registro en el mapa no significa necesariamente que la especie esté ausente de ese país o región; puede darse el caso de que la información para esas áreas no esté disponible (CABI, 2021).

Distribución geográfica de las cepas de *Bacillus*

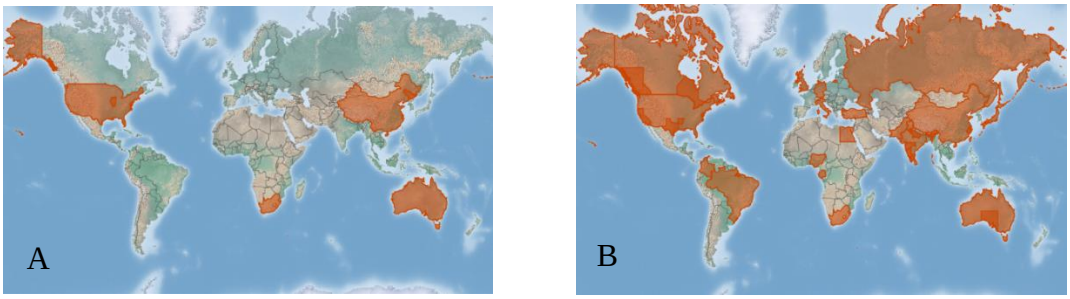


Figura 2 Ubicación geográfica referencial de cepas *de Bacillus.*

Nota: A: *Bacillus megaterium*, B: *Bacillus subtilis*

Fuente: (CABI, 2021).

1.1.2 Ciclo de vida

En el ciclo de vida del género *Bacillus* la formación de endosporas resistentes, es una estrategia de supervivencia en presencia de algún tipo de estrés (alta densidad de población, escasez de nutrientes, salinidad, temperatura, pH, entre otros), esto le permite la diseminación y prevalencia en los nichos ecológicos. El proceso de formación de endosporas se realiza en la segunda fase del ciclo de vida (ver **Figura *3***); durante la primera fase (crecimiento vegetativo), la bacteria crece exponencialmente (fisión binaria), ya que las condiciones son favorables para su desarrollo. En la segunda fase la célula vegetativa inicia la formación de la endospora, este proceso se ha dividido en siete estadios basados en los cambios citológicos y requiere de 6 a 8 horas. Entre el estadio 0 y el estadio II (o el III) se llevan a cabo muchas de las respuestas adaptativas, durante la transición del estadio II al estadio III, la célula madre, engulle a la preespora, a partir del estadio III la expresión genética ocurre por separado en ambos compartimentos, en el estadio IV inicia el primordio de la pared celular de la espora y la formación de la corteza, la deposición de la cubierta de la espora se realiza en el estadio V, en el VI se produce la

maduración de la corteza y la cubierta (ver **Figura 3**). Por último, en el estadio VII se libera la espora madura, por lisis de la célula madre (Errington, 2003).

Ciclo de reproducción de la especie de *Bacillus subtilis*

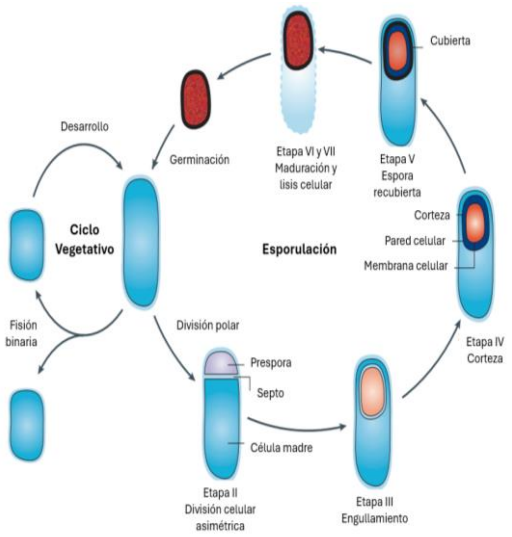


Figura 3 Ciclo de esporulación de *B. subtilis.* Esquema simplificado de las etapas claves del ciclo.

Fuente: Modificado de (Errington, 2003).

1.1.3 Control biológico

Especies de *Bacillus*, aislados en campos agrícolas, contribuyen a la productividad de los cultivos directa o indirectamente, sus rasgos fisiológicos, como pared celular multicapa, endosporas resistente, secreción de antibióticos peptídicos, moléculas y enzimas extracelulares, permiten su supervivencia en condiciones ambientales adversas durante largos períodos de tiempo; la capacidad potencial como inductores de la resistencia sistémica (varias cepas de especies de *B. amyloliquefaciens, B. subtilis, B. pasteurii, B. cereus, B. pumilus, B. mycoides*, y *B. sphaericus*) permiten la reducción de la incidencia o gravedad de diversas enfermedades en diversos huéspedes (Kumar et al., 2011).

Los procesos de antibiosis relacionado con la síntesis de sustancias tales como; surfactina (lipopéptido surfactante) producido por *B. subtilis* contra la infección causada por

Pseudomonas syringae en *Arabidopsis thaliana*, sugiere que la surfactina era necesaria no sólo para la colonización de las raíces sino que también proporcionó protección contra el patógeno, de igual manera *B. subtilis* tiene la capacidad de producir péptidos antifúngicos que muestran similitud con la bacilomicina (grupo iturina A). Así mismo *B. amyloliquefaciens* (cepa A1Z aislada de la rizosfera de soja) produce sustancias similares a iturina, compuestos que inhibieron con éxito tres hongos taxonómicamente diversos (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum*). Otras investigaciones demostraron la participación de los antibióticos iturina y fengicina de cuatro cepas de *B. subtilis* (UMAF6614, UMAF6616, UMAF6639 y UMAF8561) en la supresión del oídio de cucurbitáceas causado por *Podosphaera fusca* (Kumar et al., 2011; Zeigler & Perkins, 2008).

Las sustancias químicas secretadas por *Bacillus* durante la esporulación y las etapas de desarrollo estacionarias para controlar enfermedades de plantas son; bacitracina (*B. subtilis* y *B. licheniformis)* kanosamina, fengicina o plipastatina, surfactinas, zwittermicina A, kurstakin, gramicidina e iturinas. La kanosamina es un compuesto antibiótico que tiene un alto efecto inhibidor sobre los patógenos fúngicos de los oomicetos y un efecto moderado sobre ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos y algunas bacterias. Se informó sobre la producción de kanosamina en varias especies de *Bacillus*, incluida *B. pumilus, B. subtilis o B. cereus*. Fengycin A y B (antibióticos lipopeptídicos plipastatinares) desempeñaron un papel muy activo en el control larvas de mosquitos y fitopatógenos al descomponer su estructura celular y permeabilidad de la membrana celular; estos antibioticos son sintetizados por varios *Bacillus* incluyendo *B. amyloliquefaciens, B. subtilis y B. licheniformis* (Khan et al., 2022).

El termino enemigo natural hace referencia a todo organismo que limita el desarrollo normal de otro dentro de un mismo nicho ecológico, este organismo (enemigo natural)

tienen interés económico en el campo de la agricultura, ya que se utilizan como agentes de control biológico de plagas. A continuación, se presentan algunos microorganismos para los cuales los géneros, *B. subtilis, y B. megaterium* son considerados como enemigos naturales (ver **Tabla *1***), esta información pertenece a reportes generados en diferentes países y publicados por el Centro de Biociencia Agrícola Internacional (Centre for Agricultural Bioscience International - CABI). La ausencia de un registro no significa necesariamente que no exista antagonismo con otros especímenes, puede darse el caso de que la información no esté disponible (CABI, 2021).

Tabla 1 Especie del género *Bacillus* que son considerados como un enemigo natural para otros microorganismos.

Microrganismo	Enemigo natural para
B. subtilis	*Acidovorax citrulli, Alternaria alternata, Alternaria citri, Aphanomyces euteiches, Aspergillus niger, Athelia rolfsii, Aureobasidium pullulans, Chilo auricilius, Cnaphalocrocis medinalis, Cochliobolus miyabeanus, Cochliobolus nodulosus, Cochliobolus sativus, Didymella bryoniae, Diplodia seriata, Epicoccum nigrum, Erwinia amylovora, Euprosterna elaeasa, Eutypa lata, Fusarium* spp., *Fusarium oxysporum, Fusarium oxysporum f.sp. ciceris.*
B. megaterium	*Alternaria alternata, Cochliobolus miyabeanus, Fusarium culmorum, Hemileia vastatrix, Holotrichia oblita, Ostrinia nubilalis, Pectobacterium carotovorum, Phytophthora cinnamomi, Rhamphicarpa fistulosa, Thanatephorus cucumeris,*

Fuente: (CABI, 2021).

1.1.4 Métodos de identificación

A. Identificación macroscópica

Para la identificación preliminar individual de las colonias desarrolladas en un medio de cultivo sólido, se utilizan las características macroscópicas más comunes de las bacterias (ver **Figura 4)**, esto permite contrastar el aspecto de las colonias con las características de colonias definidas para el género *Bacillus* (Scioscia, 2014).

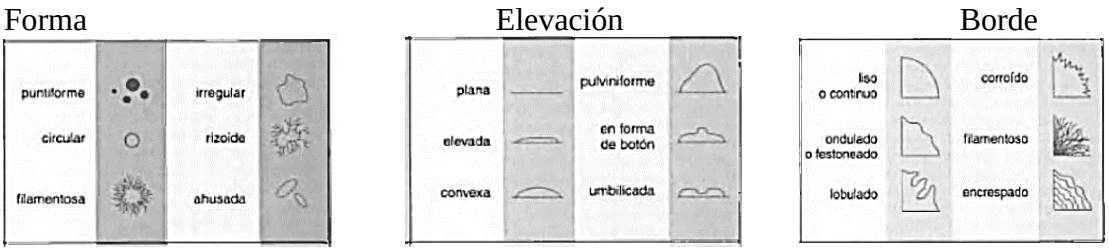


Figura 4 Características morfológicas de las colonias en medio de cultivo.

Nota: formas morfológicas de las colonias con el nombre de los términos de cada una.

Fuente: (Winn et al., 2008).

B. Características culturales, morfología celular y formación de esporas

La identificación tradicional radica en una descripción general de la amplia gama de morfologías coloniales, tanto dentro como entre especies (pleomorfismo). La descripción de la forma de las colonias superficiales, es comparada con las formas de cepas conocidas y las pequeñas diferencias en la estructura de la colonia permiten identificar nuevas especies. Sin embargo, la apariencia de la colonia puede variar considerablemente por la incidencia de factores tales como: las condiciones ambientales (composición o contenido de humedad del medio o la temperatura o atmósfera de incubación), el diámetro de la colonia (depende en gran medida del número de colonias que se desarrollan en una placa), así como de la concentración de nutrientes, la cantidad de agar vertida en una placa o las condiciones de incubación (Logan & Vos, 2015; Slabbinck et al., 2008).

Mientras que las cepas de varias especies de *Bacillus* desarrollan colonias con formas bastante características en un determinado medio, cepas de otras especies, como *B. subtilis* o *B. pumilus,* puede mostrar una variación extrema; ciertas especies tienden a agruparse o migrar en forma de colonias móviles sobre toda la placa o crecer sobre la placa en forma de colonias rizoides, algunas pueden mostrar diferentes grados de translucidez u opacidad. Estas variaciones suelen deberse a diferentes grados de esporulación dentro de las colonias, resultando difícil decidir si un cultivo puede considerarse como una puro, a pesar de las limitaciones, se puede realizar una primera discriminación entre los diferentes cultivos. Una descripción de las colonias mediante microscopía determina que células se representan solas o en cadenas su longitud es variable (el diámetro de *B. megaterium* es mayor a 1 µm y de *B. subtilis* es menor o igual 1 µm) y a menudo presentan filamentos (Priest, 1989; Slabbinck et al., 2008).

Una mala metodología microscópica también puede llevar a conclusiones incorrectas (bajo aumento o un enfoque inadecuado) debido a que los halos alrededor de las esporas pueden dar fácilmente una impresión falsa de esporangios hinchados o pueden estar dentro de células colapsadas (Berkeley et al., 2002; Slabbinck et al., 2008).

C. Reacción de Gram

La mayoría de los organismos aeróbicos formadores de esporas se tiñen como Gram positivos, aunque no necesariamente en todas las fases de su ciclo celular (a menudo sólo los cultivos muy jóvenes); la pared celular con estructura Gram negativa siempre se tiñera de Gram negativa, sin embargo, una pared celular con estructura Gram positiva, bajo ciertas circunstancias, puede teñirse Gram positivos o Gram negativos. La reacción de KOH a menudo se considera un sustituto de la tinción de Gram, al igual que con la tinción de Gram se ha descubierto que varias cepas de *Bacillus* son lisados por KOH mientras que la mayoría no lo hará (Berkeley et al., 2002).

D. Pruebas bioquímicas

Las pruebas bioquímicas aplicadas para la caracterización de aislados puros de *Bacillus* suelen estar definidos por la capacidad enzimática de la bacteria para el uso de fuentes de carbono. A continuación, se presenta pruebas generales para la tipificación de especies de *Bacillus* (ver **Tabla 2**).

Tabla 2 Determinación de la singularidad presente en las cepas de *Bacillus.*

Pruebas bioquímicas	*B. megaterium*	*B. subtilis*
Catalasa	+	+
Crecimiento anaeróbico	-	-
Crecimiento a 50 °C	-	+
Crecimiento en 7% NaCl	+	+
Ac. y gas en glucosa	-	-
NO_3 reduce a NO_2	V	+
Hidrólisis de almidón	+	+
Ácido de la glucosa	+	+
Hidrólisis de caseína	+	+

Nota: (+) ≥85% de aislados positivo; (-) ≥ 85 % de aisladas negativos; (V) características variables.

Fuente: (Berkeley et al., 2002).

E. Métodos moleculares

Los métodos más comunes para caracterizar nuevos aislados de *Bacillus*, aplican a genes que codifican la secuencia de un locus único (16S rARN, 23S rRNA utilizados en la identificación del género; groEL, gyrB, recN, rpoB, spoII, hag, permiten la identificación de especie y subespecie), también aplican en la tipificación de secuencias multilocus (adk, ccpA, ftsA, glpT, gmk, ilvD, pta, pur, pycA, tpi, rpoB, gyrB, pycA, mdh, mbl, mutS y

plcR, permiten el diagnóstico de especie y subespecie). Por otro lado, el uso de la técnica de Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (rRNA operones, genes secY amplificados, genes gyrB amplificados), electroforesis en gel de campo pulsado, huellas de ADN por PCR repetitiva, amplificación aleatoria de ADN polimórfico y huellas de microarrays de oligonucleótidos, permiten identificar y analizar géneros, subespecies y cepas mediante la variabilidad de secuencias de ADN. Existen otros métodos moleculares tales como; perfil de ácidos grasos, MALDI-TOF espectroscopia de masas de proteínas de esporas, electroforesis enzimática multilocus (MLEE), que también nos permiten establecer rangos aproximados entre los niveles taxonómicos y son de gran utilidad para distinguir y agrupar aislados bacterianos relacionados (Zeigler & Perkins, 2008).

1.2 Género *Fusarium*

El género *Fusarium* (Ascomicete) es cosmopolita, se los puede encontrar en todos los nichos ecológicos desarrollándose como saprófitos, patógenos especializados o también como endófitos; este género parasita a 81 de las 101 plantas económicamente importantes, provocando pudrición de raíces o tallos, cancros, marchitez, pudrición de frutos o semillas y enfermedades de las hojas. El género *Fusarium* carece de varios caracteres morfológicos los cuales se podrían utilizar para diferenciar fácilmente entre especies (Leslie & Summerell, 2007).

1.2.1 *Fusarium oxysporum*

Esta especie se encuentra ampliamente dispersa (ver **Figura 5**), se puede aislar de la mayoría de los suelos árticos, tropicales o desérticos, provoca marchitez vascular en diversos cultivos económicamente importantes, en diferentes países y regiones. Este hongo se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento alcanzando 4,5 (-6,5) cm de diámetro en cuatro días a 25 °C. Estas colonias presentan micelio aéreo con aspecto algodonoso de coloración variable (blanco a rosado durazno un tanto amarillento, pero

usualmente con un tinte púrpura o violeta) y con pocas o abundantes microconidias. La habilidad para parasitar una especie, género o familia específica, permite asignarle a una forma especial (f. sp.) cuyas características morfológicas y de cultivo son indistinguibles. Además, la variabilidad de las condiciones ambientales, ecológicas, geográficas y la presencia de un hospedante u hospedantes permite subdividirle en razas fisiológicas, esta es la razón por la cual las pruebas de patogenicidad y las características de virulencia de los aislados del hongo son el principal criterio para diferenciar las formas especiales y sus razas fisiológicas (Domsch, 2007).

Distribución geográfica de *Fusarium oxysporum*

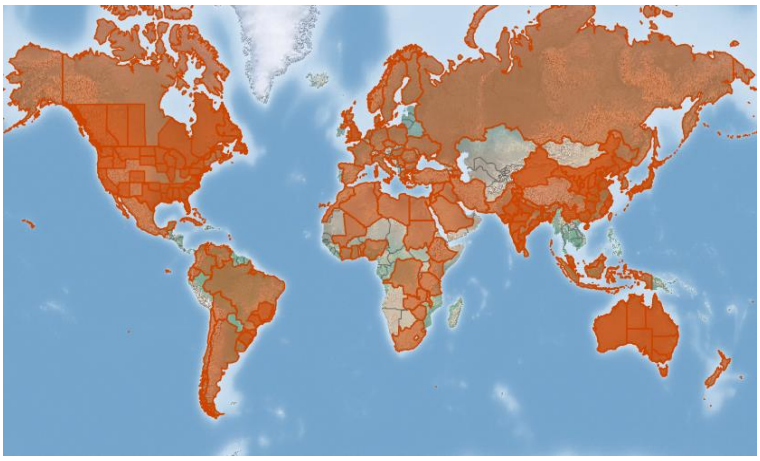


Figura 5 Distribución geográfica de *Fusarium oxysporum.*

Fuente: (CABI, 2022).

Las diferentes formas especiales atacan a cultivos tales como, banano (f.sp.*cubense*), trébol (f.sp. *trifolii*), tomate (f.sp.*lycopercisi*), vid (f.sp.h*erbemontis*), soya (f.sp. *glycines*), palma africana (f.sp. *elaedis*), eucalipto (f.sp. *eucalipti*), melón (f.sp. *melonis*), cebolla (f.sp. *cepae*), repollo (f.sp. *conglutinas*), remolacha (f.sp. *betae*), cítricos (f.sp. *citri*), alfalfa (f.sp. *medicaginis*), frejol (f.sp. *phaseoli*), clavel (f.sp. *dianthi*), crisantemo (f.sp. *chrysanthemi*), entre otros (Leslie & Summerell, 2007).

1.2.2 Ciclo de la enfermedad

En general durante la patogénesis provocada por *Fusarium*, el proceso de inoculación inicia con la germinación de conidios o clamidospora (primaria o secundaria). El segundo proceso dentro del ciclo de la enfermedad es la penetración; comienza con la adhesión del propágulo mediante la secreción de un mucilago (mezcla de polisacáridos, glicoproteínas, polímeros de hexosaminas y materiales fibrilares) que al humedecerse se torna pegajosa y ayuda al patógeno a adherirse a la superficie externa de los órganos de la planta. Comúnmente el patógeno ingresa por zonas de elongación, pelos absorbentes o células de la epidermis junto a la cofia de la raíz, hipocótilo, cotiledones; en la raíz se transporta intercelularmente e intracelularmente a través del tejido parenquimatoso, penetra al meristemo, luego coloniza las células endodérmicas y el periciclo dentro de la zona de diferenciación (Agrios, 2005).

El establecimiento de la infección y colonización del patógeno corresponden al tercero y cuarto proceso; la infección empieza por el xilema y su distribución sistémica se debe a la capacidad de producir enzimas (metilesterasa pectina, poligalacturonasa, pectintranseliminasa, celulasa y hemicelulasa) que degradan las paredes celulares de la planta, la pectina y la celulosa (Leslie & Summerell, 2007). Además, produce toxinas (lycomarasin y ácido fusárico) que provocan incremento de la respiración, alteración del metabolismo del fenol, activación de la polifenoloxidasa, incremento de la actividad de los reguladores de crecimiento, disminución de la tasa fotosintética, enanismo, pérdida de agua a través de la transpiración, entre otras (Agrios, 2005).

La colonización se desarrolla después de que germinan las esporas, se produce hifas que son confinadas en los vasos del protoxilema y metaxilema; aquí se producen microconidias las cuales se distribuyen ascendentemente a través de la savia. Las microconidias luego germinan, desarrollan hifas que penetran los poros de las barreras y

esporulan bajo la obstrucción, se producen microconidias secundarias las cuales son transportadas ascendentemente y germinan en la siguiente barrera que encuentren y así en un proceso repetitivo (Leslie & Summerell, 2007).

El quinto y sexto proceso del ciclo de infección es el crecimiento y reproducción del patógeno correspondientemente. El crecimiento se desarrolla en el xilema aprovechando las sustancias diluidas en los fluidos vasculares, esto le permite la formación de tres tipos de esporas asexuales reproductivas (no se conoce aún la fase teleomórfica), las características de estas esporas son: las microconidias son generalmente unicelular (5 - 12 µm por 2,3 – 3,5 µm), sin septos, hialina, elipsoidal a cilíndricas, rectas o curvadas; se forman sobre fiálides laterales, cortas, simples o sobre conidióforos poco ramificados, son esporas de multiplicación y diseminación en la planta, las macroconidias, tienen paredes delgadas, fusiformes, largas, moderadamente curvadas, con varias células, posee de 3 a 5 septas transversales, con la célula basal elongada y la célula apical atenuada, por lo general están ubicadas en los esporodoquios, su dimensión oscila entre (20-) 27 – 46 (-60) μm por 3,0 – 4,5 (-5,0) μm, son esporas de multiplicación y diseminación de la planta (Leslie & Summerell, 2007). Por ultimo las clamidosporas las cuales se forman a partir de la condensación del contenido de hifas y de los conidios, poseen paredes gruesas y redondas constituidas por 1 o 2 células, formadas terminalmente o intercaladas en el micelio más viejo poseen un tamaño de 5 a 15 μm de diámetro y son las esporas de resistencia para las condiciones adversas (Domsch, 2007).

La supervivencia del patógeno lo hace a través de las clamidosporas las cuales, en ausencia de sustrato, viven como parásitos o saprófitos en residuos de plantas (ver **Figura 6**) La supervivencia depende de la germinación de la primera clamidospora, la cual tiene una vida corta, pero de suficiente duración para permitir la formación de clamidosporas

de remplazo, este proceso es muy importante para la longevidad de muchas especies de *Fusarium* en el suelo (Agrios, 2005).

Ciclo de vida de *Fusarium oxysporum*

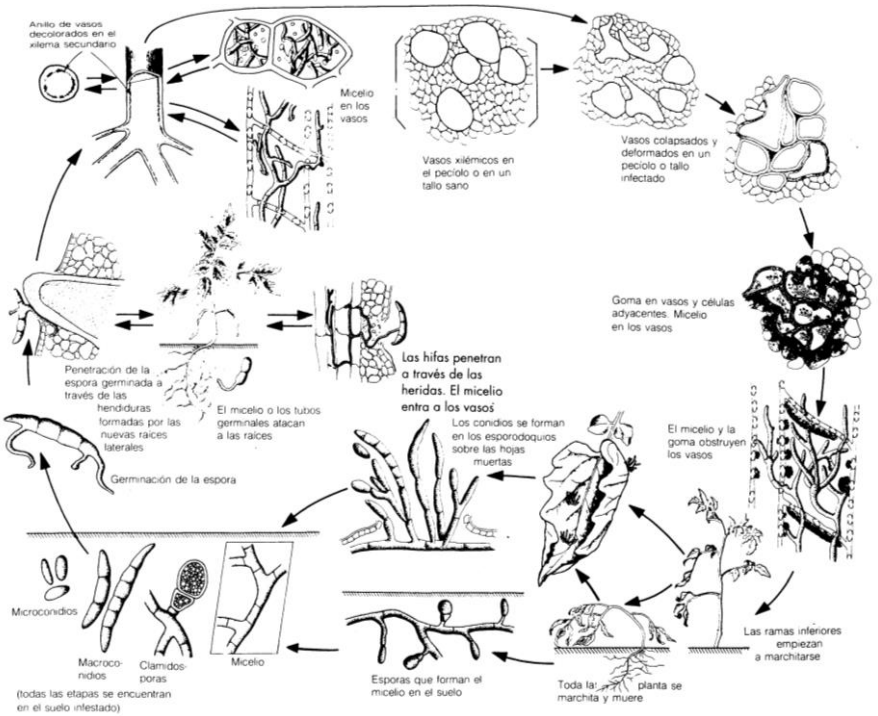


Figura 6 Ciclo de la enfermedad del marchitamiento del tomate causado por *F. oxysporum* f. sp. *licopersici*.

Fuente: (Agrios, 2005).

1.2.3 Métodos de control de la enfermedad

La metodología química, como es el uso de fungicidas sistémicos que contienen Thiabendazol o sus derivados y que incluyen al compuesto Benomyl han sido efectivos en el control de la marchitez vascular (Agrios, 2005). La aplicación de Bromuro de Metilo (98%), Cloropicrina, Basamid y Borlex es efectivo, pero tienen la desventaja de necesitar equipo especial, su costo es elevado y algunos productos se encuentran prohibidos en diferentes países. Además, para el control se utilizan otros fungicidas químicos como orgánicos tales como: Terraclor 75% (P.C.N.B.) Captan, Tiabendazol, Carbendazin o Metiltiofanato, Carboxim+Thiram, Tricoderm SO, Maestro, etc (Ceja et al., 2001).

El método de control cultural, como la solarización, el barbecho profundo, rotación de cultivo, dejar el suelo sin cultivo durante periodos de tiempo largos y la inundación de los terrenos han sido útiles para disminuir las poblaciones del patógeno en el suelo, pero no los elimina de manera definitiva. El control biológico mediante la biofumigación con estiércol de cabra, oveja y vaca podría ser útil porque incorpora materia orgánica al suelo, esto aumenta la cantidad de microorganismos descomponedores, provocando mayor competencia entre los habitantes del suelo (Agrios, 2005).

El método genético, como el desarrollo de nuevas variedades ha sido de mucha utilidad contra el marchitamiento provocado por *Fusarium*, debido a la inmovilidad relativa de patógeno lo que evita el desarrollo y distribución de cualquier nueva raza patogénica, pero el costo y tiempo invertidos en el proceso de investigación, evaluación, producción, aclimatación de estas nuevas variedades implica un desafío muy grande (Agrios, 2005).

1.2.4 Métodos de identificación de *Fusarium*

La identificación de *Fusarium* mediante análisis molecular comprende secuencias parciales de múltiples genes comúnmente utilizados para identificar taxones tales como; act1, CaM, his3, rpb1, rpb2, tef1, tub2, la región espaciadora transcrita interna (ITS) y la subunidad grande 28S del ADNr (LSU), también se han realizado combinaciones de cebadores, condiciones de PCR e inclusive la secuenciación completa del genoma. Es preciso mencionar que el análisis del ADN ribosómico nuclear (ITS y LSU), es casi inútil para el reconocimiento de especies en *Fusarium* y géneros relacionados, sin embargo, facilita la amplificación y la gran cantidad de datos disponibles para comparar en bases de datos públicas. El factor de alargamiento de traducción 1-α es comúnmente solo el marcador de identificación de primera opción, ya que tiene buen poder de resolución para la mayoría de las especies, mientras que rpb2 permite una discriminación mejorada entre especies estrechamente relacionadas. Las alineaciones de secuencias de rpb2 son mucho

más sólidas y menos ambiguas que los datos de tef1, dada la proporción ventajosamente baja de intrones del gen anterior (Crous et al., 2021).

Asimismo, se utilizan cebadores (Fc-1 y Fc-2) para la detección del *Fusarium oxysporum* que fueron obtenidos en plantas y suelos de pepino infectados con el fitopatógeno. Los cebadores se diseñaron de acuerdo con las regiones espaciadoras transcritas internas (ITS) de ADN ribosomal (ADNr) de *F. oxysporum* (Zhang et al., 2012).

1.3 Pruebas de antagonismo

Se utilizan varios métodos *in vitro* para evaluar o detectar la actividad antimicrobiana de extractos, productos puros o compuestos, pero la comparación o interpolación de resultados suele ser difícil, debido al uso de diferentes enfoques estandarizados, técnicas de preparación de inóculos, tamaño del inóculo, medio de crecimiento, condiciones de incubación y la determinación de puntos finales. Los siguientes métodos de difusión permiten analizar el antagonismo entre microorganismos (Balouiri et al., 2016).

El método de difusión en medio agar, requiere primero realizar un cultivo por estriado en agar de la cepa de interés, esta cepa durante su crecimiento secreta moléculas que se difunden en el agar. Después de la incubación, se corta asépticamente un disco de agar con un sacabocados estéril y se deposita sobre la superficie de otra placa de agar previamente inoculada con el microorganismo de prueba. Las sustancias se difunden desde el disco al medio de agar, permitiendo observar la aparición de la zona de inhibición alrededor del agar (Elleuch et al., 2010).

El método de estrías cruzadas, permite detectar rápidamente microorganismos antagónicos. El ensayo requiere sembrar una sola línea en el centro de la placa de agar la cepa microbiana de interés, después del periodo de incubación, se siembra en la misma placa una sola línea perpendicular a la línea central, los microorganismos que se desean

probar. Después de una incubación adicional, el tamaño de la zona de inhibición determina las acciones antimicrobianas (Balouiri et al., 2016).

El método de alimentos envenenados, se utiliza principalmente para evaluar el efecto antifúngico contra hongos filamentosos. El agente antifúngico o el extracto es incorporado al agar fundido, se mezcla bien y luego se vierte en placas de Petri; después de una pre incubación durante la noche, la inoculación se puede realizar mediante un disco de micelio que varía de 2 a 5 mm, que se deposita en el centro de la placa. Luego de una incubación adicional en condiciones adecuadas para la cepa de prueba, se mide el diámetro del crecimiento de las placas de control, de la muestra y de la placa con el antifúngico; el efecto se estima mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad antifúngica (\%)} = ((Dc - Ds)/Dc) \times 100$$

Donde **Dc** es el diámetro de crecimiento en la placa de control y **Ds** es el diámetro del crecimiento en la placa que contiene el antimicótico de prueba. La esporulación también se puede comparar con el control, generalmente, cuando falla la estandarización del método utilizado, se puede utilizar un control positivo con antimicrobianos conocidos (Balouiri et al., 2016).

2. Materiales y métodos

2.1 Ubicación del ensayo

Los bioensayos utilizados para la evaluación de la capacidad antagónica de los microorganismos fueron realizados en los laboratorios de Diagnóstico Vegetal de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario – AGROCALIDAD, ubicada en la parroquia de Tumbaco, cantón Quito, Av. Interoceánica Km. 14 1/2, Sector La Granja.

2.2 Siembra, masificación y conservación de los aislados de *Bacillus* y *Fusarium*

2.2.1 Siembra de bacterias y hongos

Se preparó medio de cultivo agar extracto de malta (*Fusarium*) y agar nutritivo (*Bacillus*), para la siembra de los microorganismos. Cada siembra se realizó por triplicado y se incubaron por 7 días a 24 °C para los hongos y por 24 - 48 horas para las bacterias a 28 °C (Castellanos, 2011; Schaad et al., 2001).

2.2.2 Conservación de hongos y bacterias

Para la conservación de los hongos se esterilizaron tubos de ensayo con agua destilada (10 mL), luego con un sacabocado se realizaron cortes de 0,5 cm de diámetro del aislado fúngico sembrado en medio agar extracto de malta (EMA), estos cortes se colocaron en los tubos de ensayos hasta el 75% de su capacidad y se almacenaron a una temperatura entre 25 - 30 °C (Castellanos, 2011).

Las bacterias se conservaron de la siguiente manera; con un palillo estéril se recogió una colonia y se depositó dentro de un tubo con medio caldo TSB (Caldo Soja Tripticaseina), se incubó durante 24 - 48 horas, después del periodo de incubación se añadió 1 mL de glicerol (87%) estéril, la solución se homogenizo y dispenso (1mL) en microtubos y se conservó a -20°C (Schaad et al., 2001).

2.2.3 Masificación del hongo y bacteria

Con el fin de obtener la cantidad necesaria del hongo para la extracción de ADN, se realizó la siembra de dos cortes (0,5 cm de diámetro) del medio EMA en medio liquido YDP (extracto de levadura-dextrosa-peptona), se incubo en la obscuridad por 5 días a temperatura ambiente; después del periodo de incubación se obtuvo el micelio mediante un equipo de extracción y se almacenó a –20 °C (Castellanos, 2011).

Para la masificación de bacterias se tomó una unidad formadora de colonia con un palillo estéril, se depositó el palillo en el tubo con medio caldo TSB (Caldo Soja Tripticaseina), se incubo durante 24 - 48 horas. Después del periodo de incubación, se centrifugó para obtener un pellet, el cual se utilizó en la extracción de ADN (Schaad et al., 2001).

2.3 Pruebas de diagnóstico de aislados de *Bacillus* y *Fusarium*

2.3.1 Identificación macroscópica

La tipificación morfológica de la colonia se realizó en aislados cultivados mediante estriado en medio agar nutritivo incubado durante 24 horas, las características macroscópicas evaluadas de las bacterias fueron: forma, elevación y borde de la colonia (Winn et al., 2008), el contraste de las características permitió obtener un indicio preliminar del grupo bacteriano al que pertenecen las colonias utilizadas en la investigación.

2.3.2 Tinción Gram y pruebas bioquímicas para la identificación de *Bacillus*

Para la tinción Gram y las pruebas bioquímicas se utilizaron unidades formadoras de colonias aisladas en agar nutritivo a 30 °C durante 48 horas (Berkeley et al., 2002), los ensayos aplicados para verificar la singularidad metabólica y la morfología celular presentes en los aislados bacterianos se realizaron de la siguiente manera:

A. Tinción Gram

Se extendió con asa microbiológica una colonia en un portaobjeto, se dejó secar a temperatura ambiente, luego se agregó gotas de cristal violeta cubriendo el área fijada, se esperó un minuto, después se enjuagó con agua no directamente sobre la muestra y seco ligeramente sobre una toalla de papel, de manera seguida se agregó lugol esperando un minuto para luego agregar alcohol acetona y esperar 5 - 30 segundos, a continuación, se enjuago con agua destilada y seco. Finalmente se agregó safranina y después de 10 segundos se lavó brevemente, se secó y observo al microscopio (Schaad et al., 2001).

B. Prueba de la catalasa

Se recogió una colonia de un cultivo de 24 horas y se colocó sobre el portaobjetos, con una gota de H_2O_2 (3%), sin mesclar, la presencia de burbujas fue indicador de una reacción positiva (Schaad et al., 2001).

C. Crecimiento anaeróbico

Para este ensayo se mezcló 10,0 g de Tripticasa (tripsina hidrolizada de caseína), 5,0 g de NaCl, 2,0 g de tioglicolato de sodio, 1,0 g de sodio formaldehído sulfoxilato y 15,0 g de Agar, luego se ajustó el pH a 7,2, el medio se esterilizo y solidifico en tubos, luego se inoculo la bacteria e incubo a 24°C (Harwood, 1989).

D. Crecimiento a 50 °C

Se sembró colonias en caseína dextrosa (ácido de caseína hidrolizada 10,0 g, extracto de levadura 5,0 g, dextrosa 50% 10 mL, K_2HPO_4 4,0 g y agar 17,0 g), se incubó a 50°C por dos días, luego se verificó crecimiento de colonias (Schaad et al., 2001).

E. Crecimiento en 7% NaCl

Se añadió 7% de NaCl en caseína dextrosa (ácido de caseína hidrolizada 10,0 g, extracto de levadura 5,0 g, dextrosa 50% 10 mL, K_2HPO_4 4,0 g y agar 17,0 g), se incubó a 24°C y se verifico diariamente el desarrollo de colonias (Schaad et al., 2001).

F. Prueba de nitrato

Se mezcló 1% (p/v) de KNO_3 en caldo nutritivo, la solución se esterilizó en tubos de ensayo, luego se inoculó una colonia e incubó a (37 ± 2) °C durante 48 horas; al finalizar la incubación, se añadió 0,5 mL de ácido acético de 5N alfa-naftilamina y 0,8% ácido sulfanílico (5N verificando la reacción en un máximo de 30 segundos, si no existió un cambio de color añadir Zn (no se agregara cantidades excesivas de zinc que puedan causar falsos positivos), dispensar en tubos de ensayo 5 mL (Harwood, 1989; Schaad et al., 2001).

G. Hidrolisis de almidón

Se inoculó placas de agar almidón (23,3 g de agar nutritivo, 15,0 g de almidón de patata soluble), e incubo durante 5 días. Después se inundó la placa con Lugol yodo (en 100 mL de agua se añadió, 5,0 g de yodo más 10,0 g de KI) diluido 1/5 en agua destilada. Las zonas claras e incoloras indicaron la hidrólisis del almidón (Schaad et al., 2001).

H. Ácido y gas en glucosa

Se inoculó por duplicado tubos con medio Hugh y Leifson (2,0 g de peptona, 5,0 g de NaCl, 0,3 g de KH_2PO_4, 3,0 g de agar y 3,0 mL de azul de bromotimol 1%) que contenía glucosa (10%) agregada por filtración. Se selló un tubo con aceite mineral estéril hasta una profundidad de 1 cm y se incubo a 28°C examinándose diariamente durante 14 días, se pudo evidenciar la producción de ácido (amarillo) y la producción de gas (Schaad et al., 2001).

I. Ácido de glucosa

La solución acuosa al 10% de glucosa estéril, se añadió a tubos de medio basal estéril obteniéndose una concentración final del 0,5% (el medio basal fue preparado con 1,0 g de $NH_4H_2PO_4$; 0,2 de g KCI; 0,2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,2 g de extracto de levadura, 15,0 g de agar y 15,0 mL de una solución de púrpura de bromocresol al 0,04 %, se ajustó a un pH 7,0). Se revisó la producción de ácido y gas a los 7 y 14 días (Gordon et al., 1973).

J. Hidrolisis de caseína

Se disolvió 5,0 g de leche desnatada en polvo en 50,0 mL de agua destilada y 1,0 g de agar en 50,0 mL de agua destilada, se esterilizaron individualmente, luego se mesclaron (45°C) y dispensaron en cajas de Petri, las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 3 días para secar la superficie del agar (para la propagación del crecimiento) luego se inocularon y a los 7 y 14 días se registró si la caseína se había eliminado o no alrededor y debajo de la siembra bacteriana (Gordon et al., 1973).

2.3.3 Identificación morfológica de *Fusarium*

De los aislados se recogió micelio con una aguja microbiológica, se colocó en un porta objetos, se añadió una gota de azul de lactofenol, observó en el microscopio óptico (40x). La morfología de sus estructuras fúngicas se comparó con caracteres definidos bibliográficamente (Leslie & Summerell, 2007).

2.3.4 Evaluación de perfil metabólico de bacterias mediante el sistema de identificación BIOLOG

La evaluación del perfil metabólico se realizó aplicando lo detallado en el instructivo GEN III Microplate, Las bacterias aisladas y evaluadas mediante pruebas bioquímicas, fueron utilizadas para el diagnóstico mediante el perfil metabólico. Para empezar, se

sembró una colonia purificada en Agar Nutritivo (AN) e incubo a (28± 2) °C, las células utilizadas fueron cultivos de 24 horas, para minimizar la esporulación (Biolog, 2008).

Para la preparación del inóculo se utilizó un hisopo para recoger una colonia individual, esta colonia se liberó en el tubo de fluido de inoculación, aplastando el grupo de células contra la pared del tubo hasta obtener una suspensión celular uniforme del 95 ± 2 % de turbidez, esta lectura se realizó en un turbidímetro a una densidad óptica de 590 nm. Para la inoculación de la placa se dispenso en cada pocillo 100 µL, de la suspensión, se incubó 24 horas a (28 ± 2) °C (Biolog, 2008).

2.3.5 Extracción de ADN de *Fusarium* y *Bacillus*

La extracción de ADN de *Fusarium* se realizó mediante DNeasy Plant Mini kit de Qiagen, empleando el protocolo descrito por el fabricante, previamente se realizó la maceración de la muestra con nitrógeno líquido en un mortero, el macerado obtenido se colocó en un microtubo (100 mg) al cual se le agregó 400 µL de tampón AP1 y 4 µL de ARNasa A, se incubo durante 10 minutos a 65 °C utilizando un termobloque con agitación. Después de finalizado el proceso, se añadió 130 µL de tampón P3 e incubo durante 5 minutos en hielo, la solución se centrifugo durante 5 min a 20.000 x g (14.000 rpm). El sobrenadante fue transferido mediante pipeteo a la columna QIAshredder, se centrifugó durante 2 minutos a 20.000 x g para permitir separar los residuos mediante el filtro que contiene la columna. El sobrenadante se transfirió a un nuevo microtubo sin alterar el sedimento, se añadió 750 µL del Buffer AW1 mezclándolo por pipeteo, 650 de µL esta solución se trasfirió a una columna DNeasy Mini, la cual se centrifugó durante 1 minuto a 6000 x g (8000 rpm), se desechó el residuo obtenido y realizo el mismo proceso con la solución restante. La columna DNeasy Mini se colocó en un nuevo microtubo y se añadió 500 μL de tampón AW2, esta solución se centrifugo 1 min a 6000 x g, se descartó el residuo obtenido, se añadió otros 500 µL de tampón AW2 y centrifuga durante 2 min 20.000 x g.

Posteriormente la columna DNeasy Mini fue retirada cuidadosamente evitando el contacto la columna con el residuo y se añadió 100 µL de tampón AE para la elución, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente (23 ± 2 °C), para luego centrifugar durante 1 min a 6000 x g, la elución se almaceno a −20˚C para su uso posterior (QIAGEN, 2016).

La extracción de ADN de *Bacillus,* se realizó agregaron 400 µL de tampón de extracción precalentado (TrisHCl 100 mM, EDTA 20 mM, NaCl 1,7 M, CTAB al 2 %) a los pellets obtenidos desde el medio liquido TSB, esta solución se agito durante 5 segundos y se incubo a 65 °C por un lapso de 30 minutos, con inversión manual cada 10 minutos. Después de la incubación, se añadió un volumen de 400 µL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló vigorosamente invirtiendo los microtubos 15 - 20 veces, las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 10 minutos, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo, a los cuales se añadió 25 µL de RNasa (20 mg/ml) e incubo a 37 ºC en el termobloque durante una hora, después de la incubación se tomó el sobrenadante transparente y se añadió 100 µL de NaCl 5M y 100 µL de isopropanol enfriado para eliminar el residuo de cloroformo: alcohol isoamílico, esta solución se invirtió suavemente varias veces y se mantuvo a -20 °C durante 12 horas. Transcurrido este lapso de tiempo se tempero la solución y centrifugo a 12.000 rpm durante 10 minutos; el sedimento de ADN se lavó con etanol al 70% 3 veces, luego se secó al aire a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas y se disolvió en 100 µL de tampón TE (TrisHCl 10 mM y EDTA 1 mM, pH-8,0) se almaceno a −20˚C para su uso posterior (Rawat et al., 2016).

2.3.6 Cuantificación de ADN de *Fusarium* y *Bacillus*

Mediante el uso del ThermoScientific NanoDrop se realizó la cuantificación espectrofotométrica del ADN obtenido, la relación de 260/280 se utilizó para estimar la pureza del ADN, aceptando valores de relación aproximados entre 1,8 y 2,0 µg. μL^{-1}, luego se ajustó la misma en una concentración entre 20 y 30 µg. μL^{-1}, previamente

diluidas en agua de tipo PCR libre DNAs y RNAs, concentración necesaria para la reacción de PCR (Thermo Scientific, 2009).

2.3.7 Amplificación de secuencias del gen 16S (*Bacillus*) e ITS (*Fusarium*) del ADN ribosomal

La amplificación del gen 16S, de las bacterias aisladas, se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleando los primers 27F (5´AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3´) y 1492R (5′-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3′. Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de 25 µL, 2,5 µL de Buffer 10X, 2,5 µL de $MgCl_2$ 50 mM, 0,1 µL de Taq polimerasa (5U/ µL), 0,5 µL de dNTPs a 10 mM, 0,6 µL de cada primer a 15 pmol, 2 µL de ADN extraído y agua ultra pura. La condición de PCR se fijó en una desnaturalización inicial de 94 °C durante 3 minutos, seguida de 94 °C durante 30 segundos, una temperatura de hibridación específica del cebador durante 30 segundos, una elongación durante 1 minuto a 72 °C y el ciclo se repitió 39 ciclos y un paso de extensión final a 72°C durante 10 minutos y una temperatura de mantenimiento de 4°C al final (Rawat et al., 2016).

La amplificación del gen ITS se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa. La PCR se llevó a cabo en un volumen de 25 µL que incluía 1,25 U de enzima Taq polimerasa, 1X tampón de PCR, 0,2 mM de dNTP, del cebador PFO3 (5'-CGGGGGATAAAGGCGG-3') y PFO2 (5' CCCAGGGTATTACACGGT3') 0,4 µM y 4 ng de ADN genómico. Un control negativo contenía todos los compuestos de reacción excepto el ADN molde, y un control positivo contenía todos los compuestos de reacción con 10 µL de ADN genómico. Las amplificaciones por PCR se realizaron de la siguiente manera: la desnaturalización se realizó a 95°C durante 4 minutos seguido de 35 ciclos de

30 segundos a 95°C, 45 minutos a 60°C y 30 segundos a 72°C, y una extensión final de 5 minutos a 72°C (Alabouvette, 2000).

2.3.8 Electroforesis de productos de PCR

Una vez terminado los procesos de amplificación, los productos PCR fueron analizadas por medio de electroforesis. Se preparó geles de agarosa al 1,5% disueltos en buffer TBE 1X (Trisborato, EDTA), se agregó 3 µL de SYBR Safe DNA Gel Stain, luego de solidificado el gel, se tomaron 4 µL de cada reacción de PCR más 1 µL (10X) Blue Juice y se dispenso en los pocillos las reacciones, se programó la fuente a 100V y 300mA, aproximadamente por 30 minutos. Como control se utilizó marcador de peso molecular de 100pb, los productos de PCR amplificados en gel de agarosa fueron visualizados y fotografiados en un trasiluminador UV y se estimó el peso molecular del producto PCR con referencia al marcador molecular usado (Sabrook & Green, 2012).

2.3.9 Secuenciación

Los productos PCR fueron enviados a la empresa MACROGEN (Seúl, Corea) para ser secuenciados, los resultados fueron comparados con la base de datos del GenBank que se encuentran en el NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Las secuencias fueron depuradas y comparadas en la base de datos del programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) lo que permitió encontrar secuencias significativas a nivel de género y especie.

2.4 Pruebas de antagonismo *(Bacillus-Fusarium oxysporum*) mediante siembra duales

Las pruebas de antagonismo se realizaron por triplicado para cada una de las cepas bacterianas purificadas y caracterizadas mediante las pruebas identificación. El antagonismo se evaluó mediante el método de cultivos duales; el hongo se sembró previamente en medio de cultivo PDA y se incubó a 30°C durante 7 días, posteriormente,

se tomó con una aguja microbiológica micelio y se sembró en forma invertida en el centro de las placas de medio EMA (Venkataramanamma et al., 2022).

Las bacterias fueron obtenidas de cultivos en TSB con 24 horas de crecimiento y se ajustó para cada bacteria una solución al patrón de McFarland 0.5, posteriormente las bacterias fueron sembradas a cada lado a 3 cm del centro, donde se encontraba el hongo fitopatógeno. Se realizó la incubación a 25 ± 2 °C durante 12 días. El efecto antagónico de las bacterias fue determinado a través de mediciones del diámetro de crecimiento del hongo (mm) en comparación con un control negativo (solo *Fusarium oxysporum*) y un control positivo (cloruro de aquil-dimetil-bencil-amonio 0,2 %). El porcentaje de Inhibición se calculó cómo se indica en la siguiente fórmula (Soylu et al., 2020).

Formula porcentaje de inhibición

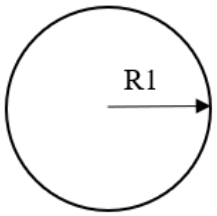
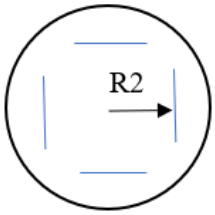
$\% \, Inhibición = \frac{(R1 - R2)}{R1} * 100$	Placa control 
Donde: R1 es el radio máximo (radio del patógeno de control) R_2 es el radio mínimo (radio del patógeno en interacción con el antagonista)	Placa interacción patógeno-antagonista 

Figura 7 Formula porcentaje de inhibición.

Fuente: modificado (Soylu et al., 2020).

2.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un Diseño Completamente al Azar con cinco repeticiones (ver **Tabla 3**); para el procesamiento de los datos se aplicó un análisis de

varianza (ANOVA). Los datos se procesaron con el programa Infostat Versión 2020 con pruebas Post Hoc de Tukey al 5 %.

Tabla 3 Esquema ANOVA

Codificación	**Descripción**	**Tratamiento**
C-	sin bacteria	T0
CT11	*B. megaterium*	T1
Bs	*B. subtilis*	T2
C+	Fungicida	T3

FUENTES DE VARIACIÓN	GRADOS DE LIBERTAD
Total	14
Tratamientos	2
Error experimental	12

Fuente: (La autora 2024).

3. Resultados y Discusión

3.1 Siembra, masificación de los aislados de *Bacillus* y *Fusarium*

3.1.1 Siembra de los microorganismos

El cultivo del aislado fúngico entregado por el Laboratorio de Fitopatología (AGROCALIDAD), sembrado en papa dextrosa agar (PDA), presento un crecimiento micelial radial, con forma aéreo-algodonoso y de color rosado oscuro (ver A de **Figura 8**); este resultado es de iguales características con lo definido bibliográficamente, en el cual se describe que el micelio de *Fusarium oxysporum* pueden ser flocoso, escaso o abundante, de color variado entre blanco y violeta pálido (Leslie & Summerell, 2007).

Aislados fúngicos y bacterianos utilizados en el ensayo

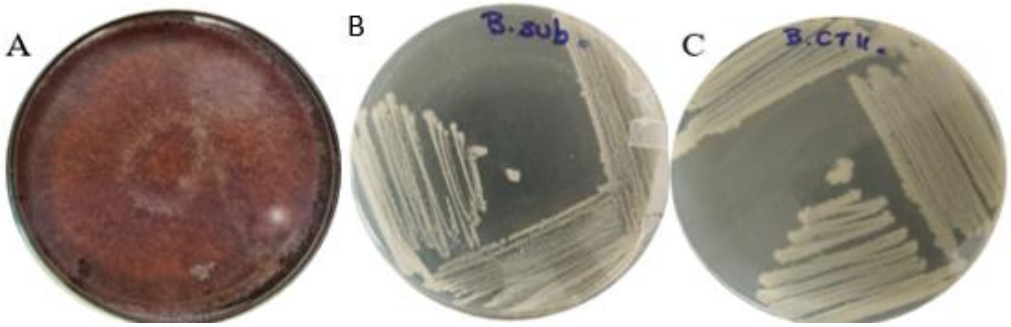


Figura 8 Morfotipos de aislados fúngicos y de las bacterias desarrollados en medios de cultivos.

Nota: A, cepa *Fusarium* (sembrado en papa dextrosa agar e incubado por 7 días a 24± 2 ºC); B, cepa cepa B. *subtilis*; C, cepa CT11 (sembradas en agar nutritivo e incubadas por 48 horas a 28± 2 ºC).

Fuente: (La autora, 2024).

Los aislados bacterianos conservados entregados por la Universidad Politécnica Salesiana, sembrados en agar nutritivo presentaron características morfológicas macroscópicas semejantes a las del género *Bacillus* tales como; tamaño mediano, borde irregular, elevación convexa y color blanquecino (ver B y C de **Figura 8**), estas

características se asemejan a las descritas bibliográficamente en las cuales se las describe como; colonias con forma irregular, elevación plano convexa, con borde ondulado, color blanquecino en agar nutritivo y de tamaño variable (Scioscia, 2014).

3.1.2 Masificación y conservación de los microorganismos

La concentración obtenida mediante la masificación de los microorganismos se ajustó para ser utilizado en los siguientes ensayos; en el caso de las bacterias la concentración fue 10^8 UFC/mL (Karimi et al., 2012) y para los hongos la concentración final fue de 10^4 conidios/mL (Ayala et al, 2023). La verificación de la conservación se realizó a los 15 y 30 días obteniéndose cepas puras y viables.

Masificación y conservación de los microorganismos

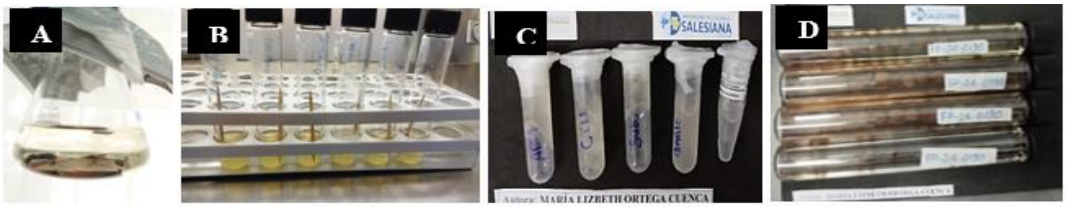


Figura 9 Ensayos de masificación y conservación de los aislados fúngicos y bacterianos caracterizados.

Nota: A, cepa de *Fusarium* (FP-24-0190) sembrado en medio líquido e incubado por 10 días a 24±2 ºC; B, cepas bacterianas (CT11, y *B. subtilis)* sembradas en caldo nutritivo e incubadas a 28± 2 ºC por 24 horas; C, conservación de aislados bacterianos en glicerol (87%) a -20 °C; D, conservación de aislados micológicos en agua destilada estéril a 18 °C.

Fuente: (La autora, 2024).

3.2. Pruebas de diagnóstico de aislados de *Bacillus* y *Fusarium*

3.2.1 Identificación macroscópica

Para evidenciar las diferencias morfológicas entre los aislados se fotografiaron individualmente las colonias, obteniéndose las siguientes características (ver **Figura 10**); las colonias de *B. megaterium* (CT11), presentaron una forma irregular, elevación

pulviniforme, con bordes filamentosos y ondulados; las colonias de *B. subtilis* presentaron formas irregulares, con elevación pulviniforme y bordes ondulados.

Fotografías de colonias bacterias utilizadas en el ensayo

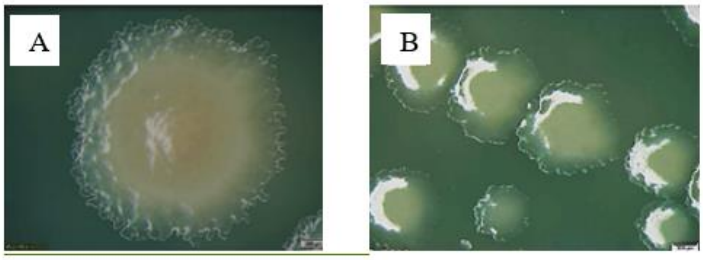


Figura 10 Morfología de aislados bacterianos desarrollados en agar nutritivo.

Nota: A, *B. subtilis*; B, cepa CT11; aislados bacterianos, incubados por 48 horas a 28± 2 ºC.

Fuente: (La autora, 2024).

Esto coincide con lo descrito por Logar & Vos (2015), quienes describen que las colonias de *B, megaterium* poseen una apariencia vacuolada, brillante, irregular y que tienden a ondular los márgenes, de la misma manera para *B. subtilis* especifica que las colonias son irregulares y que pueden dar la apariencia de un cultivo mixto (Logan & Vos, 2015).

3.2.2 Tinción Gram y pruebas bioquímicas para la identificación de *Bacillus*

Todas las bacterias obtenidas fueron bastones Gram positivas y de dimensiones similares al rango de magnitudes (0,7-0,9 - 1,8-3,0 µm) referenciadas bibliográficamente.

Fotografías microscópicas de esporas bacterianas

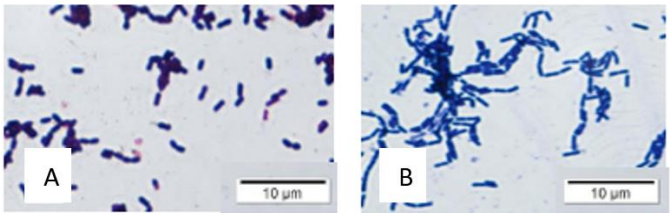


Figura 11 Esporas bacterianas fotografiadas a 40x.

Nota: Gram positivos de 24 horas A, cepa CT11*; B, B. subtilis.*

Fuente: (La autora, 2024).

Las bacterias aisladas en agar nutritivo que resultaron semejantes a las características del género *Bacillus* tanto para la identificación macroscópica como microscópicas se les realizo las pruebas bioquímicas, esto permitió establecer la diferenciación entre especies (ver **Tabla 4**).

Tabla 4 Singularidad metabólica de las cepas de *Bacillus*.

Pruebas bioquímicas	*B. megaterium*	*B. subtilis*
Catalasa	+	+
Crecimiento anaeróbico	-	-
Crecimiento a 50 °C	-	+
Crecimiento en 7% NaCl	+	+
Ac. y gas en glucosa	-	-
NO_3 reduce a NO_2	+	+
Hidrólisis de almidón	+	+
Ácido de la glucosa	+	+
Hidrólisis de caseína	+	+

Fuente: (La autora, 2024).

Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas permitieron diferenciar los distintos géneros de *Bacillus* utilizados en la investigación (Berkeley et al., 2002; Harwood, 1989; Logan & Vos, 2015; Schaad et al., 2001).

3.3. Identificación morfológica de *Fusarium*

El cultivo fúngico realizado en papa dextrosa agar, produjo abundantes microconidias (5 - 12 µm por 2,3 – 3,5 µm, sin septos, hialinos y elipsoidales) y macroconidias (27 – 46 μm por 3,0 – 4,5 μm, fusiformes, largas, moderadamente curvadas, con 3 a 5 septos

transversales), inmersos en una masa micelial con presencia de fiálides, pero sin desarrollo de clamidosporas. Las características morfológicas del cultivo fúngico corresponden con lo definido bibliográficamente (Leslie & Summerell, 2007).

Fotografía microscópica de microconidios y macroconidios de *Fusarium oxysporum*

Figura 12 Estructuras fúngicas fotografiadas a 40x.

Nota: Estructuras fúngicas obtenidas de la muestra FP-24-0190 cultivado en medio extracto de malta agar incubado por 7 días a 24± 2 ºC

Fuente: (La autora, 2024)

3.4. Evaluación de perfil metabólico de bacterias mediante el sistema de identificación BIOLOG

Las lecturas de los valores de absorbancia de turbidimetría y colorimetría establecidas en un periodo de tiempo de 24-48 horas de incubación, permitieron el diagnóstico de las cepas de *Bacillus* (ver **Tabla *5***), los resultados obtenidos se presentan a continuación (Biolog, 2008).

Tabla 5 Identificación de los aislados de *Bacillus* mediante el sistema de identificación microbiana BIOLOG.

Código	Identificación bioquímica	Identificación BIOLOG
CT11	*B. megaterium*	*B. megaterium*
Bs	*B. subtilis*	*B. subtilis* ss spizizenii

Fuente: (La autora, 2024).

Los aislados positivos mediante pruebas bioquímicas para la especie *B. megaterium* (CT11) y *B. subtilis*, resultaron también positivos para el diagnóstico del perfil metabólico. Cabe mencionar que el software del sistema de identificación microbiana BIOLOG registra dos perfiles metabólicos; *B. subtilis* ss spizizenii y *B. subtilis* ss subtilis para la tipificación de *B. subtilis* (Biolog, 2008).

3.5. Cuantificación de ADN de *Fusarium* y *Bacillus*

Los resultados obtenidos en la cuantificación del ADN mediante espectrofotometría, para las bacterias, fue de 512 – 830 ng/µL de concentración, con una relación de absorbancia promedio de 1,91 (260/280) y para el hongo la concentración fue de 40 ng/µL con una relación de absorbancia de 1,8 (260/280) Los valores de pureza del ADN de las muestras (ver **Tabla *6***) se ubicaron dentro del rango óptimo establecido entre 1,7 y 2,0 (Maniatis et al., 1982). Para los ensayos de PCR se diluyeron las muestras de ADN hasta una concentración final de 30 ng/µL.

Tabla 6 Valores de pureza en muestra de ADN

Código	**Análisis**	**Concentración (ng/µL)**	**Criterio de validez**
CT11	260/280	512	2,01
B. subtilis	260/280	830	1,8
FP-24-0190	260/280	40	1,8

Fuente: (La autora, 2024).

3.6. Amplificación de secuencias del gen 16S (*Bacillus*) e ITS (*Fusarium*) del ADN ribosomal

Como se puede visualizar los productos de PCR amplificados de las 5 muestras de ADN bacterianos (ver **Figura 13**), se obtuvieron fragmentos aproximados de 1400 pb (16S) y para el ADN fúngico se obtuvo un fragmento aproximado de 70 bp (ITS). La amplificación de los cebadores permitió obtener fragmentos específicos y de una concentración óptima (White et al. 1990; Martins et al, 2019). El producto de la PCR de las muestras bacterianas, permitió visualizar los fragmentos de las cepas analizadas (CT11y Bs), estos fragmentos fueron purificados y enviados MACROGEN (Seúl, Corea) para ser secuenciados.

Electroforesis de los productos PCR

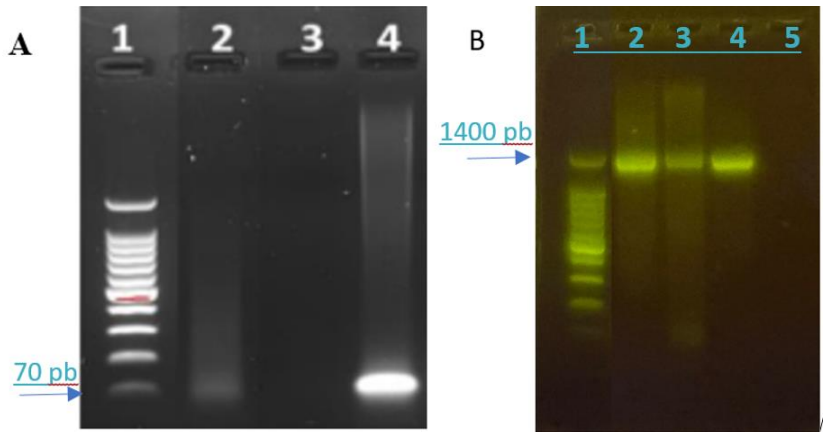


Figura 13 Productos de PCR en gel de agarosa (1,5%).

Nota: A: Carril 1, Marcador de peso molecular 100pb; Carril 2, FP-24-0190; Carril 3, Control negativo; Carril 4, Control positivo *Fusarium oxysporum.* **B:** Carril 1, Marcador de peso molecular 100pb; Carril 2, CT11; Carril 3, Bs; Carril 4, Control positivo 16S, Carril 5, Control negativo.

Fuente: (La autora, 2024).

3.8. Secuenciación

El resultado de las cepas enviadas a secuenciar en MACROGEN (Seúl, Corea) fueron analizadas utilizando la herramienta BLAST la cual permitió comparar la identidad de nuestras mediante el alineamiento con secuencias disponibles en la base de datos del GenBank-NCBI, los resultados se presentan en la **Tabla 7**.

Tabla 7 Secuenciación de productos PCR

Código	**Descripción**	**Cobertura de consultas**	**Identidad máxima**
CT11	Bacillus megaterium strain JN34	99%	KC503906.1
Bs	*Bacillus subtilis* strain NBRC 101239	99%	MW012655.1

Fuente: (La autora, 2024).

3.9. Pruebas de antagonismo *(Bacillus-Fusarium oxysporum*) mediante siembra duales

Los resultados obtenidos de los cultivos duales *in vitro* a los 12 días de incubación (ver Figura 14), permitió evaluar la capacidad antagónica de las bacterias de los tratamientos T1, T2 yT3, los cuales fueron contrastados con el tratamiento T0 evidenciándose la existencia del antagonismo entre los microorganismos.

Pruebas de antagonismo

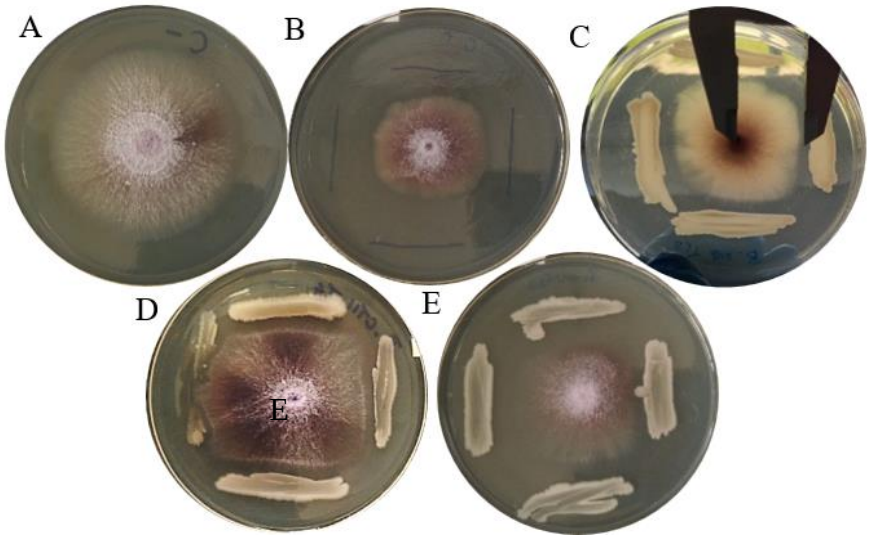


Figura 14 Pruebas de antagonismo de *Bacillus-Fusarium oxysporum*

Nota: A: Control negativo (*Fusarium oxusporum* sin bacteria), B: Control negativo *Fusarium oxysporum;* C: medición del crecimiento micelial con calibre, D: *Fusarium oxysporum* + CT11; E: *Fusarium oxysporum* + *B. subtilis* ensayos de antagonismo sembrados en extracto de malta agar incubado por 12 días a 24± 2 ºC.

Fuente: (La autora, 2024).

3.10. Análisis estadístico

En el estudio de análisis de varianza que se muestra en la **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, se presenta el porcentaje de inhibición a los 12 días de la interacción entre la cepa FP-24-0190 con bacterias del género *Bacillus* sembrados en cultivo dual. Los resultados obtenidos con valor $p < 0,05$ indican fuerte evidencia en contra de la hipótesis nula, lo que quiere decir, que los tratamientos que se comparan son diferentes entre sí. De manera similar la prueba de Tukey al 5% para el porcentaje de inhibición, reporta 2 rangos de significancia, el rango A y B, el rango A (T1 y T2) presentan bajos valores de sus medias y el rango B (T3) los valores más altos de inhibición.

Antagonismo *Bacillus-Fusarium oxysporum*

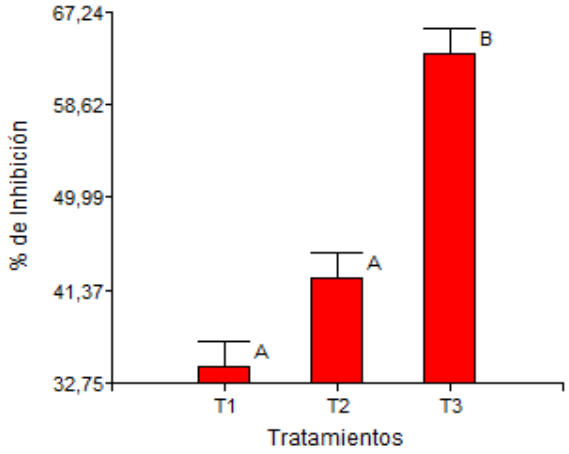


Figura 15 Porcentaje de inhibición de la cepa fúngica (FP-24-0190), en cultivo dual con cepas bacterianas (T1 y T2) y un control (T3).

Fuente: (La autora, 2024).

Aplicando la fórmula de (Soylu et al., 2020) , para determinar el porcentaje de inhibición se obtuvieron los siguientes resultados: para el tratamiento T1 la media de los resultados fue del 34.32%, para el T2 fue del 42,54% y para el T3 el promedio de las cinco repeticiones fue del 63,38%. Esto nos permite definir que las dos cepas utilizadas presentaron antagonismo frente a *F. oxysporum*, además que la cepa de *B. subtilis* (Bs), presenta un mayor porcentaje de inhibición en contraste con *B. megaterium.* El efecto inhibitorio se puede deber a la producción de kanosamina producida en varias especies de *Bacillus*, incluida *B. subtilis* (Khan et al., 2022). Existen reportes donde indican que varias cepas bacterianas de *B. subtilis* ejercieron inhibición frente a *F. oxysporum* (Ayala et al., 2023), también se evidencio la inhibición *in vitro* de las cepas bacterianas de *B. subtilis* al ser evaluados con varios aislados de FocR2 colectadas en tres sitios de producción de plátano (Florencio et al., 2022). De igual manera al contrastar cepas de diez aislados de *Bacillus* de suelo sano de la rizosfera de garbanzo, tuvieron efectos

antagónicos en condiciones *in vitro*, al ser evaluados contra *Fusarium oxysporum* f.sp. ciceris (Venkataramanamma et al., 2022). De manera similar cepas de *B. subtilis* y *B. megaterium*, tuvieron efectos antagónicos frente a cepas de la especie *F. oxysporum* f. sp. ciceris, aislados del suelo de postcosecha de campos donde se cultivaban garbanzos y trigo (Ozturk & Endes, 2023).

En ensayos análogos al evaluar el efecto antagónico de *B. megaterium* var. phosphaticum contra varios hongos, incluido *F. oxysporum* se evidencio la fuerte actividad antagonista mediante la producción de sideróforos y quitinasa los cuales actúan en contra de los fitopatógenos (Amalraj et al., 2012). Asimismo, la evaluación de siete cepas de *B. megaterium* que mediante el ensayo de estriado en placa produjo sideróforos que permitieron evidenciar la capacidad de la bacteria para suprimir el crecimiento de *F. oxysporum* (Shobha & Kumundini, 2012)

Con respecto a los diversos ensayos realizados para evaluar la capacidad antagónica de *B. subtilis* y *B. megaterium* es preciso mencionar que las cepas bacterianas utilizadas en esta investigación, permitieron evidenciar que existe antagonismo en contra de la cepa de *F. oxysporum.*

4. Conclusiones y Recomendaciones

Conclusiones

La identificación mediante primers específicos de la cepa de *Fusarium* sp. permitió el diagnostico de *Fusarium oxysporum* y la secuenciación permitió corroborar la identidad las cepas, CT11 como *Bacillus megaterium* (99% de cobertura) y Bs como *Bacillus subtilis* (99% de cobertura).

El ensayo de evaluación *in vitro de* la capacidad antagónica de las dos cepas de *Bacillus* spp. frente a *Fusarium oxysporum.* Tuvo como resultado que las cepas T1 y T2 presentaron un porcentaje de inhibición del 34.32% y 42,54% respectivamente y el T3 (cloruro de aquil-dimetil-bencil-amonio 0,2 %) presento un porcentaje del 63,38%, lo que permite concluir que las cepas bacterianas (CT11 Y Bs) utilizados en la investigación presentaron antagonismo frente a la cepa de *Fusarium oxysporum* (FP-24-0190).

Recomendaciones

Se deben realizar ensayos con variación de concentraciones bacterianas, para evaluar la actividad antagónica de las cepas bacterianas.

Verificar la capacidad antagónica con diferentes cepas de fusarium aisladas de varios cultivos

Realizar ensayos *in vivo* con las cepas que presentaron antagonismo con la cepa de *Fusarium oxysporum.*

5. Bibliografía

Abdelmoteleb, A., Moreno-Ramírez, L., Valdez-Salas, B., Seleiman, M. F., El-Hendawy, S., Aldhuwaib, K. J., Alotaibi, M., & González-Mendoza, D. (2023). New *Bacillus subtilis* Strains Isolated from Prosopis glandulosa Rhizosphere for Suppressing Fusarium Spp. and Enhancing Growth of Gossypium hirsutum L. *Biology*, *12*(1), 73. https://doi.org/10.3390/BIOLOGY12010073/S1

Agrios, G. (2004). Plant pathology: Fifth edition. *Plant Pathology: Fifth Edition*, *9780080473789*, 1–922. https://doi.org/10.1016/C2009-0-02037-6

Agrocalidad. (2018). *Agrocalidad-Laboratorio de Fitopatología*.

Alabouvette, C. (2000). Ribosomal DNA-targeted oligonucleotide probe and PCR assay specific for *Fusarium oxysporum. Mycological Research*. https://www.academia.edu/15399569/Ribosomal_DNA_targeted_oligonucleotide_probe_and_PCR_assay_specific_for_*Fusarium_oxysporum*

Alonso, C., Gonzalez1, R., Estefan, J., Adrián, B., Betancurt3, D., & Lara, R. (2017). ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE *BACILLUS* SP FRENTE A *FUSARIUM OXYSPORUM*: UN APORTE A LA AGRICULTURA SOSTENIBLE. In *Revista Nova* (Vol. 3).

Amalraj, D., Maiyappan, S., & Peter, A. J. (2012). *In vivo* and *In vitro* studies of *Bacillus megaterium* var. phosphaticum on nutrient mobilization, antagonism and plant growth promoting traits. *Journal of Ecobiotechnology*, *1*, 35–42. http://journal-ecobiotechnology.com/

Ayala-Torres, A. M., Aranda-Ocampo, S., León-García de Alba, C. De, Nava-Díaz, C., Sánchez-Pale, J. R., Ayala-Torres, A. M., Aranda-Ocampo, S., León-García de Alba, C. De, Nava-Díaz, C., & Sánchez-Pale, J. R. (2023). Bacterias antagonistas contra

Fusarium spp. aisladas de esclerocios de Claviceps gigantea en maíz (Zea mays). *Revista Mexicana de Fitopatología*, *41*(2), 143–164. https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2208-2

Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, *6*(2), 71–79. https://doi.org/10.1016/J.JPHA.2015.11.005

Berkeley, R., Heyndrickx, M., Logan, N., & De Vos, P. (2002). *Applications and Systematics of Bacillus and Relatives*.

Biolog. (2008). *GEN III Test Panel*. https://www.biolog.com/products/microbial-identification-microplates/gen-iii-test-panel/

CABI. (2021, November 16). *Bacillus*. https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.104033

CABI. (2022). *Fusarium oxysporum* (basal rot). *PlantwisePlus Knowledge Bank, Species Pages*. https://doi.org/10.1079/PWKB.SPECIES.24677

Castellanos, G. J. C. M. G. (2011). *Guias_practicas_laboratorio_patogenos_frijol*.

Ceja, F., Gálvez, L., & Ruiz, C. (2001). Comparación de Métodos de Control de la Secadera de la Fresa (Fragaria x ananassa Duch.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, *19*(2), 147–153. https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61219203

Crous, P. W., Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Seifert, K. A., Schroers, H. J., Chaverri, P., Gené, J., Guarro, J., Hirooka, Y., Bensch, K., Kema, G. H. J., Lamprecht, S. C., Cai, L., Rossman, A. Y., Stadler, M., Summerbell, R. C., Taylor, J. W., Ploch, S., Visagie, C. M., … Thines, M. (2021). *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped

basal cell. *Studies in Mycology*, *98*, 100116. https://doi.org/10.1016/J.SIMYCO.2021.100116

Dimkić, I., Janakiev, T., Petrović, M., Degrassi, G., & Fira, D. (2022). Plant-associated *Bacillus* and *Pseudomonas* antimicrobial activities in plant disease suppression via biological control mechanisms - A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *117*, 101754. https://doi.org/10.1016/J.PMPP.2021.101754

Domsch, K. H. , G. W. and A. T. H. (2007). *Compendium of Soil Fungi. IHW-Verl, Eching, 672 p.* https://www.sciepub.com/reference/381751

Elleuch, L., Shaaban, M., Smaoui, S., Mellouli, L., Karray-Rebai, I., Fourati-Ben Fguira, L., Shaaban, K. A., & Laatsch, H. (2010). Bioactive Secondary Metabolites from a New Terrestrial Streptomyces sp. TN262. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *162*(2), 579. https://doi.org/10.1007/S12010-009-8808-4

Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews. Microbiology*, *1*(2), 117–126. https://doi.org/10.1038/NRMICRO750

Florencio, J., Alarcón, A., García, C. de J., Ferrera, R., Quezada, A., Almaraz, J. J., Espinosa, M., Bocanegra, D. A., & Hernández, L. (2022). *In vitro* inhibition of bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 2. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*. https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2207-2

Gordon, R., Haynes, W., & Pang, H.-N. (1973). *The genus Bacillus*. https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=uiug.30112019255089&seq=3

Harwood, C. (1989). *Bacillus Identification Methods*.

Henrique, P., Martins, R., Rabinovitch, L., Orem, J., Silva, W., Mesquita, F., Magalhaes, M., Cavalcante, D., Vivoni, A., Brito, J., Oliveira, E., Lima, V., & De-Souza, M. (2022). *Biochemical, physiological, and molecular characterisation of a large collection of aerobic endospore-forming bacteria isolated from Brazilian soils*. https://doi.org/10.3897/arphapreprints.e86638

INEC. (2023). *Censo Nacional Agropecuario*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-nacional-agropecuario/

Karimi, K., Amini, J., Harighi, B., & Bahramnejad, B. (2012). Evaluation of biocontrol potential of *Pseudomonas* and *Bacillus* spp. against *Fusarium* wilt of chickpea. *Australian Journal of Crop Science*.

Khan, A. R., Mustafa, A., Hyder, S., Valipour, M., Rizvi, Z. F., Gondal, A. S., Yousuf, Z., Iqbal, R., & Daraz, U. (2022). Bacillus spp. as Bioagents: Uses and Application for Sustainable Agriculture. *Biology*, *11*(12). https://doi.org/10.3390/BIOLOGY11121763

Kumar, A., Prakash, A., & Johri, B. N. (2011). Bacillus as PGPR in Crop Ecosystem. *Bacteria in Agrobiology: Crop Ecosystems*, 37–59. https://doi.org/10.1007/978-3-642-18357-7_2

Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2007). The *Fusarium* Laboratory Manual. *The Fusarium Laboratory Manual*, 1–388. https://doi.org/10.1002/9780470278376

Logan, N. A., & Vos, P. De. (2015). Bacillus. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–163. https://doi.org/10.1002/9781118960608.GBM00530

OZTURK, M., & ENDES, A. (2023). Isolation of bacterial isolates from soil samples and determination of their in vitro antagonistic potential against chickpea wilt disease

agent *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris. *Harran Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*, *27*(1), 64–72. https://doi.org/10.29050/harranziraat.1216304

Priest, F. (1989). *Bacillus identification Methods*.

QIAGEN. (2016). *DNeasy ® Plant Mini Kit*. www.qiagen.com/safety

Rawat, S., Joshi, G., Annapurna, D., Arunkumar, A. N., & N. Karaba, N. (2016). Standardization of DNA Extraction Method from Mature Dried Leaves and ISSR-PCR Conditions for <i>Melia dubia</i> Cav. —A Fast Growing Multipurpose Tree Species. *American Journal of Plant Sciences*, *07*(03), 437–445. https://doi.org/10.4236/ajps.2016.73037

Sabrook, J., & Green, M. (2012). *Molecular Cloning*. www.cshlpress.org

Saint-Pierre, G., Henríquez, D., Paredes, L., & Gaete, M. (2023). Bacillus amyloliquefaciens. *Revista Chilena de Infectologia*, *40*(3), 289–290. https://doi.org/10.4067/S0716-10182023000300289

Sampaio, A. M., Rubiales, D., & Vaz Patto, M. C. (2021). Grass pea and pea phylogenetic relatedness reflected at *Fusarium oxysporum* host range. *CrPro*, *141*, 105495. https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2020.105495

Schaad, N. W. (Norman W.), Jones, J. B. (Jeffrey B., & Chun, Wesley. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society.

Scioscia, N. (2014). *Caracterización de cepas nativas de Bacillus thuringiensis con potencial biopesticida*.

Shobha, G., & Kumundini, B. (2012). *Antagonistic effect of the newly isolated PGPR Bacillus spp. on Fusarium oxysporum*.

Slabbinck, B., De Baets, B., Dawyndt, P., & De Vos, P. (2008). Genus-wide *Bacillus* species identification through proper artificial neural network experiments on fatty acid profiles. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *94*(2), 187–198. https://doi.org/10.1007/S10482-008-9229-Z

Soylu, E., Soylu, S., Kara, M., Kurt, Ş., Mustafa Kemal Üniversitesi, H., Fakültesi, Z., & Koruma Bölümü, B. (2020). Sebzelerde Sorun Olan Önemli Bitki Fungal Hastalık Etmenlerine Karşı Vermikomposttan İzole Edilen Mikrobiyomların *in vitro* Antagonistik Etkilerinin Belirlenmesi. *Journal Of Agriculture and Nature*, *23*(1), 7–18. https://doi.org/10.18016/KSUTARIMDOGA.VI.601936

Thermo Scientific. (2009). *NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer*. www.nanodrop.com

Venkataramanamma, K., Reddy, B. V. B., Jayalakshmi, R. S., Jayalakshmi, V., & Rajendran, L. (2022). Isolation, in vitro evaluation of Bacillus spp. against Fusarium oxysporum f.sp. ciceris and their growth promotion activity. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, *32*(1), 1–8. https://doi.org/10.1186/S41938-022-00618-3/TABLES/4

Wachid, A., & Sutarman. (2019). Inhibitory Power Test of Two *Trichoderma* Isolates in *In Vitro* Way Againts *Fusarium oxysporum* The Cause of Red Chilli Stem Rot. *Journal of Physics: Conference Series*, *1232*(1), 012020. https://doi.org/10.1088/1742-6596/1232/1/012020

Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schrenckenberger, P., & Woods, G. (2008). *Koneman Diagnóstico Microbiológico*. https://booksmedicos.org/koneman-diagnostico-microbiologico/

Xu, D., & Côté, J. C. (2003). Phylogenetic relationships between Bacillus species and related genera inferred from comparison of 3’ end 16S rDNA and 5’ end 16S-23S ITS nucleotide sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *53*(Pt 3), 695–704. https://doi.org/10.1099/IJS.0.02346-0

Yuan, J., Raza, W., Shen, Q., & Huang, Q. (2012). Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Applied and Environmental Microbiology*, *78*(16), 5942–5944. https://doi.org/10.1128/AEM.01357-12

Zeigler, D., & Perkins, J. (2008). The Genus *Bacillus*. *Practical Handbook of Microbiology, Second Edition*, 309–337. https://doi.org/10.1201/9781420009330.CH24

Zhang, S., Zhao, X., Wang, Y., Li J., Chen, X., & & Wang, A. (2012). *Molecular detection of fusarium oxysporum in the infected cucumber plants and soil*. https://www.researchgate.net/publication/285942346_Molecular_detection_of_fusarium_oxysporum_in_the_infected_cucumber_plants_and_soil

6. Anexos

Anexo 1 Convenio específico

REPÚBLICA DEL ECUADOR

Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario

Art. 87.- Establece como requisito previo a la obtención del titulo que: *"(...) los y las estudiantes deberán acreditar servicios a la comunidad mediante programas, proyectos de vinculación con la sociedad, (...)";*

Art. 114.- De la formación técnica y tecnológica indica: *"La formación técnica y tecnológica tiene como objetivo la formación de profesionales de tercer y cuarto nivel técnico-tecnológico orientada al desarrollo de las habilidades y destrezas relacionadas con la aplicación, coordinación, adaptación e innovación técnico-tecnológica en procesos relacionados con la producción de bienes y servicios";*

REGLAMENTO INTERNO PARA LA ADMINISTRACIÓN DEL TALENTO HUMANO

"Art 81.- De los tesistas.- Se refiere a los estudiantes de los últimos niveles de las universidades públicas o privadas que están facultados para realizar tesis o proyectos finales previos a su titulación."

"Art. 82.- Relación de los tesistas con la institución.- Ningún tesista podrá recibir ningún tipo de retribución económica por la realización de su tesis, ni generará ningún tipo de relación de laboral con AGROCALIDAD. La entidad como el tesista conjuntamente debe coordinar el horario de trabajo en el que se desarrolle el proyecto de tesis."

"Art. 83.- Procedimiento para recepción de tesistas.- Para la realización de la tesis c proyectos finales previos a su titulación, la autoridad de la Institución educativa del interesado deberá enviar una solicitud formal a la Máxima Autoridad o su delegado de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, solicitando autorización para realizar el proyecto de tesis,(...)"

"Art. 84.- Acuerdo de Confidencialidad para los tesistas.- Todo tesista deberá firmar un acuerdo de confidencialidad, la información institucional que se le proporcione se guiará bajo la política de confidencialidad de la institución, la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario podrá utilizar la Información producto de la tesis para los fines que considere pertinentes."

"Art. 85.- Del tutor de tesistas.- Los tesistas tendrán un tutor el tiempo que dure la elaboración de tesis en la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario. El tutor será nombrado por el Jefe del lugar de trabajo, en el cual se realizará la tesis de grado".

"Art. 86.- Del producto final de la tesis.- Una vez culminada el proyecto de investigación, el tesista deberá entregar un ejemplar de su trabajo final a la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, la entidad podrá hacer uso del proyecto entregado para fines institucionales."

Con documento Oficio No. S/N del 29 de enero de 2024, la Directora de la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana, MSc. María Elena Maldonado Rodríguez, solicitó al Ing. Patricio Almeida, Director Ejecutivo de "La Agencia",

Dirección: Av. Eloy Alfaro N30-350 y Av. Amazonas
Código postal: 170516 / Quito-Ecuador
Teléfono: +593 2 382 8860
www.agrocalidad.gob.ec

EL NUEVO ECUADOR

autorización para que la estudiante Srta. Maria Lizbeth Ortega Cuenca, realice su proyecto de titulación en "La Agencia".

"La Tesista" estudiante de la Universidad Politécnica Salesiana ha manifestado su deseo de realizar su proyecto de titulación en las instalaciones de "la Agencia.

8.- "La Agencia" ha informado con Oficio Nro. AGR-AGROCALIDAD/DARH-2024-000028-OF que la estudiante ha sido aceptada para que realice el tema de investigación.

SEGUNDA.- OBJETO.-

Con los antecedentes expuestos, "La Agencia" acepta y autoriza que la estudiante, Maria Lizbeth Ortega Cuenca realice su trabajo de titulación denominado: *"EVALUACIÓN IN VITRO DE CEPAS DE Bacillus spp.,EN EL CONTROL DE Fusarium oxysporum"*, en las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología desde el 5 de febrero al 31 de julio de 2024, para lo cual se delega como tutor al Ing. Jairo Leonardo Guevara Andrade, Analista de Fitopatología quien guiará y supervisará las actividades relacionadas al proyecto de investigación indicado.

TERCER.-LUGAR Y HORARIOS.-

"La Tesista" cumplirá sus funciones en el lugar donde quedan ubicadas las oficinas de "La Agencia", cuya dirección es Av. Amazonas y Eloy Alfaro en la ciudad de Quito y las oficinas ubicadas en el sector de la Granja en Tumbaco o en el lugar y dentro del horario en el que expresamente le dispusiere el administrador o servidores de "La Agencia".

CUARTA. -REMUNERACIÓN. -

La relación entre las partes es únicamente por formación académica, por cuanto, se excluye el pago de un estipendio mensual.

QUINTA.- OBLIGACIONES DE LA TESISTA.-

1.-Cumplir y someterse a las normas, disposiciones y horarios que se establezcan y que declara de antemano conocer y aceptar.

2.- Prestar sus servicios con diligencia, ética y guardando la debida discreción y confidencialidad en los asuntos, que en razón de sus funciones lleguen a su conocimiento. Esta obligación de confidencialidad, subsistirá aun dentro de los dos años subsiguientes a la fecha de vencimiento de este acuerdo de Formación Académica.

3.- Cuidar y mantener en debida forma los bienes, equipos, documentos, valores, etc., que le fueren entregados para la ejecución de sus labores y que estuviesen a su cuidado, responsabilizándose por aquellos daños, pérdidas o deterioros que provengan del uso normal y les sean imputables.

4.- Entregar una copia digital del trabajo final de titulación.

SEXTA.-PLAZO.-

El presente convenio iniciará desde el 5 de febrero al 31 de julio de 2024, sin lugar al pago de ninguna clase de indemnización.

SEPTIMA.-NATURALEZA DE LA RELACIÓN.-

El trabajo de titulación a desarrollarse en virtud del presente Convenio son únicamente de formación académica puesto que contribuyen en la aplicación de conocimientos y al desarrollo de destrezas y habilidades específicas que un estudiante debe adquirir para su correcto desempeño académico, en tal sentido las PARTES están obligadas a observar lo determinado en el artículo 87 de la Ley Orgánica de Educación Superior (LOES).

El seguro estudiantil por riesgos laborales, será cubierto por seguros PICHINCHA, el mismo que se encuentra vigente hasta el 27 de mayo del 2024, siempre y cuando la estudiante esté matriculada en el período académico correspoindiente. Seguro contratado directamente con la Universidad Politécnica Salesiana.

OCTAVA.- JURISDICCIÓN Y COMPETENCIA.-

En caso de controversia entre las partes, estas se someterán a los jueces competentes del civil de la ciudad de Quito, y al trámite verbal sumario.

Para la validez y plena eficacia de este instrumento, los comparecientes lo firman en esta ciudad de Quito, el 2 de febrero de 2024, dos ejemplares de igual tenor. Por parte de la Institución firmará la Directora General de Administración de Recursos Humanos o quien haga sus veces.

NOVENA.- CONFIDENCIALIDAD.-

El Tesista acepta y conoce toda la información que llegue a su conocimiento, en razón de la ejecución del presente convenio, debe ser tratada con absoluta reserva, especialmente aquella considerada confidencial o no divulgable conforme las políticas y normas de seguridad de información de la Institución, por lo que deberá mantener la confidencialidad aún después de terminado el proyecto de titulación.

Por lo tanto, está prohibida su utilización en beneficio propio o de terceros o en contra de los intereses "La Agencia". El incumplimiento de esta obligación será causal para dar por terminado este convenio unilateralmente, sin perjuicio de la facultad que tiene "La Agencia" para iniciar las acciones civiles o penales a que hubiera lugar.

Al tesista le queda expresamente prohibido reproducir o publicar la información que llegue a su conocimiento en razón de la ejecución de este convenio, incluyendo coloquios, exposiciones, conferencias o actos académicos, salvo autorización por escrito de "La Agencia".

CONVENIO INDIVIDUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN ENTRE LA AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOOSANITARIO Y SRTA. ORTEGA CUENCA MARIA LIZBETH, ESTUDIANTE DE LA UNIVERSIDAD POLITECNICA SALESIANA.

Comparecen en la suscripción del presente convenio individual para la realización de trabajo de titulación, por la Agencia de Control y Regulación Fito y Zoosanitario una parte, a quien en adelante y para efectos de este convenio se le denominará "La Agencia", y por otra parte la estudiante, María Lizbeth Ortega Cuenca portadora de la cédula de ciudadanía número 1726793746, por sus propios derechos, a quien para efectos de este mismo acuerdo se le denominará "La Tesista".

Los comparecientes están en capacidad para convenir, quienes libres y voluntariamente convienen en celebrar un convenio para la realización de trabajo de titulación, las declaraciones y estipulaciones contenidas en las siguientes cláusulas.

"La Agencia" y "La Tesista" en adelante se les denominarán conjuntamente como "Partes" e individualmente como "Parte".

PRIMERA.-ANTECEDENTES.-

Art. 351 de la Constitución de la República del Ecuador establece que: "*El sistema de educación superior estará articulado al sistema nacional de educación y al Plan Nacional de Desarrollo; la ley establecerá los mecanismos de coordinación del sistema de educación superior con la Función Ejecutiva. Este sistema se regirá por los principios de autonomía responsable, cogobierno, igualdad de oportunidades, calidad, pertinencia, integralidad, autodeterminación para la producción del pensamiento y conocimiento, en el marco del diálogo de saberes, pensamiento universal y producción científica tecnológica global*".

LEY ORGÁNICA DE EDUCACIÓN SUPERIOR

Art. 3.- Referente a los Fines de la Educación Superior señala.- "*La educación superior de carácter humanista, intercultural y científica constituye un derecho de las personas y un bien público social que, de conformidad con la Constitución de la República, responderá al interés público y no estará al servicio de intereses individuales y corporativos*".

Art. 13.- Establece las Funciones del Sistema de Educación Superior entre las cuales es preciso, mencionar los siguientes literales.- "*b) Promover la creación, desarrollo, transmisión y difusión de la ciencia, la técnica, la tecnología y la cultura; k) Promover mecanismos asociativos con otras instituciones de educación superior, así como con unidades académicas de otros países, para el estudio, análisis, investigación y planteamiento de soluciones de problemas nacionales, regionales, continentales y mundiales; n) Garantizar la producción de pensamiento y conocimiento articulado con el pensamiento universal; o) Brindar niveles óptimos de calidad en la formación y en la investigación*";

La Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario, podrá hacer uso de la tesis o trabajo de titulación realizado por la tesista, según estime pertinente

Mgs. Gissel Alexandra Ron Sumba
Directora General de Administración de Recursos Humanos
C.I.: 1724295843

María Lizbeth Ortega Cuenca

La Tesista

C.C.: 1726793746

ACCIÓN	RESPONSABLE	CARGO	FIRMA
Elaborado por:	Psic. Ind. Carlos Sandoval Tamayo C.C.:1711442382	Analista de Administración de Talento Humano 3	
Revisado por:	Mgs. Johaho Calvas Guerra C.C.:1722685045	Analista de Administración de Talento Humano 3	
Aprobado por:	Mgs. Gissel Alexandra Ron Sumba C.C.:1724295843	Directora General de Administración de Recursos Humanos	