



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

**BACTERIAS DEL GÉNERO *Bacillus* COMO AGENTES DE CONTROL
BIOLÓGICO *IN VITRO* DE LOS HONGOS FITOPATÓGENO *Botrytis* sp. Y
Colletotrichum sp.**

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

AUTORES: KATHERINE CAROLINA JIMÉNEZ PAZMIÑO

ANTONELLA SILVA MOYA

TUTOR: RAMIRO DANIEL ACURIO VASCONEZ

Quito-Ecuador

2025

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Jiménez Pazmiño Katherine Carolina con documento de identificación N° 1750753541 y Antonella Silva Moya con documento de identificación N° 1722107974; manifestamos que:

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

Quito, 20 de febrero del año 2025

Atentamente,



Jiménez Pazmiño Katherine Carolina
1750753541



Silva Moya Antonella
1722107974

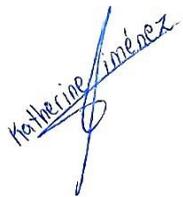
**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Nosotras, Katherine Carolina Jiménez Pazmiño con documento de identificación No. 1750753541 y Antonella Silva Moya con documento de identificación No. 1722107974, expresamos nuestra voluntad y por medio del presente documento cedemos a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que somos autores del Trabajo experimental: “Bacterias del género *BACILLUS* como agentes de control biológico *in vitro* de los hongos fitopatógeno *BOTRYTIS SP.* y *COLLETOTRICHUM SP.*”, el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: Ingenieras en Biotecnología, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

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

Quito, 20 de febrero del año 2025

Atentamente,



Katherine Carolina Jiménez Pazmiño
1750753541



Silva Moya Antonella
1722107974

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Ramiro Daniel Acurio Vásconez con documento de identificación N° 1714819495, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: “Bacterias del género *BACILLUS* como agentes de control biológico *in vitro* de los hongos fitopatógeno *BOTRYTIS* SP. y *COLLETOTRICHUM* SP. ”, realizado por Katherine Carolina Jiménez Pazmiño con documento de identificación N° 1750753541 y por Antonella Silva Moya con documento de identificación N° 1722107974, 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, 20 de febrero del año 2025

Atentamente,



Ing. Ramiro Daniel Acurio Vásconez. Mgtr.

1714819495

Dedicatoria y agradecimiento

A mis padres, Robert y Viviana, a mis abuelos, Iván y Yolanda, y a mi tía Catalina, quienes me han dado su amor incondicional, por enseñarme a través de su ejemplo el valor del esfuerzo y la dedicación, y por los numerosos sacrificios que hicieron para brindarme la oportunidad de estudiar lo que realmente apasiona mi corazón. Sus recomendaciones en los momentos de incertidumbre y su firme confianza en mí han sido una luz que orientó mi camino académico.

A Leo, mi adorada mascota, por llenar mis días de felicidad y cariño. Agradezco que siempre estés a mi lado, por tu cariño absoluto y por estar conmigo en extensas noches de estudio incluso cuando el sueño te ganaba.

A mis amigos, por el apoyo brindado durante todos los semestres que compartimos juntos.

A mis profesores, en especial a quien me guió en mi tesis. Por sus conocimientos, aporte, tiempo y orientación en este proyecto académico.

A mi compañera de tesis, por su apoyo en este trabajo, le agradezco su compromiso y dedicación, que nos permitió superar juntas cada reto.

A una persona muy especial que, en una fase decisiva de este camino, fue mi principal apoyo; su continuo aliento, la confianza que tuvo en mí, su recordatorio de lo importante que era seguir adelante; todo esto está impreso en el éxito de este logro, siempre llevaré en mi corazón un profundo agradecimiento.

Se lo debo a todos ustedes que caminaron conmigo y celebraron cada pequeño paso que di hacia adelante. Con infinita gratitud, les dedico este logro.



Katherine Carolina Jiménez Pazmiño

En primer lugar, agradezco a Dios por ser guía de mi vida que con su amor infinito me ha dado la fortaleza, paciencia, perseverancia en momentos difíciles y luz en mi camino hacia la realización de esta meta y todas las que vendrán más adelante.

Estoy profundamente agradecida con mi Mamá y Papá, por ser el pilar fundamental en mi formación académica y como persona; pues son quienes han puesto amor incondicional, esfuerzo, sacrificio y que, a pesar de dificultades, están a mi lado en cada momento dándome siempre lo mejor para que siga adelante; gracias por inculcarme valores y compartirme enseñanzas de gran valor. A mi pequeña hermana que ha estado conmigo en todo con su cariño, apoyo y comprensión que me animó cuando más lo necesitaba. Gracias por todo, los amo mucho.

A mi mejor amiga, que siempre creyó en mí y me daba impulso para seguir adelante, todo su cariño y apoyo que se mantienen desde el cielo siendo luz en todo momento. Este logro te lo dedico a ti mi gemela, porque, aunque ya no estés físicamente, tu amor y compañía siguen siendo mi mayor fortaleza. Siempre estarás en mi corazón.

A las personas maravillosas que la Universidad me dio la dicha de conocer y que ahora son parte importante de mi vida; mis amigas, mi comadre quién se volvió mi confidente y una amistad de gran valor. También aquella persona que me ha dado su amor, apoyo incondicional, que me ha mostrado que soy capaz y con su nobleza y dulzura se ganó mi corazón. Gracias por compartir conmigo momentos inolvidables llenos de risas, aprendizajes, cariño y ser ayuda en las dificultades. Su presencia ha hecho que este camino sea muy significativo y disfrutable.

A Sarita, por ser una amistad incondicional desde que éramos pequeñas mostrándome siempre su sinceridad, cariño y soporte, gracias por estar conmigo.

Doy gracias a mi tutor de tesis y compañera por su enseñanza, paciencia y esfuerzo que han sido un valioso aporte para hacer posible este trabajo.

A todos los mencionados, mis más sinceros agradecimientos.



Silva Moya Antonella

Resumen

Los hongos fitopatógenos *Botrytis* sp. y *Collectotrychum* sp., son conocidos por causar enfermedades devastadoras a cultivos agrícolas, siendo causantes de pérdidas económicas significativas a nivel nacional e internacional dada su capacidad de sobrevivir como saprófitos y propagarse con facilidad en condiciones ambientales favorables. Dada esta problemática, es común que se recurra a fungicidas químicos que, no solo resultan perjudiciales para la salud ambiental y humana, sino que también se induce una resistencia por parte de los fitopatógenos. En respuesta a estas preocupaciones, se ha visto la necesidad de buscar opciones más amigables y eficientes, por lo cual, el objetivo principal de este trabajo es evaluar cepas de *Bacillus* sp. para el control *in vitro* de *Botrytis* sp. y *Colletotrichum* sp. Para el proceso experimental, con las 17 cepas que resistieron la termoterapia se llevó a cabo pruebas de enfrentamientos duales para el análisis del porcentaje de inhibición, la producción de metabolitos secundarios mediante sistemas de biorreactores tipo Batch aireados simples y las pruebas de antibiogramas para evaluar la capacidad de dichos metabolitos para inhibir el crecimiento de los fitopatógenos en cuestión. Se evaluó que la cepa F25 para *Botrytis*, O41 y *B. megaterium* para *Colletotrichum*, muestran el mejor porcentaje inhibitorio en los enfrentamientos. En cuanto a los antibiogramas se identificó que *Bacillus* actúa de mejor manera frente a *Botrytis* en su estado celular, mientras que para *Colletotrichum* la cepa que presentó mejor inhibición con metabolitos secundarios fue S60. Dichos resultados demuestran que el género *Bacillus* sp. es un potencial biocontrolador, ofreciendo una alternativa sostenible para el desarrollo de bioproductos.

Palabras clave: Biocontrol, Fitopatógenos, Metabolitos, Inhibición.

Abstract

The phytopathogenic fungi *Botrytis* sp. and *Colletotrichum* sp. are known to cause devastating diseases in agricultural crops, causing significant economic losses at national and international levels due to their ability to survive as saprophytes and spread easily under favorable environmental conditions. Given this problem, it is common to resort to chemical fungicides that are not only harmful to environmental and human health, also induce resistance by phytopathogens. In response to these concerns, there has been a need to find more friendly and efficient options, therefore, the main objective of this work is to evaluate *Bacillus* sp strains for the in vitro control of *Botrytis* sp. and *Colletotrichum* sp. For the experimental process, with the 17 strains that resisted thermotherapy, dual confrontation tests were carried out for the analysis of the percentage of inhibition, the production of secondary metabolites using simple aerated Batch bioreactor systems and antibiogram tests to evaluate the capacity of said metabolites to inhibit the growth of the phytopathogens in question. It was evaluated that the strain F25 for *Botrytis*, O41 and *B. megaterium* for *Colletotrichum*, show the best inhibitory percentage in the confrontations. Regarding the antibiograms, it was identified that *Bacillus* acts better against *Botrytis* in its cellular state, while for *Colletotrichum* the strain that presented the best inhibition with secondary metabolites was S60. These results demonstrate that the *Bacillus* sp. genus is a potential biocontroller, offering a sustainable alternative for the development of bioproducts.

Keywords: Biocontrol, Phytopathogen, Metabolites, Inhibition.

Índice de Contenidos

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Introducción | 1 |
| 2 | Fundamentación teórica | 4 |
| 2.1 | Hongo Fitopatógeno <i>Botrytis</i> sp..... | 4 |
| 2.1.1 | Características principales (Macroscópicas y Microscópicas) | 4 |
| 2.1.2 | Condiciones de desarrollo | 5 |
| 2.1.3 | Ciclo de la enfermedad..... | 6 |
| 2.1.4 | Principales especies afectadas por <i>Botrytis</i> sp. en el Ecuador | 7 |
| 2.2 | Hongo fitopatógeno <i>Colletotrichum</i> sp..... | 8 |
| 2.2.1 | Características principales (Macroscópicas y Microscópicas) | 9 |
| 2.2.2 | Condiciones de desarrollo | 9 |
| 2.2.3 | Ciclo de la enfermedad..... | 10 |
| 2.2.4 | Principales especies afectadas por <i>Colletotrichum</i> sp. en el Ecuador..... | 11 |
| 2.3 | Control Biológico..... | 12 |
| 2.4 | El género <i>Bacillus</i> | 13 |
| 2.4.1 | Características principales..... | 13 |
| 2.4.2 | Condiciones de Desarrollo | 14 |
| 2.4.3 | Ciclo de vida..... | 14 |
| 2.5 | <i>Bacillus</i> como controlador biológico | 15 |
| 2.5.1 | Mecanismos de acción | 16 |
| 2.6 | Producción de metabolitos en bacterias del género <i>Bacillus</i> a escala de laboratorio 18 | |
| 2.6.1 | Biorreactores | 19 |
| 2.6.1.1 | Elementos de un Biorreactor..... | 19 |
| 2.6.2 | Tipos de Biorreactores por su modo de Operación | 20 |
| 2.7 | Pruebas in vitro para evaluar el biocontrol de <i>Botrytis</i> sp. y <i>Collectotrichum</i> sp.... | 21 |
| 2.7.1 | Pruebas de Enfrentamiento..... | 21 |
| 2.7.2 | Pruebas con Antibiograma | 22 |
| 2.8 | Mecanismos de antagonismo para el biocontrol de <i>Botrytis</i> sp. y <i>Collectotrichum</i> sp. 22 | |
| 2.8.1 | Antibiosis | 23 |
| 2.8.2 | Competencia..... | 23 |
| 2.8.3 | Inducción de Resistencia..... | 23 |
| 2.8.4 | Explotación..... | 24 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.8.5 | Lisis..... | 24 |
| 3 | Materiales y Métodos..... | 24 |
| 3.1 | Ensayos de Termorresistencia..... | 24 |
| 3.2 | Ensayos microscópicos..... | 25 |
| 3.2.1 | Tinción Gram..... | 25 |
| 3.2.2 | Tinción Schaeffer Fulton (endosporas)..... | 27 |
| 3.3 | Banco de cepas de interés y siembra de hongos fitopatógenos..... | 28 |
| 3.4 | Producción de metabolitos secundarios..... | 29 |
| 3.4.1 | Siembra bacteriana y medio de fermentación..... | 29 |
| 3.4.2 | Ensamblaje del biorreactor..... | 29 |
| 3.4.3 | Extracción de metabolitos secundarios..... | 30 |
| 3.5 | Pruebas de antagonismo..... | 31 |
| 3.5.1 | Enfrentamiento (Inhibición)..... | 31 |
| 3.5.1.1 | Determinación de la actividad antagonica de <i>Bacillus</i> sp. (Porcentaje de Inhibición)..... | 32 |
| 3.5.2 | Antibiograma (Antibiosis)..... | 33 |
| 3.5.2.1 | Análisis Cualitativo Botrytis..... | 34 |
| 3.5.3 | Análisis Estadístico..... | 34 |
| 4 | Resultados y discusión..... | 35 |
| 4.1 | Termoterapia..... | 35 |
| 4.2 | Validación microscópica..... | 36 |
| 4.2.1 | Tinción Gram..... | 36 |
| 4.2.2 | Tinción de endosporas..... | 37 |
| 4.3 | Porcentaje de Inhibición de crecimiento radial (PIRC)..... | 38 |
| 4.3.1 | <i>Botrytis</i> sp..... | 38 |
| 4.3.2 | <i>Colletotrichum</i> sp..... | 41 |
| 4.4 | Ensayos de antibiosis (Antibiograma)..... | 44 |
| 4.4.1 | <i>Botrytis</i> sp..... | 44 |
| 4.4.2 | <i>Colletotrichum</i> sp..... | 46 |
| 5 | Conclusiones..... | 49 |
| 6 | Recomendaciones..... | 50 |
| 7 | Bibliografía..... | 51 |
| 8 | Anexos..... | 57 |

Índice de Figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1 Ciclo de la enfermedad de <i>Botrytis</i> sp. | 7 |
| Figura 2 Ciclo de infección <i>Colletotrichum</i> sp. | 11 |
| Figura 3 Ciclo de vida del género <i>Bacillus</i> sp..... | 15 |
| Figura 4 Estructura de un Biorreactor | 20 |
| Figura 5 Ensayo de termorresistencia. A) Bacterias de 24h de incubación, B) Baño María, C) Siembra de las cepas..... | 25 |
| Figura 6 Tinción Gram. A) realizado del frotis bacteriano B) Aplicación de Cristal violeta C) Aplicación de Lugol D) Decoloración con alcohol-cetona E) Aplicación de la Safranina F) Observación en el microscopio..... | 26 |
| Figura 7 Tinción de endosporas. A) Frotis bacteriano B) Aplicación de verde malaquita 1% C) Colocación del papel filtro D) Exposición al calor E) Aplicación de safranina F) Observación en microscopio | 28 |
| Figura 8 Modelo de biorreactor tipo Batch | 30 |
| Figura 9 Esquema Enfrentamiento | 32 |
| Figura 10 Resultados Tinción Gram A) Cepa F34 B) Cepa H49 C) Cepa S41 | 36 |
| Figura 11 Resultados de tinción de endosporas bajo lente de 40X. A) Cepa O23, B) Cepa S60, C) Cepa H32 | 37 |
| Figura 12 Antagonismo de <i>Bacillus</i> sp contra <i>Botrytis</i> sp. A) Día 1 cepa B.M ,B) Día 2 cepa B.M ,C) Día 3 cepa B.M, D) Día 3 Testigo | 39 |
| Figura 13 Resultados Enfrentamiento <i>Colletotrichum</i> sp. A) Día 1 cepa S60 B) Día 3 cepa S60 C) Día 5 cepa S60 D) Día 6 cepa S60 E) Día 9 cepa S60 F) Día 9 Testigo..... | 42 |
| Figura 14 Resultados Antibiograma <i>Botrytis</i> sp. A) Cepa S41. Día 1 B) Cepa S41. Día 2 C) Cepa S41. Día 3 D) Testigo. Día 3 | 45 |

Figura 15 Resultados Antibiograma *Colletotrichum* sp. A) Día 2 cepa *B. subtilis* B) Día 4
cepa 60 C) Día 5 cepa O41 D) Testigo Día 4 47

Índice de Tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1 Resultados de PIRC para <i>Botrytis</i> sp. | 40 |
| Tabla 2 Resultados PIRC y prueba Tukey <i>Colletotrichum</i> sp..... | 43 |
| Tabla 3. Resultados Prueba Tukey para antibiograma de <i>Colletotrichum</i> sp. | 47 |

Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. Porcentaje de Inhibición 32

Ecuación 2. Cálculo D2..... 33

Índice de Anexos

| | |
|---|----|
| Anexo 1 Observación microscopica de <i>Botrytis</i> sp. Aumento 40x | 57 |
| Anexo 2 Banco cepas de <i>Bacillus</i> sp..... | 57 |
| Anexo 3 Tinción de endosporas de la cepa O41 | 57 |
| Anexo 4 Observación microscópica de <i>Colletotrichum</i> sp. Aumento 40x. | 58 |

1 Introducción

El crecimiento poblacional en el Ecuador ha planteado desafíos considerables para la agricultura, dado que es necesario satisfacer la alta demanda de alimentos, requerida para abastecer las necesidades primordiales de la población. A los desafíos inherentes en la producción de alimentos, se suman los daños en los cultivos ocasionados por fitopatógenos (Toral-Navarro, 2019).

Según Vinchira-Villarraga & Moreno-Sarmiento (2019), se estima que estas afecciones a nivel mundial generan pérdidas entre el 20-40% en la producción de cultivos sensibles, lo que en pérdidas económicas son hasta 40 billones de dólares.

Uno de los hongos fitopatógenos más prevalentes en Ecuador es *Botrytis* sp., un microorganismo común en los campos de producción agrícola, catalogado como necrótrofo, dado que ataca a los tejidos dañados o en fase de envejecimiento de las plantas (Pavone, 2020). Los síntomas que produce *Botrytis* sp. en las plantas puede variar según el tejido vegetal infectado y de su huésped, su presencia se caracteriza por un crecimiento mohoso de color gris y marrón claro, así como por la pudrición de frutos. Este hongo también genera una gran cantidad de micelio y conidióforos extensos que exhiben células apicales redondas que asemejan la forma de un racimo de uva (Toral-Navarro, 2019).

Según Pavone (2020), este microorganismo no tiene especificidad por un hospedante, pudiendo afectar cerca de 1000 especies de plantas, entre las cuales destacan cultivos como fresa, tomate, uva, melón, lechuga y el brócoli. En flores, ataca a rosa y begonia. Además, se conoce que *Botrytis* sp. puede infectar diferentes partes de las plantas como tallos, hojas, flores o frutos, afectándolas en diferentes etapas de su desarrollo (Toral-Navarro, 2019). En Ecuador, *Botrytis* causa pérdidas del 50% en cultivos de tomate (Pavone, 2020) y un promedio de pérdidas del 16% en rosas (Cucás-Trejo, 2018).

Colletotrichum sp. es otro hongo que afecta considerablemente a los cultivos del Ecuador. Este microorganismo, puede clasificarse como hemibiotrófico, necrotrófico, o endófito. Se caracteriza por causar el síntoma de antracnosis, el cual genera lesiones necróticas hundidas, de forma circular, oscuras o de color salmón en los tejidos vegetales. También puede ocasionar la podredumbre de frutos, tallos, hojas y tizones en flores (Favaro et al., 2022).

Este hongo afecta a una gran variedad de hospedantes, incluyendo a verduras, legumbres, frutas tropicales y subtropicales. Entre cultivos afectados destacan el tomate, la uva, el mango y los cítricos. En el Ecuador afecta a los cultivos de papaya y maracuyá, donde de acuerdo con Carreño et al. (2021), *Colletotrichum* puede provocar epifitias que ocasionan pérdidas mayores al 50%. La alta incidencia y la severidad de este hongo en plantas se debe a su carácter cosmopolita (Shi et al., 2020).

Morfológicamente, *Colletotrichum* se identifica por la forma y tamaño de conidios y apresorios, la presencia de setas, su velocidad de desarrollo y color del micelio, que varía desde gris hasta naranja (Menezes, 2013). No obstante, en algunos casos, estos criterios no son suficientes para diferenciar entre especies, debido a las alteraciones morfológicas y fenotípicas que pueden ocurrir por factores ambientales (Favaro et al., 2022).

Actualmente, muchos agricultores utilizan pesticidas de origen químico para controlar estos fitopatógenos. No obstante, el uso excesivo de estos productos ha provocado una disminución de su efectividad, resistencia por parte de estos patógenos y acumulación de residuos dañinos para el medio ambiente y la salud humana. Esto ha conducido a la búsqueda de alternativas más amigables con el medio ambiente, eficaces y económicas para enfrentar estos problemas (Toral-Navarro, 2019).

De allí surge el uso de controladores biológicos. De acuerdo con Vinchira-Villarraga & Moreno-Sarmiento (2019), se define como control biológico a la utilización de diferentes

organismos o sus derivados, que solos o en sinergia con otros pueden reducir los efectos negativos que ocasiona la comunidad patógena sobre el desarrollo y/o productividad de los cultivos.

En la actualidad, la gama de controladores biológicos es amplia, incluyendo microorganismos como hongos, bacterias y levaduras. Dentro de las bacterias las más estudiadas son las del género *Bacillus*, las cuales tienen forma de bastón, forman endosporas y pueden aislarse de una gran variedad de agrosistemas (Zhang et al., 2023). Estas bacterias logran ser antagonistas de muchos hongos debido a sus diferentes mecanismos, que incluye la competencia por nutrientes, la colonización de la bacteria hacia el patógeno y la excreción de componentes celulares como enzimas líticas, antibióticos y metabolitos secundarios (Villarreal-Delgado et al., 2018).

No obstante, el conocimiento de los agentes de biocontrol se encuentra en desarrollo, lo que dificulta comprender y aprovechar al máximo el potencial de estos microorganismos, especialmente las bacterias del género *Bacillus*, para enfrentar a los fitopatógenos que afectan los cultivos y así poder evitar el uso de pesticidas químicos (Zhang et al., 2023). A partir de esto, surge el objetivo principal de este trabajo de titulación, que consiste en evaluar cepas de *Bacillus* del cepario del laboratorio de Ciencias de la Vida de la Universidad Politécnica Salesiana, para el control *in vitro* de los hongos fitopatógenos de *Botrytis* sp. y *Colletotrichum* sp.

Adicionalmente, se busca identificar las características en la tinción Gram de las cepas del género *Bacillus* obtenidas; evaluar su actividad de control biológico a través de pruebas de antibiogramas contra los hongos de *Botrytis* sp. y *Colletotrichum* sp.; y finalmente, determinar la capacidad antagónica de las bacterias mediante pruebas de antagonismo duales contra los hongos fitopatógenos, con el fin de identificar las mejores cepas en términos de biocontrol.

2 Fundamentación teórica

2.1 Hongo Fitopatógeno *Botrytis* sp.

El género *Botrytis* corresponde a la familia Sclerotiniacea, Orden Helotiales. Se caracteriza por ser un hongo necrotrófico por lo que ataca a tejidos dañados, en fase de envejecimiento o muertos, generando la “podredumbre gris” (Toral-Navarro, 2019). Este hongo infecta especialmente a plantas dicotiledóneas, ya sean de cultivos anuales o cultivos perennes. Dependiendo del huésped y del tejido infectado, *Botrytis* puede generar diferentes síntomas, entre los que se encuentran: a) Pudrición temprana: cuyas lesiones se originan en el tallo de plantas en crecimiento; b) Tizón en flores: este síntoma puede ocasionar la muerte de los capullos antes de que se abran o manchas descoloridas en los pétalos de las flores; y c) Pudrimiento de frutas: genera regiones blandas de color marrón en el exterior de la fruta (InfoAgro, 2020).

Por lo general, la infección por *Botrytis* tiene una fase asintomática latente (quiescente), continuando con una fase necrotrófica agresiva durante la maduración o envejecimiento de los frutos y la post-cosecha (Pavone, 2020). Esto debido a los cambios generados en la cutícula, la pared celular y en la bioquímica general del fruto durante este proceso, así mismo se adiciona las heridas durante la cosecha que hacen que la planta y el fruto sean más susceptibles al hongo. De igual forma se ha logrado reportar su capacidad para producir moléculas que son capaces de inhibir los mecanismos de defensa en las plantas (Bolda & Koike, 2016).

2.1.1 Características principales (Macroscópicas y Microscópicas)

Botrytis es comúnmente conocido como el moho gris. A nivel macroscópico el micelio inicialmente puede observarse de tonalidad blanquecina pero conforme van pasando los días para su crecimiento, se torna de un aspecto algodonoso de tonalidad gris hasta marrón oscuro. El micelio está constituido por un conjunto abundante de filamentos cilíndricos tabicados

denominados hifas. De la masa hifal, se originan los conidióforos, estructuras alargadas de las cuales se forma una vesícula de donde emergen varios esterigmas conocidos como fiálides; en estas últimas se forman los microconidios (Romero & Granados, 2018).

Los conidios son esporas asexuales unicelulares, de forma elipsoidal a ovoide que miden entre 6-19 μm de longitud. Son de color café claro, de apariencia lisa y se forman en racimos en los extremos de los conidióforos, siendo los principales responsables de la reproducción del hongo. Los esclerocios, por su parte, son estructuras multicelulares de forma planoconvexa que otorgan resistencia, permitiendo al hongo sobrevivir en condiciones adversas. Cuando las condiciones son favorables nuevamente, los esclerocios pueden germinar y dar lugar a nuevos conidios, dependiendo de las condiciones del cultivo; por otro lado, existen otras estructuras de resistencia menos comunes llamadas clamidosporas, que se forman a partir de partes del micelio y sirven para sobrevivir en ambientes desfavorables, como cultivos contaminados o envejecidos. Estas clamidosporas son liberadas cuando las hifas se desintegran y pueden germinar cuando las condiciones mejoran (Romero & Granados, 2018).

2.1.2 Condiciones de desarrollo

Este hongo fitopatógeno tiene la capacidad de adaptarse a diferentes condiciones para su desarrollo; sin embargo, siempre requiere un porcentaje mínimo de humedad que progrese en función de la temperatura. De acuerdo con Tauma-Salvador (2023), el crecimiento óptimo se da en un rango de temperatura entre 20 °C a 25 °C. No obstante, Bolda & Koike (2016), establece que a 35°C las esporas no germinan, llegando a morir tras permanecer al menos dos días a esta temperatura. Sin embargo, si pueden germinar a 13 °C, aunque su crecimiento es muy lento. Por otro lado, el micelio de *Botrytis* tiene una actividad óptima a 20 °C, pudiendo desarrollarse hasta los 25 °C. En cuanto a la germinación de conidioesporas estas soportan un rango de 15 °C a 22 °C. Así mismo, la presencia de lluvias de carácter tormentoso o gotas de lluvia favorecen el desarrollo y la propagación de este hongo, ya que genera una humedad

relativa superior al 80% (Pavone, 2020). Para el óptimo desarrollo en laboratorio, Leiva-Espinoza et al., (2017), recomiendan que para su crecimiento se debe sembrar en cultivo agar papa dextrosa (PDA) a 25 ° C.

2.1.3 Ciclo de la enfermedad

El fitopatógeno *Botrytis* entra en contacto con el huésped cuando el conidio es diseminado por medio del viento, agua, agricultores y herramientas de trabajo. Este conidio se deposita en la superficie de la planta, donde se adhiere al tejido del huésped mediante la producción de secreciones, generalmente ocasionadas por enzimas. Si las condiciones ambientales son favorables, comienza a penetrar la cutícula epidermal mediante los apresorios (García, 2004).

La penetración está dada por la secreción de enzimas como las pectinasas y producción de ácido oxálico que facilita la hidrólisis de la pared celular. Durante este proceso, el hongo se expande a nivel intracelular que induce la muerte de las células sanas de la planta y forma lesiones necróticas. Conforme la infección avanza, se crean las estructuras de resistencia que van a permitir su viabilidad en condiciones adversas. Luego de la infección, el hongo puede entrar en una fase de latencia en tejidos sanos de las plantas en donde permanece en “hibernación” hasta que las condiciones sean favorables para germinar (García, 2004). El ciclo de enfermedad de *Botrytis* se observa en la Figura 1.

Representación gráfica del ciclo de enfermedad de *Botrytis* sp.

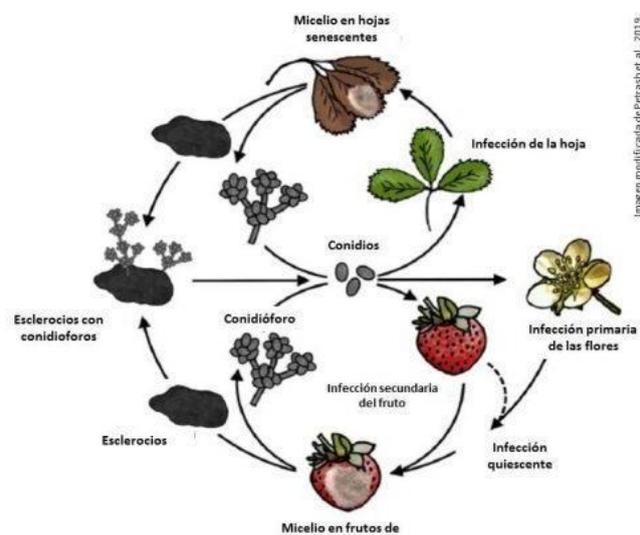


Figura 1 Ciclo de la enfermedad de *Botrytis* sp.

Fuente: (Pavone, 2020).

2.1.4 Principales especies afectadas por *Botrytis* sp. en el Ecuador

Botrytis posee una baja especificidad en cuanto a un hospedador, lo que provoca que logre afectar a un número elevado de cultivos en el Ecuador. Puede causar daños en más de 1000 especies de plantas, principalmente a plantas de hortalizas (Pimiento, zanahoria, pepino, lechuga); frutales (uva, fresa, arándano, pera, manzana, entre otras) y plantas ornamentales (Rosa, violeta, begonia, clavel) (Loyola et al., 2019).

En el Ecuador, este hongo representa una amenaza constante para el sector florícola y agrícola, debido a que causa el aumento del 30% y 25% respectivamente en costos de producción dado la necesidad del uso de fungicidas y medidas de manejo adicionales (Martínez-Salinas et al., 2019). Las pérdidas económicas que *Botrytis* genera en los cultivos son significativas, por ejemplo, en cultivo de frutas y hortalizas se puede llegar a dar pérdidas de hasta 3000 dólares por hectárea y en el cultivo de rosas se da una pérdida anual de 150 a 250 millones de dólares (Pincay et al., 2021). De acuerdo con Pavone (2020), *Botrytis* provoca pérdidas del 50% en el

cultivo de tomate, pérdidas anuales del 20% del costo de producción en uva y pérdidas de otras frutas y hortalizas del 30%, que en algunos casos pueden superar el 50% si las condiciones climáticas son favorables. Para Rosa se reporta una pérdida promedio del 16% (Cucás-Trejo, 2018) y en otras flores pérdidas del 10% al 20% (Tauma-Salvador, 2023).

2.2 Hongo fitopatógeno *Colletotrichum* sp.

Colletotrichum sp. es un género fitopatógeno conocido como la fase asexual o “anamorfo” del hongo *Glomerella*, que corresponde a la fase sexual o “teleomorfo”. Pertenece al phylum Ascomycota, clase Hypocreomycetidae, orden Glomerellales y familia Glomerellaceae, la cual es monotípica caracterizada por tener peritecios oscuros sin tejido estromático, ostiolo perifisados bien desarrollados, y paráfisis con paredes delgadas (Rojo-Báez et al., 2017).

Desde el punto de vista taxonómico, *Colletotrichum* ha sido un género problemático debido a las diferencias de nomenclatura según su estado sexual. En 2012, la Subcomisión Internacional de Taxonomía de *Colletotrichum* (ISTC) recomendó priorizar el uso del nombre *Colletotrichum* en lugar de *Glomerella*, con la intención de minimizar los cambios taxonómicos en las especies del género. A pesar de esto, la identidad de algunas especies importantes de *Colletotrichum* sigue siendo objeto de estudio (Rojo-Báez et al., 2017).

Las especies de este género son causantes de la enfermedad de antracnosis en una amplia variedad de huéspedes vegetales, manifestándose como lesiones semicirculares necróticas con hundimiento y en forma de anillos en la pared celular del tejido afectado. Los investigadores Favaro et al. (2022), mencionan que, cuando las condiciones ambientales son óptimas, en el interior de las lesiones necróticas se desarrollan acérvulas, las cuales contienen masas mucilaginosas de conidios con diferentes tonalidades. También son causantes de podredumbre de tallo, corona y frutas, tizones en flores y muerte de plántulas. Algunas especies del hongo

afectan a un solo huésped. Sus estilos de vida se pueden dividir en hemibiotrófico, endofítico, necrotrofico, quiescente o latente, siendo el más prevalente el hemibiotrófico.

2.2.1 Características principales (Macroscópicas y Microscópicas)

El género *Colletotrichum* tiene una gran variedad de especies, por lo que su morfología puede variar según la especie y al hospedante que infecta. De manera general a nivel macroscópico este hongo muestra un micelio ramificado, septado que tiende a formar masas compactas que van desde un color blanco cremoso, naranja, rosado hasta un castaño claro (Trinidad-Ángel et al., 2017). Del micelio subyacente nace un grupo de conidios llamados acérvulos, que tienen característica subcuticular, epidermal, ovoide y cilíndrica de paredes gruesas.

Algunas especies de este hongo presentan setas irregulares, con una pared fuerte y gruesa. A partir de esta se originan conidios septados con una longitud de 6,6 μm , de forma ramificada, cilíndrica u ovoide. Durante su germinación, estos conidios, se tornan de color castaño y generan el apresorio (Menezes, 2013). Estos apresorios son melanizados y tienen dimensiones variables (6 μm a 12 μm), producen una púa de infección para penetrar el fruto (Rodríguez-López et al., 2013). Otros tipos de especies pueden llegar a generar ascosporas en peritencios sobre los frutos de sus hospederos (Shi et al., 2020).

2.2.2 Condiciones de desarrollo

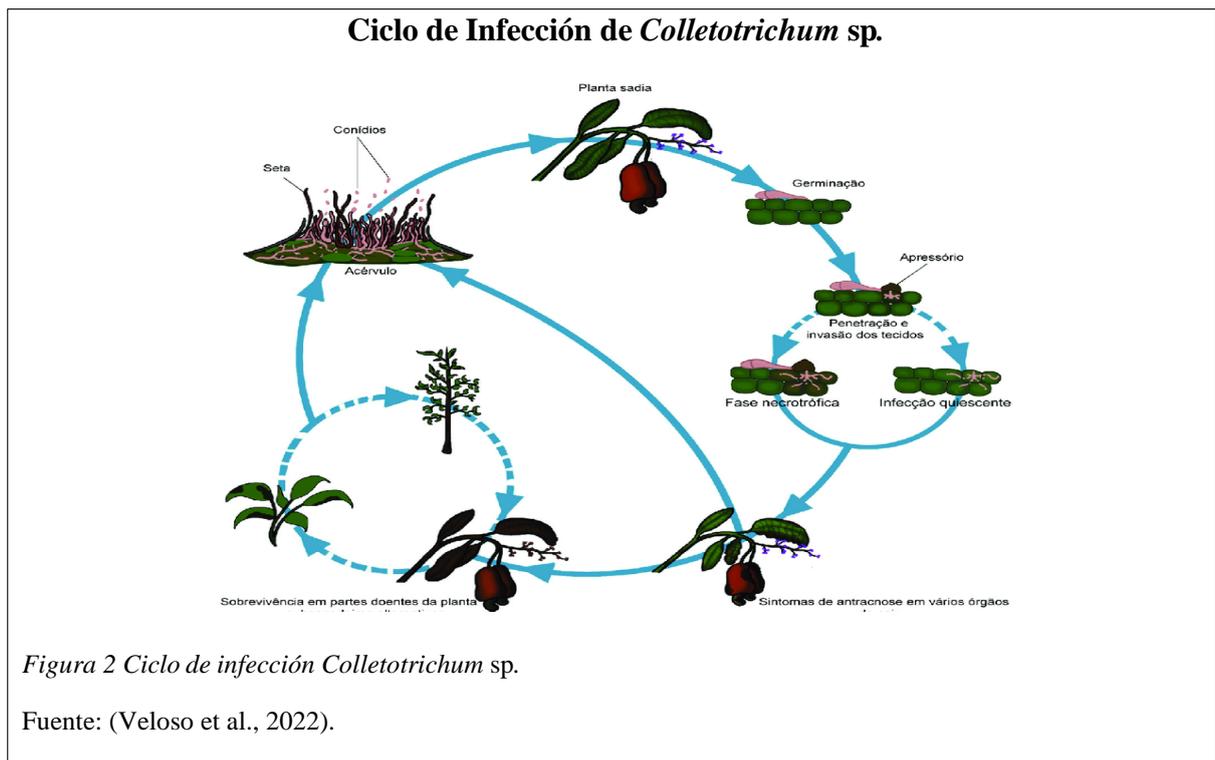
Colletotrichum es un hongo que puede adaptarse a diferentes entornos, su nivel de adaptación varía y en algunos casos puede requerir condiciones específicas para un crecimiento y esporulación óptimos. Tiene un crecimiento viable entre los 20 a 28 °C siendo el rango óptimo de 27 ± 1 °C, en ambientes con una humedad relativa no menor al 80%, lo cual favorece la germinación de esporas, por otro lado, el pH para su desarrollo puede ir de 5,5 a 7 (Rodríguez et al., 2009).

En cuanto a su desarrollo en laboratorio, para un crecimiento adecuado se debe sembrar en medio de cultivo Agar Papa dextrosa (PDA) a 25 ° C. La incubación generalmente se realiza durante 7 a 14 días, dependiendo de la velocidad de crecimiento y la especie en particular. Puede crecer en condiciones tanto de luz como de oscuridad, pero la luz puede inducir la esporulación en algunas especies. Un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas es comúnmente utilizado en laboratorio (Valdéz et al., 2017).

2.2.3 Ciclo de la enfermedad

La infección de *Colletotrichum* puede ser provocada por esporas que infectan a las semillas, causando lesiones en el cotiledón que, tras la maduración de la planta produce una gran cantidad de esporas. Los residuos de hojas, tallos o frutos también pueden ser fuente de inóculo para que este patógeno brote y genere enfermedades estacionales. Cuando este hongo se encuentra fuera de un hospedero, su propagación y desarrollo depende del agua, viento y las herramientas de trabajo de los agricultores (Koima et al., 2023).

Este fitopatógeno presenta dos fases, una biotrófica y una necrotrófica. Cuando las conidias se adhieren a los tejidos sanos del hospedante se produce la infección inicial; En la primera fase el micelio crece de manera intracelular en las células vegetales evitando secretar enzimas que degradan la pared celular del hospedero y por ende evitando que el huésped identifique la presencia del patógeno. En la segunda fase el patógeno aumenta la secreción de estas enzimas y provoca que las células empiecen a necrosar (Bouffleur et al., 2021). El micelio de *Colletotrichum* empieza a producir los acérvulos por debajo de la cutícula, que tras la presión ejercida rompe al interior de la masa de conidios en desarrollo. Estos se conservan unidos por una masa viscosa y firme hasta que, a través de lluvia, viento, insectos, entre otros son transportados a otras plantas y repitiendo el ciclo (Bouffleur et al., 2021).



2.2.4 Principales especies afectadas por *Colletotrichum* sp. en el Ecuador

En Ecuador, el género *Colletotrichum* es uno de los fitopatógenos responsables de la pérdida de cultivos importantes. La antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum tropicale* provoca enfermedades que afecta a cultivos de mango, papaya, cítricos, café, fresa, fréjol, y aguacate. Por otro lado, ha llegado a ocasionar pérdidas en uno de los cultivos más importantes del país, el cacao, donde, en el año 2002, fue un grave problema fitopatológico resultando en la devastación de grandes áreas de cultivo. Esta enfermedad, causada por el hongo en particular *Colletotrichum acutatum* se manifiesta con notable agresividad en toda la planta, siendo especialmente visible en el fruto (Martínez, 2021).

Además de *C. acutatum*, *Colletotrichum tamarilloi* es otra especie que ataca a los cultivos de tomate de árbol, con la aparición de lesiones negras, acompañadas por la erupción de conidios rosados que alcanzan un diámetro de entre 35 y 48 mm en la superficie del fruto. Esta especie

ha sido identificada en diversas localidades de las provincias de Pichincha, Azuay y Loja, donde se ha documentado su impacto severo en la producción de este cultivo (Guamán, 2018).

2.3 Control Biológico

El uso excesivo de agroquímicos en los cultivos ha provocado efectos perjudiciales para el medio ambiente, contaminando los suelos, los cuerpos de agua y afectando la diversidad microbiana benéfica para las plantas. Además, representa un riesgo para salud humana debido al contacto directo y prolongado con estos productos y su potencial ingesta. En este contexto, la agricultura moderna se ha visto en la necesidad de adoptar un enfoque más sostenible para controlar plagas y enfermedades, que asegure la protección del medio ambiente, la biodiversidad y la salud humana (Viera-Arroyo et al., 2020).

Viera-Arroyo et al. (2020), definen al biocontrol como la aplicación de microorganismos vivos para mitigar y eliminar a los fitopatógenos, surgiendo como alternativa al uso de productos químicos dañinos. El uso del control biológico comenzó a popularizarse a finales del siglo XIX, obteniendo grandes avances a mediados del siglo XX, desarrollando diferentes técnicas descritas por Xochilt Zelaya-Molina et al. (2022):

- **Control Biológico clásico:** Introducción de enemigos no nativos de la zona para controlar plagas introducidas, como el uso de *Rodolia cardinalis* para el control de cochinillas.
- **Control Biológico Aumentativo:** Liberación de cantidades grandes de enemigos naturales en el entorno agrícola para que se propaguen continuamente en el ecosistema.
- **Control biológico con microorganismos:** Uso de microorganismos benéficos que compitan con los patógenos por nutrientes y espacio, reduciendo la capacidad del fitopatógeno para desarrollarse y causar enfermedades.

2.4 El género *Bacillus*

El género *Bacillus* pertenece al reino Bacteria, filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales y familia Bacillaceae. Fue documentado por primera vez por Ferdinand Cohn en 1872, quien la describió como un grupo de microorganismos capaces de formar endosporas y ser resistentes al calor (Toral-Navarro, 2019). Actualmente, este género cuenta con más de 379 especies, las cuales, debido a su semejanza genética, pueden clasificarse en diferentes grupos, siendo algunos de ellos: a) El grupo de *B. cereus* relacionado a la patogenicidad y b) bacilos de carácter ambiental, dentro de este último grupo existen especies con actividad antagónica frente a diversos microorganismos fitopatógenos. Entre estas destacan: *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis* (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Las especies de este género están ampliamente distribuidas en diversos ecosistemas a nivel mundial, tanto en ecosistemas acuáticos como en terrestres, e incluso en hábitats con condiciones extremas (Zhang et al., 2023). No obstante, el suelo se considera el principal entorno para *Bacillus*, ya que la mayoría de las especies son saprófitas, lo que les permite utilizar la gran variedad de sustratos orgánicos presentes en el suelo, generando una gran heterogeneidad genética y funcional entre las especies del microorganismo (Villarreal-Delgado et al., 2018).

2.4.1 Características principales

Las bacterias del género *Bacillus* presentan una morfología bacilar con un diámetro aproximado de 850 nm y poseen flagelos peritricos que facilitan su movilidad. Son bacterias gram positivas, conocidas por su capacidad de crecer en condiciones aerobias, aunque también puede desarrollarse como anaerobio facultativo. Estas bacterias pueden crecer en condiciones ambientales extremas como en intervalos de pH de 4,9 a 9,3 y temperaturas que van desde los 10 °C hasta los 48 °C. Esta capacidad de adaptación y resistencia se debe a la formación de

endosporas (González-León et al., 2022). Por otro lado, estas bacterias destacan en la producción de una amplia variedad de componentes antimicrobianos.

2.4.2 Condiciones de Desarrollo

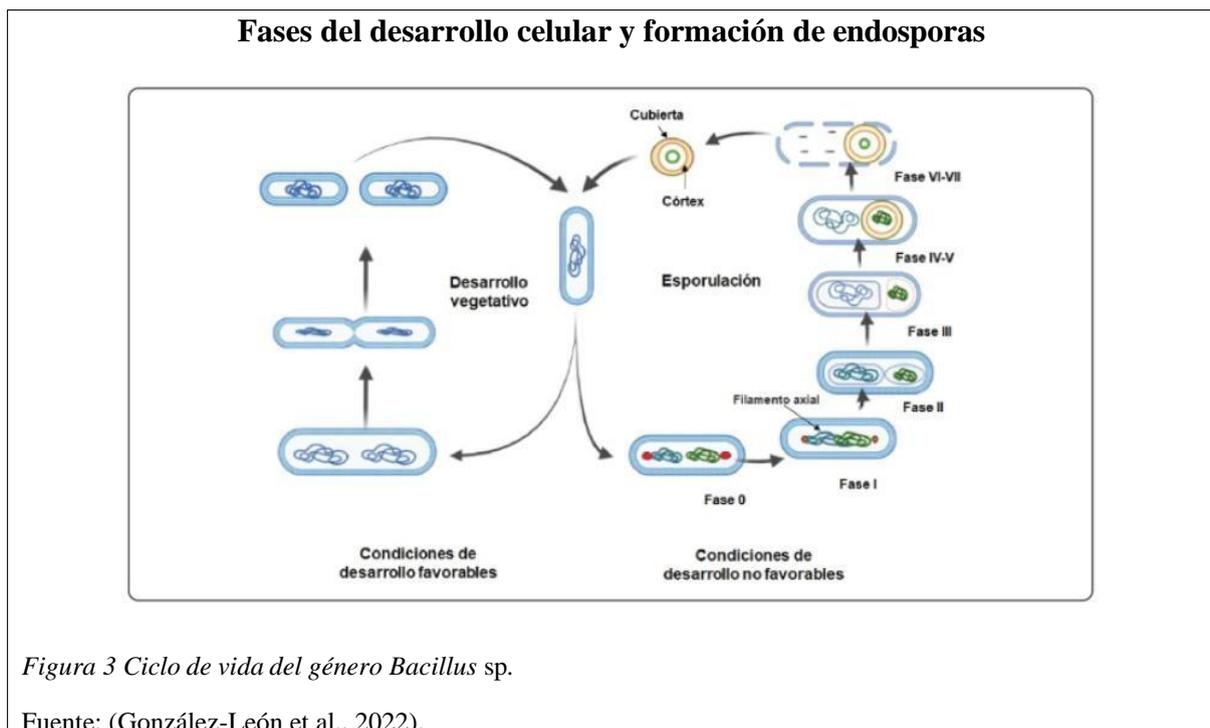
El género *Bacillus* es considerado ubicuo, ya que puede desarrollarse en diferentes ambientes como suelo, agua, aire, plantas, rizosfera vegetal e incluso desiertos (Pimentel-Silva, 2022). Sin embargo, su desarrollo óptimo ocurre en un pH neutro, con un límite inferior de entre 2 y 3. De igual forma puede crecer en el rango de temperatura de 55 °C a 70 °C, aunque algunas especies de este género son mesófilas, es decir, que crece en temperaturas de 30 °C a 45 °C (Villarreal-Delgado et al., 2018). En condiciones de laboratorio, *Bacillus* crece en medios sintéticos que contienen azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos como únicas fuentes de carbono, mientras que el amonio actúa como única fuente de nitrógeno (Zhang et al., 2023).

2.4.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Bacillus* puede dividirse en dos fases. En primera, ocurre el crecimiento somático, que se refiere a la reproducción exponencial de la comunidad bacteriana mediante fisión binaria simétrica, mientras que la segunda fase consiste en la formación de endosporas a través de una división celular asimétrica cuando las bacterias se encuentran en condiciones de estrés o inanición (González-León et al., 2022). El proceso de esporulación permite generar células latentes, metabólicamente inactivas, donde la preespora que se encuentra dentro de la célula madre, tiene la función de proteger el material genético. En la Figura 3, González-León et al. (2022), describen las fases del proceso de formación de endosporas:

- **Fase 0:** Un subgrupo de bacterias detecta un déficit de nutrientes y mediante factores de muerte Skf y Sdp, eliminan bacterias vecinas en estado somático. Estas “células caníbales” puedan utilizar los nutrientes disponibles y desarrollarse adecuadamente.

- **Fase I:** Las dos copias de material genético se condensan en los polos de la célula, formando el “filamento axial”, la proteína RacA asegura que tanto la célula madre como la preespora reciban una sola copia del material genético.
- **Fase II:** Ocurre la división asimétrica, que da lugar a la formación del “tabique polar”.
- **Fase III:** La preespora se introduce completamente en la célula madre, formando un septo asimétrico coordinado por factores sigma σ^E , σ^F , σ^G y σ^K .
- **Fases IV y V:** La preespora ensambla su córtex y cubierta protectoras, constituidas por péptidoglicano y otras proteínas especializadas.
- **Fase VI y VII:** La endospora pasa por un proceso de maduración y tras la lisis de la célula madre, la endospora es liberada.



2.5 *Bacillus* como controlador biológico

La pérdida de los cultivos agrícolas en la actualidad se da como consecuencia de las distintas enfermedades causadas por microorganismos como virus, hongos y bacterias. Para combatir estas plagas, se ha utilizado estrategias como la rotación de cultivos y el uso de pesticidas. No

obstante, estas prácticas han generado la acumulación de sustancias tóxicas en el medio ambiente, provocando la contaminación de suelos y agua (Pimentel-Silva, 2022).

Como alternativa, se ha investigado el uso de microorganismos con propiedades antimicrobianas, tal como las presenta el género *Bacillus*. Este género ha demostrado tener la capacidad de producir gran cantidad de metabolitos secundarios con propiedades antibacterianas, antifúngicas y antivirales (Vinchira-Villarraga & Moreno-Sarmiento, 2019). El interés en *Bacillus* como agente de control biológico comenzó con el hallazgo de la actividad insecticida de *B. thuringiensis*, a través de su proteína Cry. La citotoxicidad de esta molécula se produce unirse a la membrana de las células del intestino de los insectos plagas, provocando la muerte de las plagas (Villarreal-Delgado et al., 2018).

De igual forma otras especies de este género, como *B. pumilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis*, también han sido estudiadas por su capacidad de reducir la incidencia de fitopatógenos de importancia agrícola (Villarreal-Delgado et al., 2018). *Bacillus subtilis*, en particular, produce compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, como las bacteriocinas, péptidos y lipopéptidos, además tiene la capacidad de generar enzimas hidrolíticas con propiedades antifúngicas (Pimentel-Silva, 2022).

2.5.1 Mecanismos de acción

El género *Bacillus* desempeña un papel importante en el crecimiento vegetal al asociarse simbióticamente con las plantas; especies como *Bacillus subtilis* forman parte del grupo de rizobacterias promotoras del crecimiento a través del sistema radicular de las plantas. Forman biopelículas que facilitan su establecimiento en la rizosfera mediante quimiotaxis hacia los nutrientes liberados por la planta, como exudados y polisacáridos. Esta interacción ofrece beneficios para las plantas como la solubilización de fosfatos y una mayor fijación de

nitrógeno, además, estas bacterias son capaces de producir fitohormonas como ácido indolacético (AIA), giberelinas y citoquininas (González-León et al., 2022).

Los mecanismos indirectos de acción de *Bacillus* en el control biológico de fitopatógenos se deben a su capacidad para producir metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Se estima que entre el 4% y 5% de su genoma está dedicado a la producción de estos compuestos, los cuales se dividen en volátiles y no volátiles según sus características fisicoquímicas. Entre los compuestos volátiles se encuentran hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, ésteres, éteres, y otros compuestos aromáticos, sulfurados y nitrogenados que pueden actuar a distancia, afectando a los patógenos sin necesidad de contacto directo; por otro lado, los no volátiles comprenden lipopéptidos de síntesis ribosomal y no ribosomales (González-León et al., 2022).

A continuación, se describe más a detalle el mecanismo de acción de cada uno:

➤ Lipopéptidos.

Compuestos con actividad antimicrobiana que interactúa con la membrana citoplasmática de las células bacterianas o fúngicas, lo que resulta en la formación de poros y un desequilibrio osmótico, llevando a la muerte de los microorganismos fitopatógenos (Villarreal-Delgado et al., 2018). A su vez, se dividen en dos grupos: lipopéptidos ribosomales y no ribosomales.

La principal diferencia entre los ribosomales y no ribosomales es su modo de síntesis, puesto que los primero se originan en el ribosoma de la célula y el otro grupo de enzimas sintetizadas no ribosomales. Los lipopéptidos ribosomales suelen tener funciones relacionadas con la regulación celular, señalización y comunicación entre células. Por otro lado, los no ribosomales tienen un mecanismo de acción directo sobre las membranas celulares, lo que desestabilizará a la célula (González-León et al., 2022).

➤ Sideróforos.

Estos compuestos orgánicos actúan como quelantes de hierro, un elemento esencial para el desarrollo de los microorganismos, por lo que inhiben el crecimiento de los fitopatógenos. La producción de estas moléculas está vinculada con la formación de biopelículas o biofilms (González-León et al., 2022).

➤ Enzimas líticas.

Las enzimas líticas como β -glucanasas y quitinasas han demostrado degradar polisacáridos que conforman la pared celular de hongos, mediante la hidrólisis de enlaces glucosídicos. Villarreal-Delgado et al. (2018), mencionan que en *Bacillus amyloliquefaciens*, se observó la actividad lítica de una β -1,3-glucanasa sobre las hifas de *Colletotrichum lagenarium* y en otras investigaciones dirigidas a aumentar la actividad antifúngica se ha logrado la inserción de genes que codifican enzimas líticas, como el gen ChiA en *B. circulans*, dando como resultado un fenotipo más acometedor contra *Botrytis elliptica*.

➤ Endotoxinas.

Especialmente producidas por *Bacillus thuringiensis*, son estructuras paraesporales proteicas que se generan durante la esporulación bacteriana. Se dividen en 73 familias Cry y 3 familias Cyt, donde la proteína Cry (cristal) es reconocida por su toxicidad específica para ciertos organismos. Por otro lado, las proteínas Cyt (citolíticas) demuestran toxicidad en una amplia gama de insectos dípteros y se ha evidenciado que también pueden tener efectos citotóxicos en células de mamíferos (Villarreal-Delgado et al., 2018).

2.6 Producción de metabolitos en bacterias del género *Bacillus* a escala de laboratorio

Por más de 50 años la producción de metabolitos secundarios se ha considerado la principal herramienta para desarrollar productos de biocontrol debido a sus diversas aplicaciones y su amplia utilidad en la industria (Sierra-García et al., 2012). Inicialmente se usaba frascos Erlenmeyers para el cultivo celular para el desarrollo de bioprocesos a escala de laboratorio,

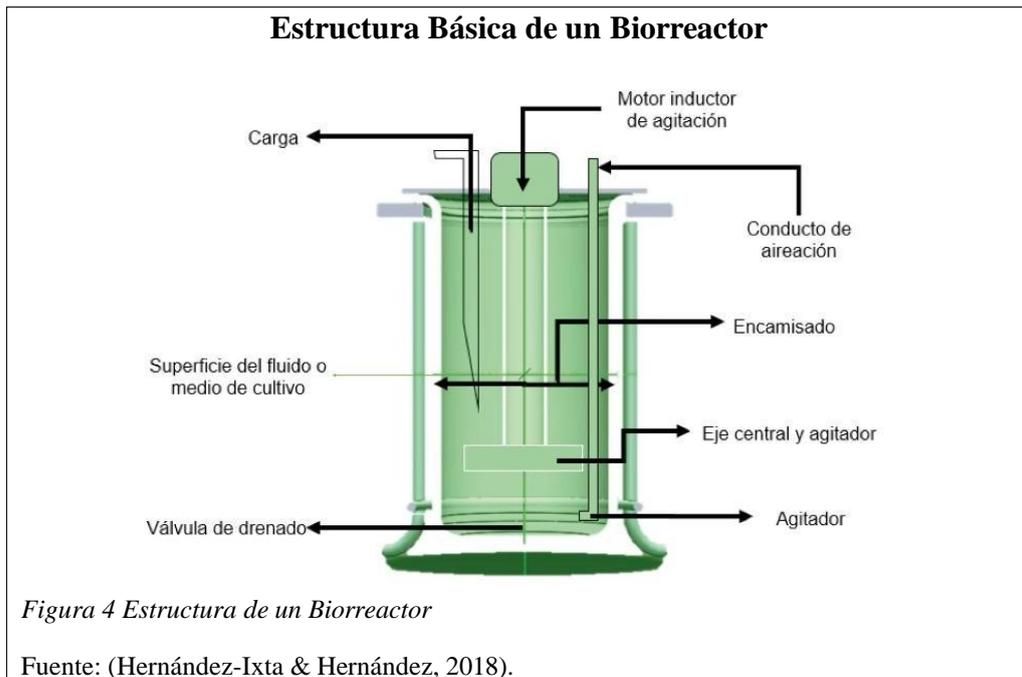
no obstante, estos se encontraban limitados por un control indeterminado de varios factores tales como la Temperatura, pH, % de humedad, entre otros. Para superar estas limitaciones, se ha introducido el uso de biorreactores de tanque agitado, estableciendo un estándar en la industria de la biotecnología (Serrat-Diaz & Mendez-Hernandez, 2015).

2.6.1 Biorreactores

Un biorreactor es un dispositivo biotecnológico diseñado para llevar a cabo diferentes procesos biológicos bajo condiciones controladas de pH, humedad, temperatura y nutrientes, proporcionando el entorno óptimo para el crecimiento celular y su actividad metabólica. En términos microbiológicos, existen diferentes tipos de sistemas y su diferencia radica en los requerimientos de los cultivos, tipo de microorganismo con el que se trabaja y el tipo de fermentación para obtener productos específicos de dichos procesos (Rosales-López, 2019).

2.6.1.1 Elementos de un Biorreactor

La estructura básica un biorreactor depende del modo de operación y aplicación que se le dé, sin embargo, dentro de la estructura básica de un fermentador encontramos el tanque, la fuente de alimentación, el motor, sistemas de control para temperatura, pH y humedad, sistema de agitación, conductos de aireación, la chaqueta y válvulas que permite del drenado de residuos (Paredes-Buenaño, 2015). El bosquejo se exhibe en la Figura 4.



2.6.2 Tipos de Biorreactores por su modo de Operación

Los sistemas de biorreactores tienen una amplia clasificación en cuanto a sus modos de operación, que se adaptan según las necesidades y aplicaciones. Cada clasificación presenta modos de operación específicos, características únicas, así como ventajas y desventajas que deben entenderse para su implementación efectiva. A continuación, se describen los tipos más comunes de biorreactores, organizados por su modo de operación (Gonzales, 2018).

➤ Discontinuo o Batch

Este tipo de biorreactor se caracteriza por el cultivo de células en un tanque que contiene una concentración inicial, la cual no se ve alterada por la adición de nutrientes, medio de cultivo o lavados. De igual forma, el volumen permanece constante y solo ciertos factores como temperatura, pH, humedad y velocidad de agitación son controlados por el operante. Este proceso es la forma más simple de cultivo y termina cuando el sustrato es consumido o transformado por la biomasa (Gonzales, 2018).

➤ Semicontinuo o Fed Batch

En este caso, el medio de cultivo junto con los nutrientes se añade al biorreactor a través de una alimentación continua o semicontinua, no obstante, no va a existir efluente de salida., Conforme se va dando la reacción, se retira los productos y se incorpora más material para ser transformado. Todo esto se lo realiza en intervalos de tiempos determinados (Gonzales, 2018).

➤ Continuo

Como su nombre mismo lo indica, consiste en añadir nutrientes y retirar productos de manera continua del biorreactor. Bajo condiciones específicas el cultivo puede llegar a colocarse en estado estacionario, por lo que no va a existir variación con respecto al tiempo y volumen dentro de este (Gonzales, 2018).

2.7 Pruebas in vitro para evaluar el biocontrol de *Botrytis sp.* y *Collectotrichum sp.*

En la actualidad con el objetivo de evitar el uso de pesticidas en los cultivos vegetales se busca investigar el uso de microorganismos con capacidad de control biológico contra plagas y enfermedades a través de la utilización de su biomasa y metabolitos secundarios. Entre los géneros más utilizados se encuentran *Trichoderma*, *Bacillus*, *Penicillium*, *Beauveria*, *Pochoma*, entre otros (Rivera-Méndez et al., 2019). En particular, se destaca el género *Bacillus* por su capacidad antagónica contra hongos fitopatógenos. Las pruebas *in vitro* permiten evaluar su eficacia en el combate biológico mediante análisis microbiológicos, genéticos, metagenómicos y bioquímicos. Una vez realizadas las pruebas en el laboratorio se puede dar paso a la experimentación en campos agrícolas (Rivera-Méndez et al., 2019).

2.7.1 Pruebas de Enfrentamiento

Estas pruebas son una metodología de evaluación de la interacción entre el biocontrolador y el fitopatógeno, permitiendo estudiar el antagonismo, que es la capacidad de ciertos microorganismos (bacterias u hongos) para inhibir el crecimiento de otros microorganismos patógenos. En la técnica de cultivo dual, se coloca en un extremo o en el centro de una caja de

Petri un disco de 5mm empapado por capilaridad con el microorganismo antagonista, y en los extremos opuestos, un disco de 5 mm del microorganismo fitopatógeno, permitiendo que ambos microorganismos compitan mediante sus mecanismos de acción para colonizar el medio en el que se desarrollan (Cadena & López, 2021).

2.7.2 Pruebas con Antibiograma

Esta prueba tiene el objetivo de evaluar de manera *in vitro* la respuesta de ciertos microorganismos ante la presencia de uno o varios compuestos antimicrobianos, permitiendo valorar si ese compuesto tiene la capacidad de inhibir el crecimiento del microorganismo patógeno. El método más utilizado para realizar un antibiograma es la técnica de difusión, en la cual se utilizan discos de papel filtro impregnados con la sustancia antimicrobiana (metabolito secundario, antibiótico, enzimas, etc), que se colocan en la superficie del medio de cultivo sólido previamente inoculado con el microorganismo (hongo, bacteria) (Martínez & Porras, 2022). La interpretación de los resultados se establece que no va a existir crecimiento del microorganismo cuando la concentración de la sustancia antimicrobiana sea superior al valor del CMI (Concentración mínima inhibitoria), es decir la concentración mínima de la sustancia necesaria para inhibir su crecimiento en condiciones normales. Esto provoca la formación de un halo de inhibición alrededor del disco, relacionando el diámetro generado por el disco con el grado de sensibilidad y la resistencia del microorganismo a la sustancia antimicrobiana (Flores-Paucar, 2017).

2.8 Mecanismos de antagonismo para el biocontrol de *Botrytis* sp. y *Collectotrichum* sp.

El biocontrol de *Botrytis* y *Collectotrichum* puede lograrse mediante varios mecanismos de antagonismo que logren reducir y suprimir el crecimiento de estos fitopatógenos. Los cuales se describen a continuación:

2.8.1 Antibiosis

Este mecanismo se basa en la capacidad del microorganismo en producir una sustancia con la capacidad de inhibir el crecimiento o reducir la actividad metabólica de otro microorganismo. Para este tipo de mecanismo, no es indispensable que exista un contacto directo entre el antagonista y el patógeno, ya que la sustancia antibiótica puede permanecer intacta inclusive hasta que el antagonista muera (Nuñez Lara & Vinueza Páez, 2023). Algunas de las sustancias que se pueden producir son péptidos de síntesis ribosomal, policétidos o péptidos de síntesis no ribosomal (Pedraza-Herrera et al., 2020).

2.8.2 Competencia

Este proceso implica que dos o más organismos que compiten por los mismos nutrientes o sustratos en un entorno común, como en el medio de cultivo en un laboratorio. El uso de estos recursos por uno de los organismos disminuye la cantidad o el espacio disponible para los demás organismos (Cadena & López, 2021). Esto dependerá de factores que se clasifican en tres tipos: competencia por agua y nutrientes en la fase previa a la penetración del patógeno, por oxígeno en un proceso de anaerobiosis y por espacio en función de la rapidez de crecimiento entre los dos microorganismos (Nuñez Lara & Vinueza Páez, 2023).

2.8.3 Inducción de Resistencia

Este mecanismo radica en activar los mecanismos de defensa propios del organismo hospedante ante un ataque del patógeno (Nuero et al., 1993). Se lleva a cabo mediante la producción de diferentes compuestos antimicrobianos como el ácido salicílico o proteínas relacionadas con la patogénesis para generar una respuesta inmune (Nuñez Lara & Vinueza Páez, 2023). Este tipo de resistencia se caracteriza por la capacidad que tiene el hospedador para responder rápida y eficazmente a futuros ataques de patógenos después de una exposición inicial (Nuero et al., 1993).

2.8.4 Explotación

Como describen Nuñez Lara & Vinueza Páez (2023), este tipo de antagonismo es directo e implica un contacto estrecho entre el patógeno y el hospedador, en el que el patógeno extrae los nutrientes. No obstante, este proceso debe ocurrir en presencia de otro patógeno depredador del patógeno que se desea eliminar, lo que se conoce como hiperparasitismo. Su uso se recomienda principalmente para reducir el inóculo patógeno en infecciones secundarias que ocurren una vez tratada una infección primaria (Nuero et al., 1993).

2.8.5 Lisis

Este mecanismo de acción está relacionado con la producción de enzimas líticas como quitinasas, peroxidasas, celulasas, lipasas y proteasas, que pueden degradar la pared celular de ciertos microorganismos o causar su lisis celular. Esto, a su vez, provoca la liberación de oligómeros de glucano, que pueden actuar como elicitores en la defensa de las plantas. Además, en este mecanismo, se pueden producir enzimas que bloquean la comunicación entre microorganismos (Pedraza-Herrera et al., 2020).

3 Materiales y Métodos

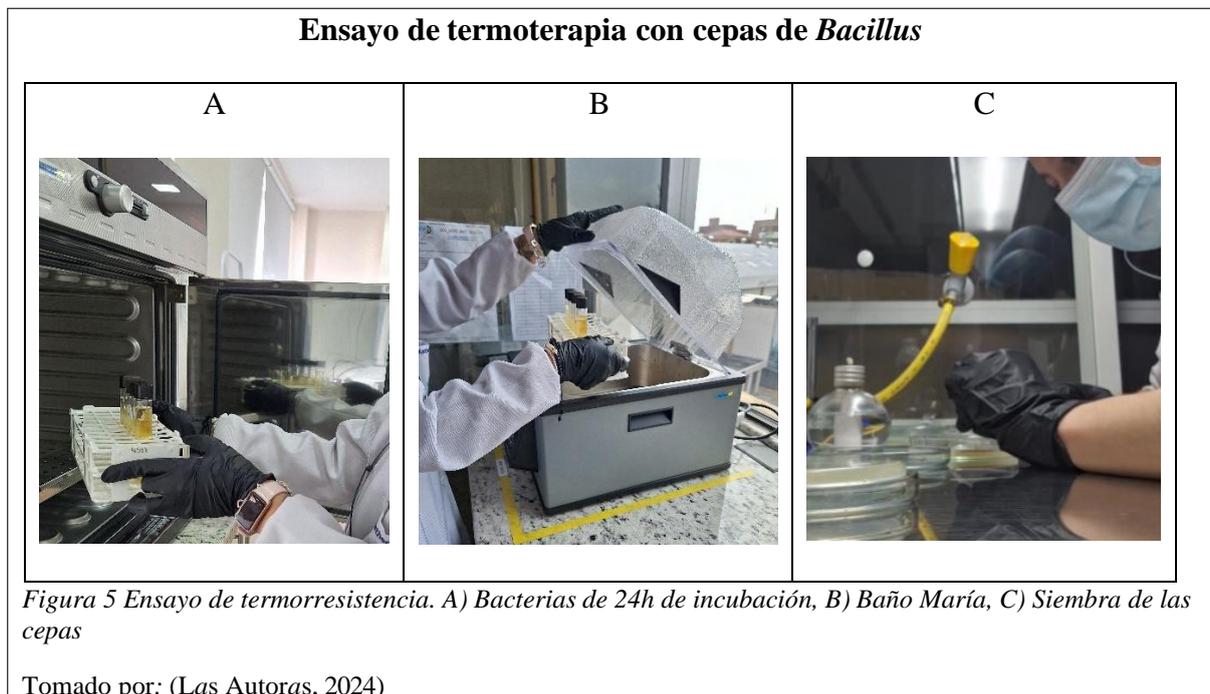
3.1 Ensayos de Termorresistencia

Del Banco de bacterias de la Universidad Politécnica Salesiana, se seleccionaron 20 cepas de *Bacillus* sp. a partir de 73 cepas disponibles (Nuñez Lara & Vinueza Páez, 2023) para su reactivación. Estas cepas fueron sembradas en medio de cultivo Caldo de soya tripticaseína (TSB) e incubadas a 35 °C durante 24 horas.

Para el ensayo de termoterapia, el equipo de baño María PolyScience Water Bath WDE10 se precalentó a 70°C, y se introdujo la gradilla con los cultivos bacterianos de 24 horas de incubación, manteniéndolos durante 20 minutos, como se puede ver en la Figura 5. El siguiente paso fue sembrar las bacterias en medio de cultivo de Agar Papa Dextrosa (PDA) con técnica

de estriado por agotamiento y se las incubó a 35 °C durante 48 horas (Castillo Colombo et al., 2004).

Para las cepas que mostraron resultados positivos (crecimiento en el medio), se realizó la identificación microscópica con el fin de observar la morfología característica de las bacterias del género *Bacillus*. Utilizando la tinción Gram para identificación del tipo y la tinción Schaeffer Fulton para visualizar las endosporas presentes (Castillo Colombo et al., 2004).

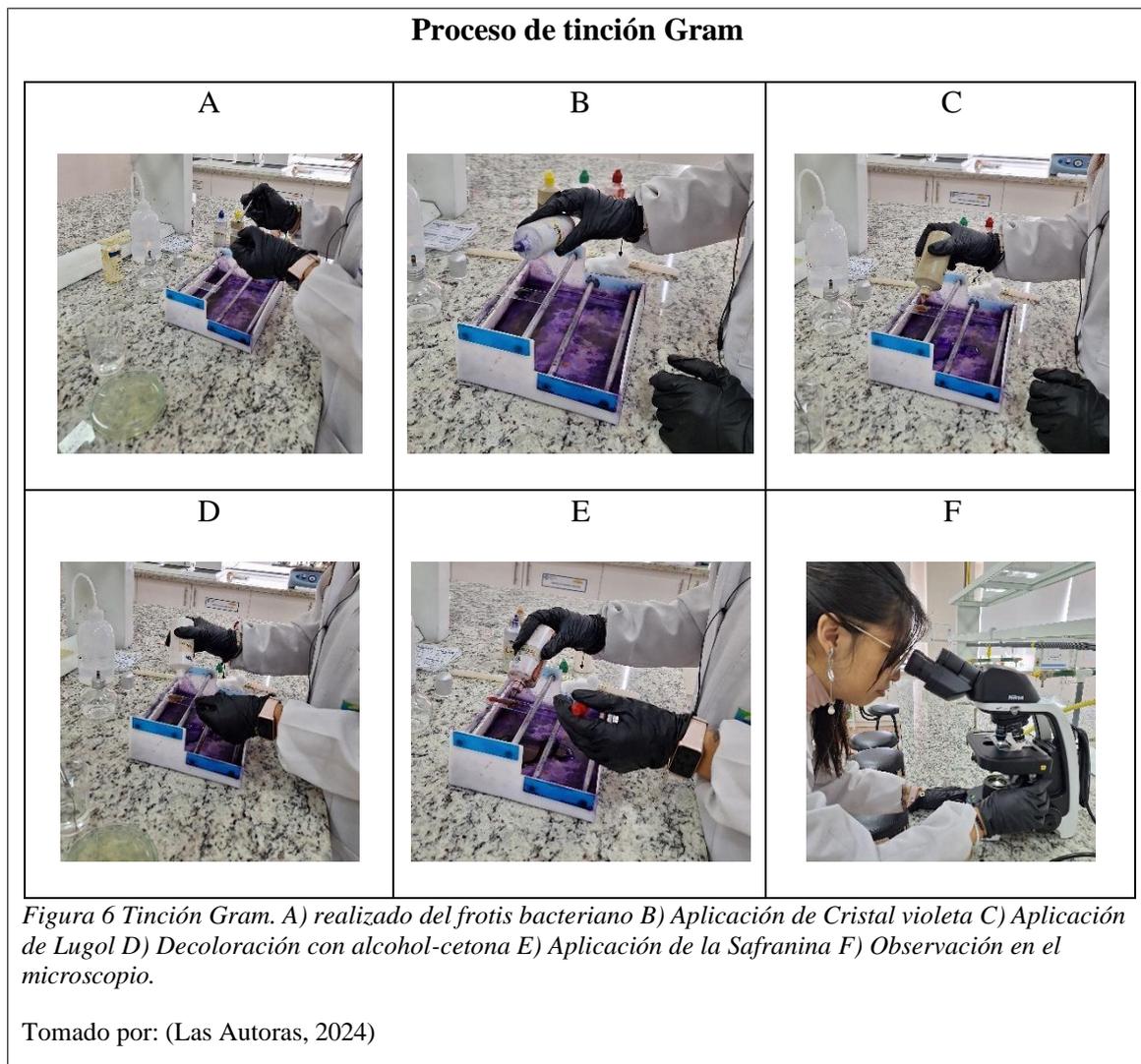


3.2 Ensayos microscópicos

3.2.1 Tinción Gram

Dado que *Bacillus* son bacterias Gram positivas, se realizó la tinción Gram siguiendo el protocolo descrito por Casasola (2022). Se utilizó los reactivos de Cristal violeta 2%, Lugol 1%, Alcohol acetona 95% y Safranina. Se realizó un frotis a partir de una muestra bacteriana previamente sembrada en medio PDA, con un asa estéril se extendió la muestra con ayuda de gota de agua destilada colocada en el portaobjetos, se dejó secar al aire y se fijó mediante calor al pasar el portaobjetos a través de la llama de un mechero entre 4 o 5 veces.

La tinción se realizó agregando el colorante cristal violeta sobre la muestra y dejándola reposar durante un minuto. Posteriormente, se retiró el exceso de con agua destilada y se agregó Lugol que actúa como mordiente, (ayuda a que el colorante primario se adhiera de manera correcta a la célula bacteriana) cubriendo toda el área de tinción dejando actuar por un minuto. De igual forma se retiró el exceso de Lugol y se realizó una decoloración durante 10 segundos con alcohol acetona al 95%, retirando el exceso con agua destilada. Se adicionó safranina como tintura de contraste por 45 segundos, se lavó con agua destilada y se dejó secar (Casasola, 2022). Finalmente se observó la muestra en el microscopio empezando por el lente con menor aumento.



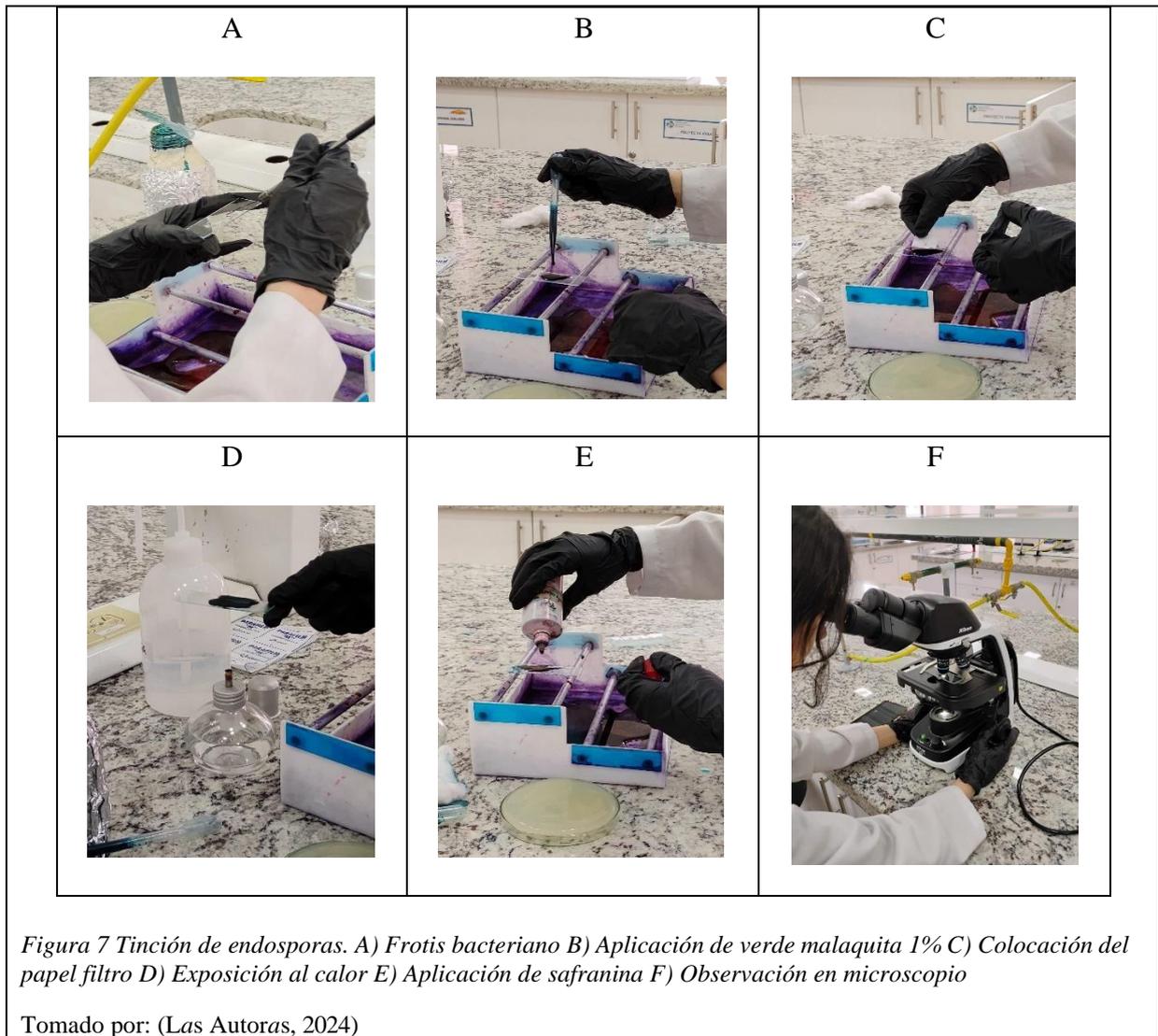
3.2.2 Tinción Schaeffer Fulton (endosporas)

La metodología para esta tinción utilizó los colorantes verde malaquita al 1% y Safranina al 1% cuyo procedimiento se puede visualizar en la Figura 7.

Se preparó un frotis de las cepas de *Bacillus* previamente cultivadas en medio PDA por 24 horas. Se cubrió el frotis con una solución al 1% de verde malaquita y se dejó actuar durante un minuto. Este colorante tiene afinidad por las esporas, permitiendo su visualización bajo el microscopio. Para asegurar que el verde malaquita se haya adherido correctamente a las esporas, se colocó un pequeño trozo de papel filtro sobre la muestra, se expuso el portaobjetos a calor por aproximadamente 5 a 7 minutos, para evitar que el colorante se seque se adicionó constantemente pequeñas cantidades de verde malaquita. Transcurrido el tiempo de fijación, se retiró el papel filtro y se lavó la muestra con agua destilada para eliminar el exceso del colorante (Maksong et al., 2017).

Posteriormente, se añadió safranina al 1% al frotis y se dejó actuar durante 2 minutos. Se realizó un lavado final con agua destilada para retirar el exceso de safranina y se dejó que la muestra se secase al aire. Finalmente, se observó bajo el microscopio con lente objetivo de 10X y 40X. Las esporas se visualizaron de color verde brillante, mientras que las células vegetativas aparecieron teñidas de rosa debido a la safranina (Maksong et al., 2017).

| |
|--|
| Proceso de tinción Schaeffer Fulton |
|--|



3.3 Banco de cepas de interés y siembra de hongos fitopatógenos.

Después de los ensayos de termoterapia se obtuvieron 17 cepas termorresistentes, dado a su crecimiento positivo. Junto con su evaluación microscópica, tanto en la producción de esporas como en su morfología, se logró obtener un banco depurado de 17 cepas de *Bacillus* el cual se almacenó a una temperatura de 4 °C hasta su utilización.

Paralelamente se realizó la siembra de los hongos fitopatógenos de *Botrytis* sp. y *Colletotrichum* sp. que previamente fueron obtenidas a través del aislamiento de cultivos infectados de fresa y de tomate de árbol respectivamente. Siguiendo la técnica de siembra para

obtener cepas de hongos puros con hisopo estéril en cajas Petri con medio PDA propuesta por Mata & Salmones (2021).

3.4 Producción de metabolitos secundarios

3.4.1 Siembra bacteriana y medio de fermentación

Se alicuotaron 10 mL de medio TSB y 5mL de agua destilada para alcanzar un volumen final de 15 mL en los tubos de ensayo con tapa rosca de 20 mL. Posteriormente se realizó una suspensión de las cepas bacterianas en cada tubo, con el fin de obtener inóculos al 10% que corresponde aproximadamente a una concentración bacteriana de $1,2 \times 10^9$ UFC/mL en una escala McFarland 3 (Lozano et al., 2018).

3.4.2 Ensamblaje del biorreactor

Con el objetivo de producir metabolitos secundarios, se adecuaron biorreactores en tubos de ensayo, siguiendo el modelo de fermentadores aireados tipo Batch descrito por Nuñez Lara & Vinuesa Páez (2023). Se emplearon tubos de ensayo de 25 mL, en los que se colocaron 15 mL del medio de cultivo líquido TSB previamente inoculado con las cepas de interés.

Dentro del tubo de ensayo se colocó dos mangueras azul transparente de diámetro interno de 4mm y externo de 6mm, que comúnmente se utilizan para instalaciones de oxígeno de acuarios pequeños, una se conectó desde el medio de cultivo hasta una bomba de pecera SB-348 de la marca SOBO para el suministro de aire, y otra destinada para la comprobación del proceso, se conectó a un tubo de 10 mL con etanol al 70 %. Cabe destacar que esta manguera no tocó el medio de cultivo. Dentro de las características de la bomba de aire utilizada destacan su voltaje de 110v/60hZ, su potencia de 2×4.0 L/min, una presión de 0,014Mpa y un poder de 5W. El biorreactor se mantuvo en funcionamiento durante 48 h, donde el número de biorreactores fue proporcional al número de cepas obtenidas tras el proceso de termoterapia.

Biorreactor Armado



Figura 8 Modelo de biorreactor tipo Batch

Tomado por: (Las Autoras, 2024)

3.4.3 Extracción de metabolitos secundarios

Se utilizó como base la metodología de extracción descrita por Mizumoto et al. (2006). Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento en el biorreactor, las bacterias se encontraban en fase estacionaria, momento en el cual los nutrientes del medio han disminuido, promoviendo la formación de endosporas y la producción de metabolitos. Se tomó un volumen de 15 mL de cada caldo bacteriano y se trasladó a vasos de precipitación de 50 mL, a estos se adicionó 6,9 mL del solvente etanol al 96% y colocados en una incubadora New Brunswick Excella E24 Incubator Shaker a 150 rpm durante 1 hora a temperatura ambiente (25°C).

Las mezclas resultantes fueron dispuestas en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugaron a 4000 rpm por 15 minutos a temperatura de 4°C. En este proceso los metabolitos secundarios se producen cuando las bacterias son sometidas a condiciones de estrés como la reducción de nutrientes y cambios bruscos de temperatura. Su presencia se encuentra suspendida en el sobrenadante alcohólico y las células bacterianas restantes se concentran en el pellet.

Para asegurar la eliminación completa de restos bacterianos y evitar que interfirieran en la prueba de antibiosis, se filtró el sobrenadante a través de una jeringa equipada con un filtro de 0,22 μm y el producto filtrado se almacenó a 4°C durante 24 horas.

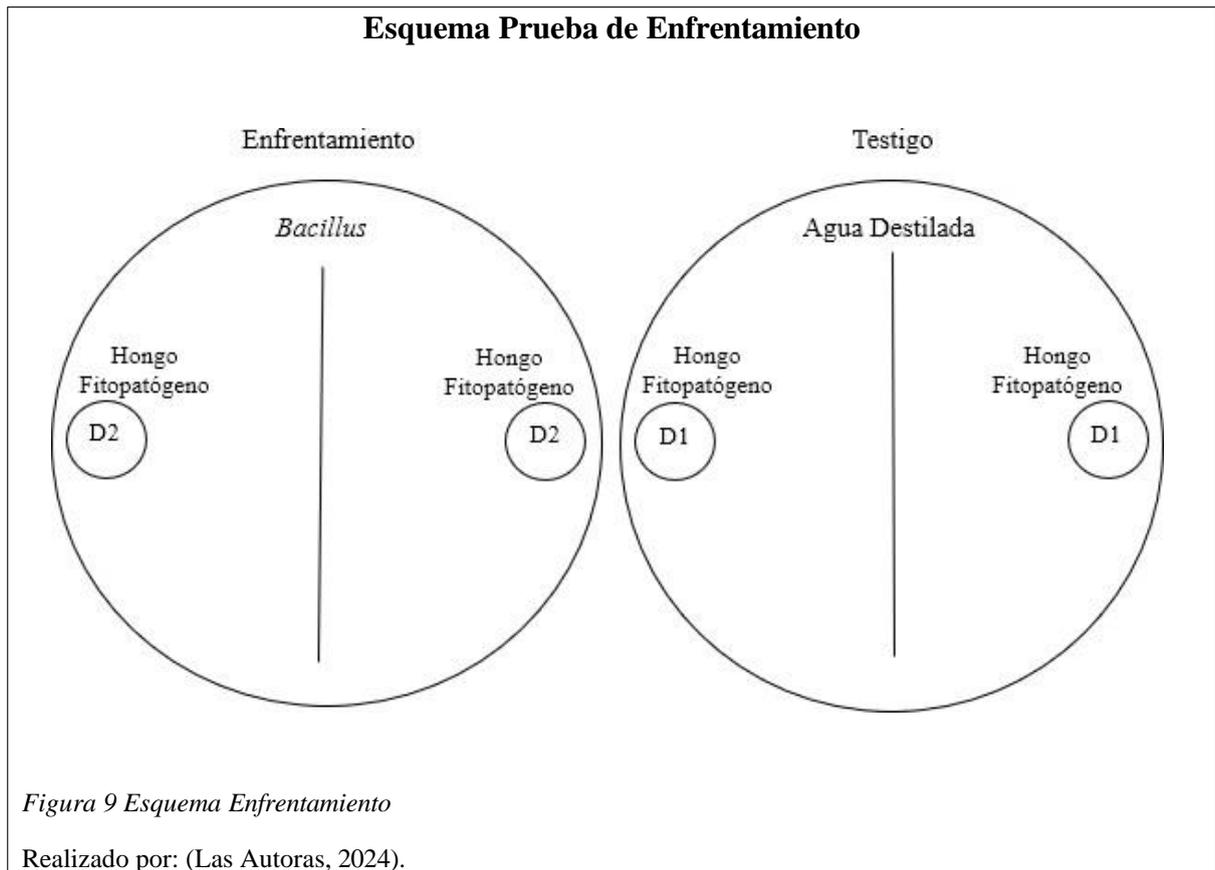
3.5 Pruebas de antagonismo

3.5.1 Enfrentamiento (Inhibición)

A cada cepa bacteriana se la enfrenta de manera dual contra cada hongo fitopatógeno de *Botrytis* sp. y *Colletotrichum* sp., de acuerdo con la metodología propuesta por Yanet-Suárez & Cabrales (2016). Para lo cual en cajas Petri con medio PDA, se colocó un disco de 5mm del fitopatógeno en los extremos de la caja Petri, esto se lo hizo siguiendo una plantilla, la cual se visualiza en la Figura 9.

En cuanto, a las bacterias, se añadió el caldo que se había previamente incubado durante 24 horas en una caja Petri estéril. Con ayuda de una pinza, se tomó un portaobjetos estéril del borde más largo, y a este se lo sumergió en el caldo bacteriano. Posteriormente, con el portaobjetos se tocó suavemente en el centro de la caja Petri que contiene los discos del hongo fitopatógeno a los extremos. Finalmente se incubó las cajas a 25 °C. Para el testigo se preparó una caja Petri con cada hongo fitopatógeno, con la diferencia que se reemplazó la bacteria con agua destilada.

Para evaluar el porcentaje de inhibición generado por *Bacillus* contra el hongo fitopatógeno, en la toma de datos se midió el crecimiento del hongo fitopatógeno con ayuda de un pie de rey cada día a partir de lo que se realizó la prueba, la toma de datos concluyó cuando en el testigo se visualizó la unión de los extremos del hongo fitopatógeno por lo que para *Botrytis* sp. se obtuvieron datos durante 3 días, y para *Colletotrichum* sp. se tomaron datos por 9 días, esta diferencia se dio debido a que el crecimiento de este último hongo es más lento en comparación con *Botrytis* sp.



3.5.1.1 Determinación de la actividad antagónica de *Bacillus* sp. (Porcentaje de Inhibición)

Para determinar el porcentaje de inhibición generado por las diferentes cepas de *Bacillus* ante los hongos fitopatogénos se determinó por ecuación descrita en la investigación realizada por (Yanet-Suárez & Cabrales, 2016):

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

Donde:

D1: Promedio del Diámetro del testigo

D2: Diámetro del patógeno en el tratamiento dual

Para obtener el valor de D1 se sacó un promedio de los testigos de cada repetición, para cada día de la toma de datos.

Para conseguir el valor de D2 se usó la siguiente ecuación:

$$D2 = D_{iB} + D_{dB} \quad (2)$$

Donde:

DiB: Diámetro lado izquierdo del fitopatógeno con la bacteria

DdB: Diámetro lado derecho del fitopatógeno con la bacteria

El cálculo se lo hizo para cada cepa bacteriana, y de esta forma se obtuvo el porcentaje de inhibición

3.5.2 Antibiograma (Antibiosis)

Esta prueba permitió confirmar la eficacia de metabolitos secundarios de *Bacillus* para inhibir el crecimiento de los hongos fitopatógenos, determinando cuáles fueron las mejores cepas en el control biológico.

Para esto se inocularon *Botrytis* sp. y *Colletotrichum* sp. mediante hisopado en cajas Petri con medio PDA para sus respectivas pruebas contra cada cepa bacteriana. Posteriormente, se usaron discos de papel filtro de 5 mm de diámetro, los cuales absorbieron los metabolitos obtenidos mediante capilaridad, evitando sobrecargar los discos con muestra. Se colocaron 4 discos en cada caja Petri que contenía el hongo y como control negativo, se sumergieron discos de papel filtro en agua destilada y colocaron en la superficie del medio PDA. Las pruebas se incubaron a 25°C, y se tomaron datos durante 4 días para ambos hongos fitopatógenos. Se realizaron mediciones diarias de los halos formados alrededor de los discos, lo que logró

identificar las cepas que poseían metabolitos secundarios con mayor eficacia en la inhibición del crecimiento de fitopatógenos (Davis, 2022).

3.5.2.1 Análisis Cualitativo Botrytis

Para la prueba de antibiosis con respecto a *Botrytis* sp., se realizó una evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los metabolitos de *Bacillus* sp., mediante discos impregnados con los mismos. Los discos de 5 mm fueron colocados sobre el medio de cultivo sólido PDA para que los metabolitos puedan difundirse radialmente y formar un gradiente de concentración. Una vez transcurrido el período de incubación, conforme el antimicrobiano se logra distribuir en el medio de cultivo, inhibe el crecimiento del hongo en zonas donde alcanza concentraciones efectivas, creando así el halo que refleja la interacción entre la difusión del compuesto y la capacidad de crecimiento del patógeno (Pérez & Rivas, 2021).

Al ser esta una evaluación cualitativa, el objetivo de dicha prueba fue proporcionar una evaluación preliminar para determinar la presencia o ausencia de actividad antimicrobiana frente a *Botrytis* sp. sin realizar comparaciones numéricas o inferencias estadísticas complejas.

3.5.3 Análisis Estadístico

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos en las pruebas de enfrentamiento para los dos hongos y de la prueba de antibiograma para *Colletotrichum* sp., se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) en un diseño completamente al Azar (DCA). Este tipo de diseño permite probar hipótesis referidas a los parámetros de posición de sujetos seleccionados aleatoriamente en condiciones similares (Maldonado et al., 2018). La variable dependiente en la prueba de enfrentamiento fue el porcentaje de inhibición de los hongos fitopatógenos causado por las diferentes bacterias, siendo estas últimas la variable independiente, estos ensayos contaron con 3 repeticiones.

Se usó el programa de estadística InfoStat versión 2020. Adicionalmente, se ejecutaron pruebas Post hoc con el objetivo de poder diferenciar medias, aplicando la prueba Tukey con una significancia de $\alpha = 0,05$ (Maldonado et al., 2018). En la que se confrontaron las medias de los diferentes tratamientos para establecer la cepa con mayor actividad antagonista.

4 Resultados y discusión

4.1 Termoterapia

Una vez que las cepas bacterianas fueron sometidas al tratamiento de baño María, se sembraron en medio de cultivo sólido PDA, para evaluar su viabilidad mediante el crecimiento en placas.

Los ensayos de termoterapia revelaron que 17 de las 20 cepas de *Bacillus* seleccionadas del banco fueron resistentes a altas temperaturas (70 °C). La capacidad de estas bacterias para resistir condiciones térmicas extremas sugiere que se encuentran puras y con funcionamiento de sus mecanismos de adaptación característicos, como la formación de endosporas. Este resultado resalta el potencial de dichas cepas que se usaron en los procesos siguientes del trabajo de investigación.

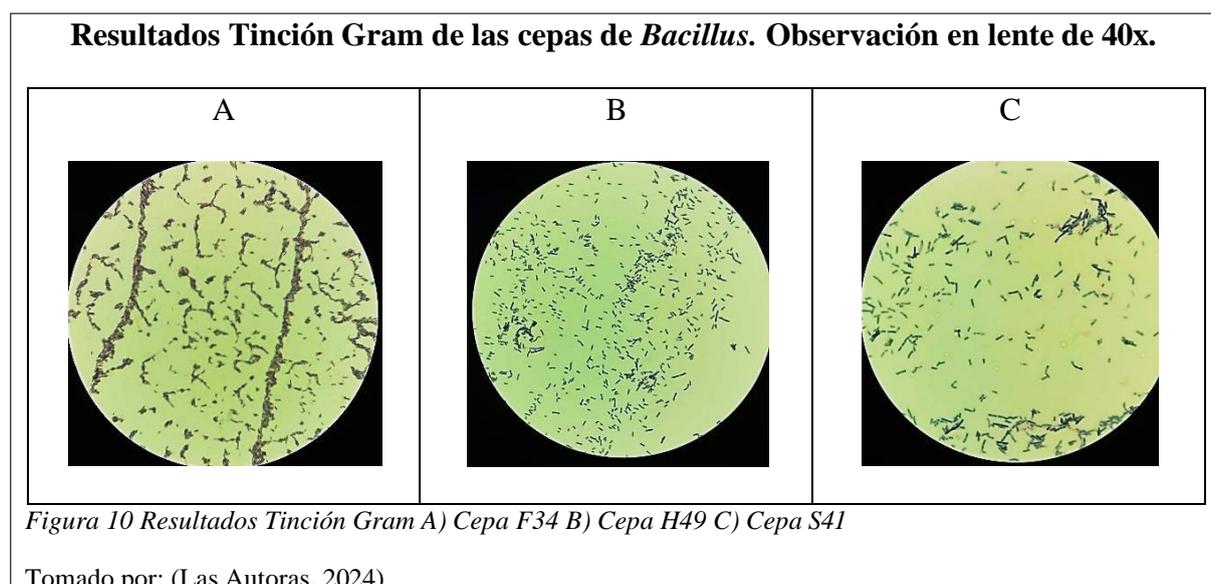
Esto se puede corroborar con los ensayos realizados por Rodríguez-Hernández et al. (2020), su estudio consistió en separar cepas del género *Bacillus* a partir de raíces de sorjo y maíz, para ello sometieron las raíces a baño María a una temperatura de 80°C por 20 minutos y una vez terminado el proceso fueron sembradas en agar nutritivo. Se incubaron a 37°C durante 48 horas. Se eligieron colonias que presentaban un color crema, forma irregular y apariencia ondulada tomando en cuenta aquellas con bordes que mostraban características digitiformes, aserradas o lobuladas, además de tener una consistencia cremosa. Las endosporas muestran viabilidad efectiva hasta 80°C por dos horas, mientras que, en un rango mayor a 90°C pueden ser destruidas.

4.2 Validación microscópica

4.2.1 Tinción Gram

Para la validación y caracterización microscópica de las cepas de *Bacillus*, se inició con la tinción Gram de cada cepa viable que se obtuvo tras el proceso de termoterapia. En esta prueba se observaron bacterias en forma de bastón alargado que se tiñeron de color violeta o púrpura, confirmando su clasificación como bacterias Gram positivas, de igual forma se identificó que algunas de ellas se encontraban formando cadenas, mientras que otras aparecían aisladas.

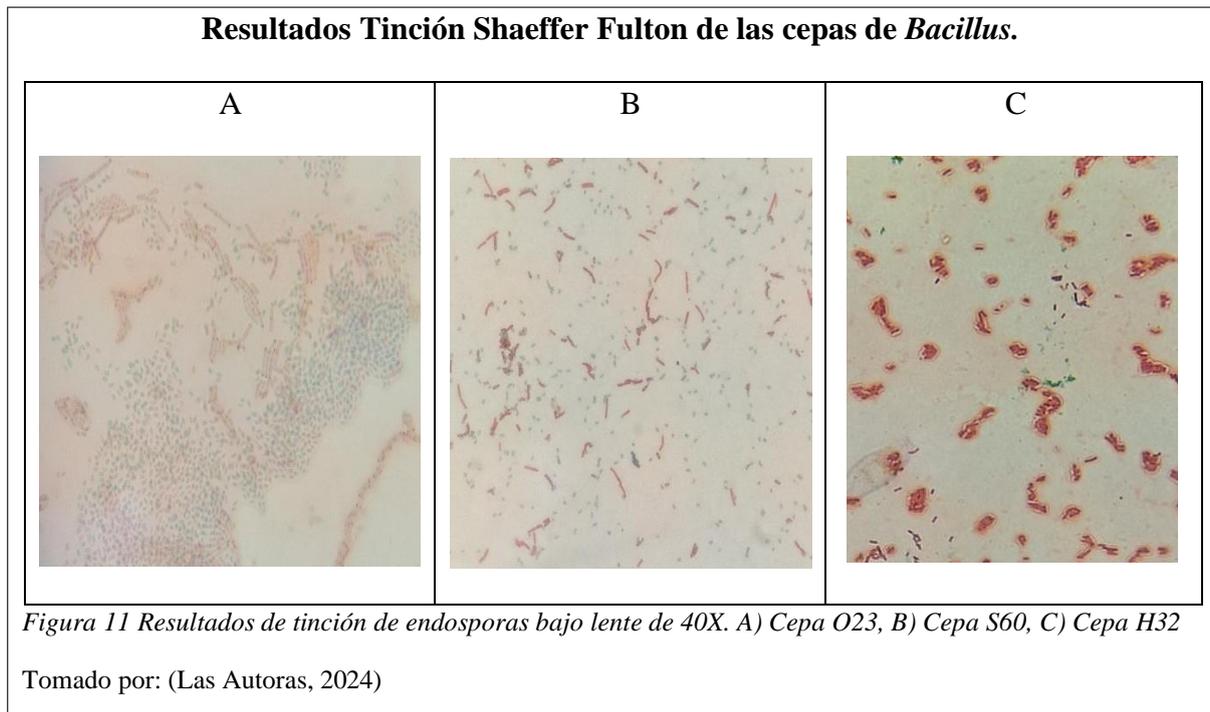
En todas las cepas analizadas se observó un solo tipo de bacteria, es decir todas las bacterias presentes eran de la misma forma y se tiñeron del mismo color, lo que confirma la pureza de las muestras. Estos resultados se observan en la Figura 10 y permitieron comprobar que las cepas de *Bacillus* que se utilizaron en este estudio coinciden con identificación realizada en otros trabajos. Por ejemplo, Corrales-Ramírez et al. (2014) describen que las bacterias de este género se caracterizan por ser Gram positivas y esporuladas. De igual forma Vásquez & Millones (2023), describen a estos bacilos como organismos Gram positivos con bordes ovalados y agrupados en cadenas.



4.2.2 Tinción de endosporas

En relación con la tinción de endosporas, se confirmó la presencia de estas estructuras en las 17 cepas viables. El uso de verde malaquita permitió identificar claramente las endosporas, mientras que la safranina tiñó el bacilo en su forma vegetativa, como se puede observar en la Figura 11. Estos resultados son similares a los descritos por Maksong et al. (2017), quienes emplearon este método y ha demostrado ser eficaz para la identificación de endosporas.

Este resultado confirma que las bacterias no solo son viables y termorresistentes, sino que también, demuestra que poseen la capacidad de producir metabolitos con actividad antifúngica. Estos pueden mantener su actividad a temperaturas elevadas, desempeñando un papel crucial en la inhibición del crecimiento de hongos patógenos, lo que refuerza el posible potencial de estas cepas como agentes biocontroladores (Castillo et al., 2004).



4.3 Porcentaje de Inhibición de crecimiento radial (PIRC)

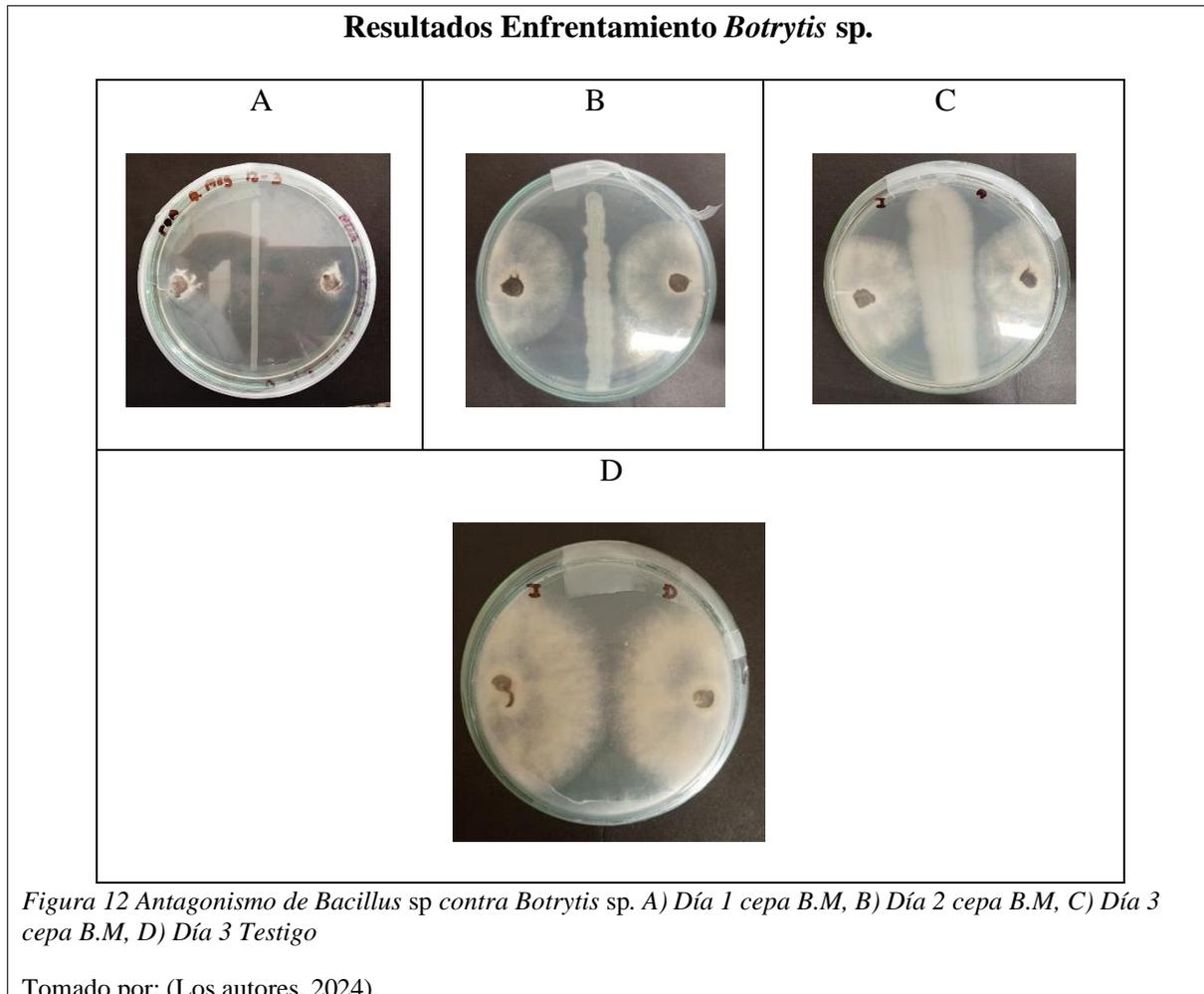
4.3.1 *Botrytis* sp.

Los ensayos de antagonismo dual contra el fitopatógeno *Botrytis*, arrojaron resultados favorables, ya que las 17 cepas de *Bacillus* que superaron la termoterapia demostraron una capacidad para frenar el crecimiento del patógeno. La evaluación de la actividad inhibidora se llevó a cabo durante 3 días consecutivos, lo cual permitió observar el avance del efecto antagonista de las cepas bacterianas sobre el fitopatógeno. Este efecto se evidenció mediante el rápido crecimiento de las bacterias en la zona de interacción, lo que sugiere competencia por espacio y nutrientes como puede verse en la Figura 12.

Estos resultados coinciden con los reportados por Bolivar-Anillo et al. (2021), quienes muestran la producción de Botryano, un exopolisacárido secretado al medio para protección del hongo, facilitar su colonización en superficies de las plantas, y evadir respuestas de defensa de sus hospedadores. En los ensayos de antagonismo con *B. subtilis* 6SM y *Botrytis cinerea* B0510, identificaron que en ausencia de interacción, la concentración de Botryano es de 26 $\mu\text{m}/\text{mL}^{-1}$; mientras que en la zona de interacción entre la bacteria y el hongo, la concentración del compuesto disminuyó a 4,6 $\mu\text{m}/\text{mL}^{-1}$ con alteraciones en el citoplasma de las hifas, como la formación de vacuolas o sifones dentro de las células dado el estrés y daño ocasionado por el antagonista. Esto evidenció que *B. subtilis* inhibe la producción del exopolisacárido.

En la investigación realizada por Cedeño Alcívar et al. (2023), obtuvieron cepas de *B. subtilis* 50 BP, 20 BP, E-54, 31BMC, 21 BMC y *B. licheniformis* E-44 y fueron sometidas a interacción con *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp. de cultivos de cacao de la ciudad de Calceta en la provincia de Manabí, Ecuador. En los ensayos in vitro, *B. subtilis* 31BMC mostró inhibir el crecimiento de *Aspergillus* sp en un 74,43%, mientras que *B. licheniformis*, logró un 81,52% de inhibición con respecto a *Penicillium* sp.

Toral-Navarro (2019), reportó que la aplicación preventiva de la cepa *Bacillus subtilis* XT1 en cultivos de fresa, tomate y vid redujo la incidencia de *Botrytis cinerea* entre un 50% y un 65%, disminuyendo la severidad de los daños hasta en un 60%. Los ensayos han reportado que las cepas de *Bacillus* logran una inhibición significativa para *Botrytis*, pero no alcanzan los niveles observados con los hongos del género *Aspergillus* sp. y *Penicillium* sp.



El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PIRC) fue la variable estudiada en la investigación. En la Tabla 1 se muestran los datos de promedio (media) obtenido de las repeticiones experimentales y la desviación estándar que permite evaluar la consistencia de los resultados del PIRC indicando la dispersión alrededor de la media, independientemente de si

la inhibición es alta o baja, lo que refleja mayor uniformidad en los resultados, mientras que un valor alto indica mayor dispersión.

Por otro lado, se realizó el ANOVA la prueba la prueba de Tukey ($p = 0.05$) para separar en categorías las cepas con respecto a su significancia estadística. En el segundo día de evaluación, la cepa con mayor actividad de inhibición fue *B. amyloliquefaciens* (B.A), siendo superada por F25 en el día 3, por otro lado, la cepa con menor actividad de inhibición durante el tratamiento es H49. El resto de las cepas comparten las categorías A, B, C indicando que no tienen diferencia estadística significativa.

En el tercer día de tratamientos se obtuvieron los valores más altos de inhibición donde las cepas *B. amyloliquefaciens* (41,9+/-5,5), S41 (40,8+/-6,1), F25 (44,2+/-1,6) y F52 (41,7+/-0,9) tienen valores de PIRC más altos de media y con desviación estándar baja, lo que indica alta consistencia y efectividad en la inhibición del hongo.

Tabla 1 Resultados de PIRC para *Botrytis* sp.

| Tratamiento | PIRC (Día1) | PIRC (Día 2) | PIRC (Día 3) |
|-------------|-------------|--------------|--------------|
| B.A | 0,7±0,6 a | 33,7±1,0 a | 41,9±5,5 ab |
| B.M | 6,8±6,6 a | 16,2±8,4 bc | 32,7±7,0 ab |
| B.S | 3,7±6,4 a | 20,4±4,1 abc | 39,1±2,0 ab |
| F22 | 18,9±4,2 a | 22,5±3,3 abc | 39,8±3,3 ab |
| F25 | 10,7±9,9 a | 28,4±2,0 ab | 44,2±1,6 a |
| F34 | 12,1±20,9 a | 16,7±5,8 bc | 30,4±12,2 ab |
| F52 | 5,2±9,0 a | 23,0±1,1 abc | 41,7±0,9 ab |
| H31 | 5,5±6,4 a | 19,1±5,1 abc | 36,6±5,9 ab |
| H32 | 12,1±10,0 a | 19,7±5,1 abc | 36,2±2,5 ab |
| H35 | 7,1±3,8 a | 20,5±5,6 abc | 37,5±2,0 ab |
| H49 | 2,6±4,5 a | 13,6±6,8 c | 27,1±0,2 b |
| H52 | 22,3±5,4 a | 16,7±3,6 bc | 31,4±1,6 ab |
| H66 | 10,2±11,2 a | 16,6±3,1 bc | 33,4±3,5 ab |
| O23 | 15,1±13,4 | 21,6±6,9 abc | 39,1±8.1 ab |

| | | | |
|------------|-------------|--------------|-------------|
| O41 | 9,4±4,8 a | 13,9±2,5 bc | 35,3±2,6 ab |
| S41 | 18,4±17,4 a | 21,6±6,8 abc | 40,8±6,1 ab |
| S60 | 3,6±6,2 a | 18,8±2,4 bc | 36,8±2,8 ab |

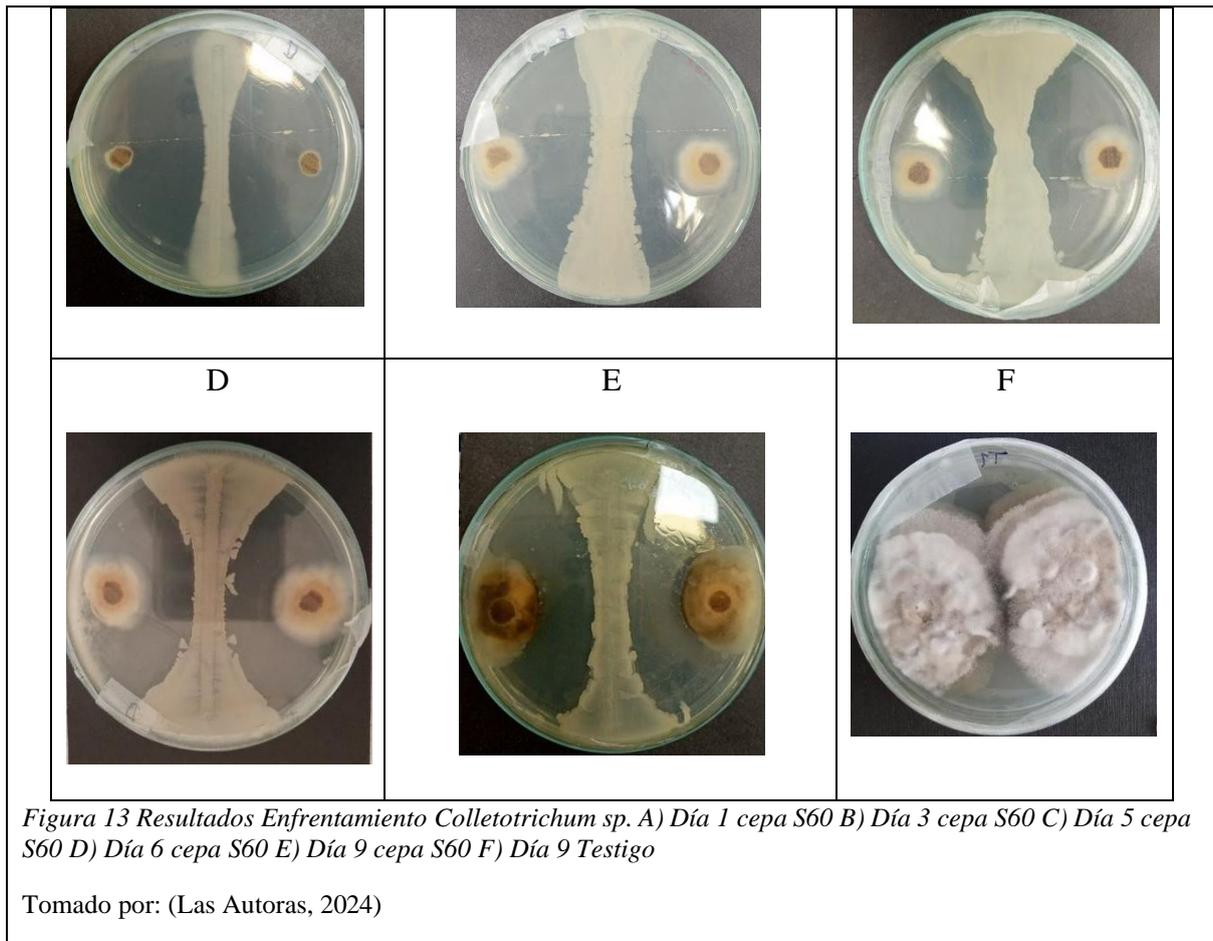
Elaborado por: (Las autoras, 2024).

4.3.2 *Colletotrichum* sp.

En las pruebas de enfrentamiento contra *Collectotrichum* sp., se observó que las 17 cepas de *Bacillus* lograron inhibir el crecimiento de este hongo. Como se mencionó en metodología los datos para este fitopatógeno se recolectaron durante 9 días debido a su lento crecimiento. Según los resultados obtenidos, el crecimiento de *Collectotrichum* en presencia de *Bacillus* se mantuvo hasta el día 6, momento en que este hongo empezó a disminuir su tamaño y entro en fase de senescencia. Este estado se caracterizó por un cambio d coloración hacia un tono café oscuro, indicador de la muerte de este fitopatógeno, tal como se muestra en la Figura 13.

Estos resultados coinciden con los reportados por Ruiz-Sánchez et al. (2018), quienes documentaron que *Colletotrichum gloeosporioides* expuesto a cepas de *Bacillus subtilis* como la CBMN22 y la CBCC2, sufre cambios morfológicos y deformaciones en los tubos germinativos lo que provoca el cambio de coloración y un crecimiento reducido. Sin embargo, Ayón et al. (2020), encontraron que la inhibición de *Collectotrichum* por *Bacillus* fue significativamente menor en comparación con otros hongos, como *Pestalotiopsis* sp. e incluso observaron que no todas las cepas de *Bacillus* lograron inhibir su crecimiento.

| Resultados Enfrentamiento <i>Colletotrichum</i> sp. | | |
|--|---|---|
| A | B | C |
| | | |



De igual forma con los datos obtenidos se pudo calcular el porcentaje de inhibición de *Bacillus* contra *Colletotrichum* durante los 9 días que duro el enfrentamiento y con estos datos se pudo obtener la Tabla 2 en donde se representa la media del PIRC (Porcentaje de inhibición del crecimiento radial), la desviación estándar y la prueba de Tukey ($p = 0.05$), con el objetivo de separar las medias, para cada cepa durante los 3 últimos días de evaluación.

De acuerdo con los resultados, las cepas analizadas no lograron un PIRC mayor al 50% durante los primeros 6 días de evaluación. Sin embargo, entre los días 7, 8 y 9 se registraron valores de PIRC entre el 65% y 83%, demostrando que estas cepas de *Bacillus* no poseen un efecto inhibitorio significativo en los primeros días del enfrentamiento, pero conforme avance el tiempo, su capacidad de inhibir el crecimiento de *Colletotrichum* aumenta significativamente.

De igual forma, a través de la prueba Tukey se demostró que en los días 7 y 8 las cepas con menor inhibición son *B. subtilis* y O23 por lo que se les caracteriza con el grupo B, en cambio las cepas con mayor PIRC son *B. megaterium*, O41, H35 y H32, categorizándose en el grupo A. El resto de las bacterias comparten grupo entre A y B indicando que no existe una diferencia estadística significativa. En cuanto al día 9 las mejores cepas fueron O41 y *B. megaterium*, perteneciendo al grupo A y las cepas con mejor inhibición fueron las mismas que en los días anteriores, por lo que se categorizo en el grupo C. Las demás cepas comparten las letras A, B y C indicando poca diferencia significativa.

Tabla 2 Resultados PIRC y prueba Tukey *Colletotrichum* sp.

| Tratamiento | PIRC Dia 7 | PIRC Dia 8 | PIRC Dia 9 |
|-------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| B.A | 64,80 +/- 7,67 ab | 70,71 +/- 7,25 ab | 73,94 +/- 5,69 abc |
| B.M | 75,00 +/- 1,61 a | 80,76 +/- 0,77 a | 83,99 +/- 1,61 a |
| B.S | 51,28 +/- 12,39 b | 57,40 +/- 9,90 b | 62,82 +/- 9,10 c |
| F22 | 66,45 +/- 2,14 ab | 70,55 +/- 4,46 ab | 73,89 +/- 3,30 abc |
| F25 | 61,31 +/- 9,25 ab | 66,93 +/- 7,13 ab | 68,02 +/- 5,53 abc |
| F34 | 63,73 +/- 3,37 ab | 70,00 +/- 3,58 ab | 73,56 +/- 4,11 abc |
| F52 | 61,73 +/- 12,64 ab | 66,42 +/- 10,22 ab | 70,03 +/- 8,78 abc |
| H31 | 67,48 +/- 5,47 ab | 75,55 +/- 3,12 a | 77,90 +/- 3,18 abc |
| H32 | 72,98 +/- 5,15 a | 76,39 +/- 2,60 a | 78,92 +/- 2,50 ab |
| H35 | 71,77 +/- 0,36 a | 76,79 +/- 0,29 a | 78,87 +/- 0,26 ab |
| H49 | 55,89 +/- 9,73 ab | 64,51 +/- 6,10 ab | 63,28 +/- 8,98 bc |
| H52 | 64,33 +/- 3,99 ab | 69,61 +/- 2,23 ab | 71,88 +/- 2,11 abc |
| H66 | 61,74 +/- 2,26 ab | 63,87 +/- 3,05 ab | 69,05 +/- 1,07 abc |
| O23 | 47,85 +/- 6,51 b | 58,07 +/- 8,22 b | 62,57 +/- 6,81 c |
| O41 | 72,38 +/- 5,20 a | 77,74 +/- 4,63 a | 80,93 +/- 5,15 a |
| S41 | 64,70 +/- 4,35 ab | 70,07 +/- 3,33 ab | 72,35 +/- 2,98 abc |
| S60 | 65,13 +/- 3,72 ab | 69,83 +/- 6,21 ab | 73,40 +/- 5,62 abc |

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Estos resultados difieren de los obtenidos por Ayón et al. (2020), donde obtuvieron un PIRC menor de 23,16% al evaluar *B. subtilis* contra *C. gloeosporioides*, no obstante, el mismo autor reportar resultados cercanos a los obtenidos en esta investigación con un PIRC de 53,02% al evaluar *B. amyloliquefaciens* contra el mismo hongo. Porcentajes similares a los nuestros

obtuvieron Ruiz-Sánchez et al. (2018), al evaluar las cepas de *Bacillus* CBRF24, CBCC2 y CBCK36 con porcentajes de entre 70% y 80% de inhibición. Finalmente Reyes-Estebanez et al. (2020), alcanzaron resultados que concuerdan con los conseguidos en este trabajo experimental, donde se evidencia que las cepas de *Bacillus* sp. TS3B-44, TS3B-45, TS3B-92 y TS3B-183 tienen un porcentaje de inhibición del 76%, 80%, 78% y 64% respectivamente.

4.4 Ensayos de antibiosis (Antibiograma)

4.4.1 *Botrytis* sp.

En las pruebas de antibiograma para *Botrytis* sp., frente a la presencia de los metabolitos secundarios de las cepas de *Bacillus*, se determinó que, durante los 3 días de observación, no existió la presencia de halos de inhibición. Sin embargo, el crecimiento del hongo continuó, tal como se observa en la Figura 14. Figura 1

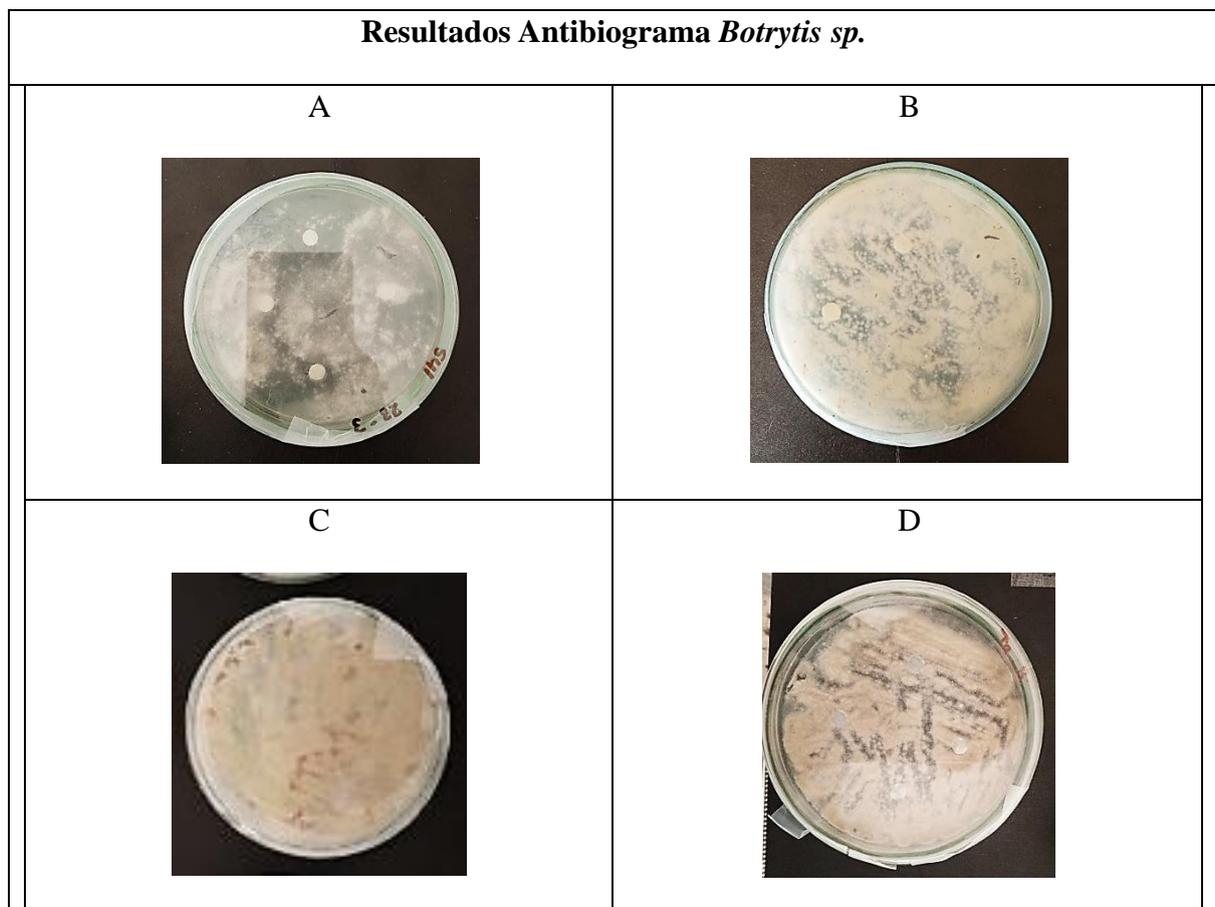


Figura 14 Resultados Antibiograma *Botrytis* sp. A) Cepa S41. Día 1 B) Cepa S41. Día 2 C) Cepa S41. Día 3 D) Testigo. Día 3

Tomado por: (Las Autoras, 2024)

Estos resultados obtenidos difieren a los descritos por Ríos Velasco et al. (2016) quienes observaron halos de inhibición de 4,95 a 13,15 mm con *B. methylotrophicus* y halos de 4,15 a 8,45 mm para *B. amyloliquefaciens*. Medidas similares obtuvo Caiza (2024) tras evaluar extractos de *Bacillus subtilis* AC01 contra *B. cinerea* CC-FCAGP-Bc-MG001 con un promedio de halos de inhibición de 7,33 mm a 9,67 mm.

Por otro lado Rivera-Salas et al. (2024), realizaron una evaluación de halos de inhibición generados por *B. amyloliquefaciens* demostrando que las condiciones de fermentación influyen en la respuesta, extractos fermentados por más de 45 horas y a temperaturas mayores o iguales a 32,2 °C generaron halos de inhibición entre 0,9 mm a 13 mm, siendo el tiempo de 158,6 horas y una temperatura de 26,8 °C la más adecuada. No obstante, los mismos autores demostraron que cepas fermentadas a temperaturas inferiores a 30 °C y por un tiempo menor a 46 horas no generaron halos de inhibición. De acuerdo con Caiza (2024), la concentración mínima de metabolitos secundarios de origen lipopeptídico como la iturina y la surfactina para la generación de halos de inhibición debe ser mayor a 10 mg/mL.

Estos autores nos permiten evidenciar que la condición y el tiempo de fermentación antes de la extracción de los metabolitos secundarios influye en la concentración de estos, y por ende puede que las condiciones de fermentación establecidas durante esta investigación no fueron las óptimas para obtener una concentración de metabolitos suficiente para generar halos de inhibición frente a *Botrytis* sp.

En adición, Cedeño Alcívar et al. (2023), mencionan que el control de *Bacillus* con respecto a *Botrytis*, se muestra más eficiente en su acción a nivel celular que a través de metabolitos

secundarios, dado que, esta bacteria tiene la capacidad de producir enzimas hidrolíticas como la quitinasa, la β -1,3-glucanasa y las proteasas que actúan en la degradación de la pared celular del hongo, lo que ha mostrado un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento patógeno en comparación con metabolitos secundarios, sugiriendo que la presencia activa de las bacterias es crucial para una mayor eficacia con dicho hongo.

4.4.2 *Colletotrichum* sp.

Con respecto a *Colletotrichum* sp., las pruebas de antibiograma, realizadas durante 4 días mostraron halos de inhibición claros y cambios en el color del micelio en presencia de los metabolitos secundarios de las cepas de *Bacillus* sp., como puede verse en la Figura 15. Este fenómeno podría atribuirse a la producción de antibióticos como la iturina y la surfactina que pueden inhibir el crecimiento del hongo, provocando que sus estructuras celulares se deterioren y cambien de color como respuesta al estrés (Ruiz-Sánchez et al., 2018).

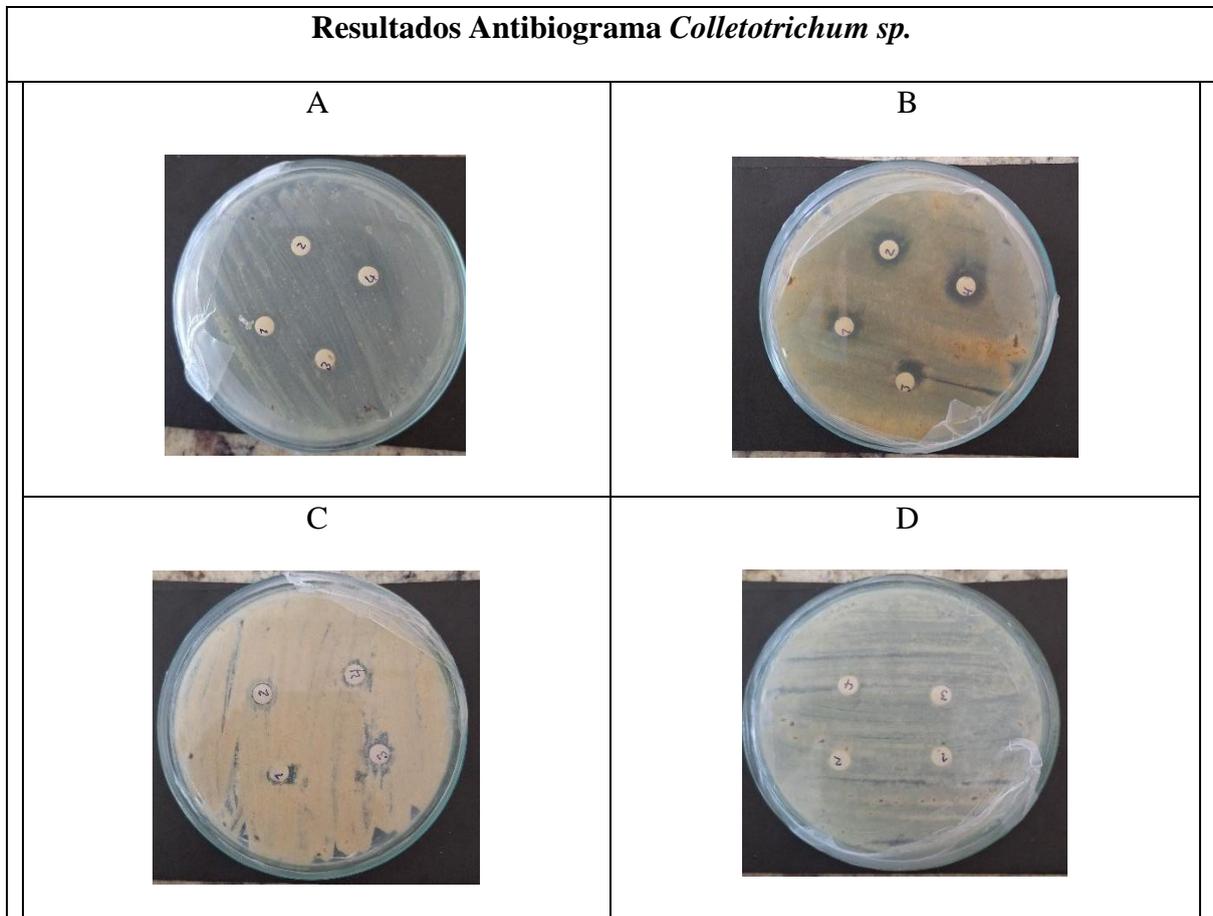


Figura 15 Resultados Antibiograma *Colletotrichum sp.* A) Día 2 cepa *B. subtilis* B) Día 4 cepa 60 C) Día 5 cepa O41 D) Testigo Día 4

Tomado por: (Los Autores, 2024).

Los halos fueron medidos para cuantificar la inhibición, permitiendo identificar las cepas efectivas para inhibir el fitopatógeno. El análisis estadístico mediante la prueba Tukey reveló que la cepa de *Bacillus* S60 presentó mayor inhibición, siendo significativamente diferente al resto de cepas en el día 3 y 4 de evaluación como se presenta en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados Prueba Tukey para antibiograma de *Colletotrichum sp.*

| Tratamiento | Día 1 | Día 2 | Día 3 | Día 4 |
|-------------|-------------|--------------|--------------|--------------|
| | PIRC | PIRC | PIRC | PIRC |
| B.A | 2,03±1,62 a | 3,30±2,47 ab | 3,65±2,77 ab | 3,6±2,77 ab |
| B.M | 0,66±0,61 a | 2,40±1,10 ab | 2,54±1,26 ab | 2,54±1,26 ab |
| B.S | 2,43±2,33 a | 4,23±1,48 ab | 4,59±2,28 ab | 4,59±2,28 ab |
| F22 | 1,86±1,30 a | 3,13±1,44 ab | 3,13±1,44 ab | 3,13±1,44 ab |
| F25 | 0,73±0,49 a | 1,89±0,80 ab | 1,98±0,86 ab | 1,98±0,86 ab |
| F34 | 1,03±0,86 a | 2,78±2,14 ab | 2,86±2,12 ab | 2,86±2,12 ab |
| F52 | 1,03±1,14 a | 3,52±3,55 ab | 4,22±3,23 ab | 4,19±3,23 ab |
| H31 | 0,90±0,64 a | 1,83±1,45 ab | 1,83±1,45 ab | 1,83±1,45 ab |
| H32 | 0,64±0,48 a | 1,42±1,46 ab | 1,72±1,43 ab | 1,72±1,43 ab |
| H35 | 0,94±0,77 a | 2,12±1,74 ab | 2,32±1,64 ab | 2,32±1,64 ab |
| H49 | 0,25±0,31 a | 2,27±2,23 ab | 2,27±2,23 ab | 2,27±2,23 ab |
| H52 | 1,12±0,77 a | 2,31±1,73 ab | 2,27±1,76 ab | 2,27±1,76 ab |
| H66 | 1,06±1,32 a | 2,28±1,22 ab | 2,46±1,55 ab | 2,46±1,55 ab |
| O23 | 1,26±0,98 a | 3,36±2,31 ab | 3,76±2,58 ab | 3,76±2,58 ab |
| O41 | 0,81±0,23 a | 2,33±0,90 ab | 2,29±0,85 ab | 2,29±0,85 ab |
| S41 | 1,06±0,47 a | 2,96±0,63 ab | 3,06±0,62 ab | 3,06±0,62 ab |
| S60 | 2,26±1,01a | 5,16±0,56 b | 6,00±1,64 b | 6,00±1,64 b |

Elaborado por: (Las autoras, 2024).

Estos resultados concuerdan con los descritos por Ruiz-Sánchez et al. (2018), quienes demostraron que *Bacillus subtilis* tiene propiedades antagónicas contra *C. gloeosporioides*. mostraron tasas de inhibición del crecimiento que oscilaban entre el 62% y el 80% cuando se enfrentaron directamente al hongo, las zonas de inhibición variaron de 0,20 mm a 0,88 mm y la cepa CBCC2 logró hasta un 70% de inhibición de la germinación de conidios, lo que indica

un fuerte potencial de estas bacterias en el manejo de enfermedades fúngicas en los cultivos. En las pruebas con la técnica de papel filtro para comparar los halos de inhibición, observaron que cinco de las siete cepas usadas en el estudio formaron halos de entre 0,13 y 0,26 mm, los compuestos antifúngicos conservaron su actividad incluso tras un tratamiento a 80 °C, fracciones de iturina A y fengicina producidas por la cepa *Bacillus subtilis* CMB32 generan halos de inhibición en *C. gloeosporioides*.

5 Conclusiones

- Los resultados obtenidos evidencian la capacidad antagonista de las cepas de *Bacillus* sp. ante los hongos fitopatógenos de *Botrytis* sp. y *Colletotrichum* sp. manifestada a través de mecanismos como la inhibición del crecimiento micelial y la competencia por nutrientes, posicionándolas como candidatas prometedoras para el desarrollo de biocontroladores.
- En la observación y análisis microscópico de las 17 cepas de *Bacillus* sp. se obtuvo como resultado la identificación de bacterias Gram + dado por su tinción morada y la observación de que todas tienen la presencia de esporas.
- El estudio evidenció que el uso de *Bacillus* sp. en los ensayos de antibiosis para contrarrestar a *Botrytis* sp., poseen una mayor acción de inhibición en su forma celular que a través de metabolitos secundarios, mientras que para *Colletotrichum* sp., la cepa con mejor acción de metabolitos secundarios fue S60.
- Los resultados de enfrentamiento indican que ciertas cepas tienen una actividad antifúngica significativa frente a *Botrytis* sp. y *Colletotrichum* sp., siendo las más destacadas F25, S60 y *B. amilo* para el primer hongo y O41 y *B. megaterium* para *Colletotrichum* sp.

6 Recomendaciones

- Profundizar en metodología para producción y extracción de metabolitos secundarios, para determinar condiciones en función del tiempo, medio de cultivo, temperatura y solvente de extracción para generar la mayor cantidad de metabolitos con actividad antifúngica.
- Realizar estudios adicionales que analicen el efecto de las cepas de *Bacillus* sp. en diferentes condiciones ambientales, como variaciones de pH, temperatura y humedad, para determinar su efectividad y viabilidad en condiciones similares a las del campo.
- Realizar un monitoreo a largo plazo que permita evaluar la aparición de posibles resistencias de *Botrytis* sp. y *Colletotrichum* sp., para asegurar la sostenibilidad del biocontrol y generar estrategias para aumentar su efectividad.
- Analizar la estabilidad de las formulaciones basadas en metabolitos secundarios de con *Bacillus* sp. para productos comerciales de biocontrol e implementar un análisis de costos que permita a los agricultores determinar la viabilidad económica del biocontrol a escala industrial en comparación de los productos químicos del mercado, para que sean más sostenibles.

7 Bibliografía

- Ayón, C. B. C., Esquivel, G. L., Velasco, C. R., Virgen, O. E., Aranguré, A. B., & Campos, O. J. C. (2020). In vitro evaluation of antagonists against soursop fruit pathogens (*Annona muricata* L.) in Nayarit, Mexico. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 42(2). <https://doi.org/10.1590/0100-29452020147>
- Bolda, M., & Koike, S. (2016). El Moho Gris, o Pudrición de Fresa Introducción y significado. *Comisión de La Fresa California*, 13, 1–6. <http://ucanr.edu/blogs/fresamora/blogfiles/37849.pdf>
- Bolivar-Anillo, H. J., González-Rodríguez, V. E., Cantoral, J. M., García-Sánchez, D., Collado, I. G., & Garrido, C. (2021). Endophytic Bacteria *Bacillus subtilis*, Isolated from *Zea mays*, as Potential Biocontrol Agent against *Botrytis cinerea*. *Biology*, 10(6), 492. <https://doi.org/10.3390/biology10060492>
- Bouffleur, T. R., Ciampi-Guillard, M., Tikami, Í., Rogério, F., Thon, M. R., Sukno, S. A., Massola Júnior, N. S., & Baroncelli, R. (2021). Soybean anthracnose caused by *Colletotrichum* species: Current status and future prospects. *Molecular Plant Pathology*, 22(4). <https://doi.org/10.1111/mpp.13036>
- Cadena, V., & López, A. (2021). IDENTIFICACIÓN DE HONGOS CON POTENCIAL BIOCONTROLADOR DE *Colletotrichum* sp., EN CULTIVO DE TOMATE DE ÁRBOL (*Solanum betaceum*), EN LA PROVINCIA DE TUNGURAHUA. UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA.
- Caiza, A. (2024). Evaluación de la capacidad antagónica de *Bacillus subtilis* AC01 microencapsulado frente a *Cladosporium fulvum* CC-FCAGP-Cf-Epi10 y *Botrytis cinerea* CC-FCAGP-Bc-MG001 hongos fitopatógenos del tomate riñón (*Solanum lycopersicum*). Universidad Técnica de Ambato.
- Carreño, J., Sánchez, L., Guzmán-Cedeño, A., Suarez-Palacios, C., & Vélez-Zambrano, S. (2021, April). In vitro effect of fungicides for the control of *Colletotrichum* sp. In fruit trees Manabí - Ecuador. *Revista Ciencia UNEMI*, 37–42.
- Casasola, M. J. (2022). La importancia de realizar una correcta tinción de Gram en la identificación bacteriana. *Revista Del Colegio de Microbiólogos y Químicos Clínicos de Costa Rica*, 27(2), 89–98. <https://revista.microbiologos.cr/articulo/la-importancia-de-realizar-una-correcta-tincion-de-gram-en-la-identificacion-bacteriana/>
- Castillo, C., Sosa, M., & Scorza, J. (2004). Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos producidos por esporulados del género *Bacillus*. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1–2), 65–67. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100011&lng=es&tlng=es.
- Castillo Colombo, C., Sosa Briceño, & Scorza, J. (2004). Evaluación de la termorresistencia en metabolitos antifúngicos producidos por esporulados del género *Bacillus*. *Revista de La Sociedad Venezolana de Microbiología*, 24(1–2), 65–67. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562004000100011&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Cedeño Alcívar, D. C., Cedeño Guzmán, W. P., Vera Macías, L. A., & Vélez Zambrano, S. M. (2023). Inhibición del crecimiento in vitro de *Bacillus* sp. sobre hongos asociados al proceso de fermentación en cacao. *Manglar*, 20(3), 233–238. <https://doi.org/10.57188/manglar.2023.026>

- Corrales-Ramírez, L. C., Sánchez-Leal, L. C., Arévalo-Galvez, Z. Y., & Moreno-Burbano, V. E. (2014). *Bacillus*: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *Nova*, 12(22). <https://doi.org/10.22490/24629448.1041>
- Cucás-Trejo, C. (2018). *Evaluación del método mecánico con capuchones para el control de Botrytis cinerea en el cultivo de rosa (Rosa sp.)* [Tesis de Grado]. Universidad Politécnica Estatal del Carchi.
- Davis, M. E. (2022). Evaluación del potencial efecto fungicida de cepas de *Streptomyces* sp. para el control de hongos patógenos que afectan a *Cocos nucifera* [Universidad de los Andes]. In *Systematic Botany* (Vol. 21, Issue 2). <http://hdl.handle.net/1992/59257>
- Favaro, M. A., Fernandez, L. N., & Maumary, R. L. (2022, April). El género *Colletotrichum*: Avances y perspectivas para cultivos intensivos en Argentina. *Boletín de La Asociación Argentina de Fitopatólogos*.
- Flores-Paucar, G. A. (2017). *Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del extracto de Pleurotus ostreatus ante cepas de Escherichia coli y Staphylococcus aureus*. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- García, R. (2004). *Botrytis cinerea en el cultivo de Rosa híbrida en la zona florícola sur del Estado de México y la evaluación de su sensibilidad in vitro a fungicidas*.
- Gonzales, M. (2018). Estudio, Caracterización Y Diseño De Biorreactor Para Su Incorporación En Planta De Abatimiento De Arsénico Y Antimonio De Ecometales. In *Universidad De Chile Facultad De Ciencias Físicas Y Matemáticas Departamento De Ingeniería Química, Biotecnología Y Materiales* (Vol. 372, Issue 2). Universidad De Chile.
- González-León, Y., Ortega-Bernal, J., Anducho-Reyes, M. A., & Mercado-Flores, Y. (2022). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.520>
- Guamán, M. (2018). *Caracterización morfológica, molecular y de resistencia a fungicidas de Colletotrichum sp., aislado de tomate de árbol (Solanum betaceum)*. UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS.
- Hernández-Ixta, S., & Hernández, J. C. G. (2018). Biorreactores: Protagonistas de los bioprocesos. *Revista de Divulgación Saber Más*.
- InfoAgro. (2020). Las técnicas para el control de la botrytis. In *Revista Infoagro México*.
- Koima, I. N., Kilalo, D. C., Orek, C. O., Wagacha, J. M., & Nyaboga, E. N. (2023). Identification and Characterization of *Colletotrichum* Species Causing Sorghum Anthracnose in Kenya and Screening of Sorghum Germplasm for Resistance to Anthracnose. *Journal of Fungi*, 9(1). <https://doi.org/10.3390/jof9010100>
- Leiva-Espinoza, S. T., Delgado Campos, P., & Vilca Valqui, N. C. (2017). Efecto de extractos vegetales y fungicidas químicos sobre *Botrytis* sp. en azucena (*Lilium candidum*), bajo condiciones de laboratorio en Chachapoyas, Amazonas. *Revista de Investigación de Agroproducción Sustentable*, 1(1), 30. <https://doi.org/10.25127/aps.20171.347>
- Loyola, C. E., Dole, J. M., & Dunning, R. (2019). South and central América cut flower production and postharvest survey. *HortTechnology*, 29(6). <https://doi.org/10.21273/HORTTECH04484-19>

- Lozano, E., Ramirez, B., Cervantes, M., Nieto, M., & Moreno, F. (2018). Low accuracy of the McFarland method for estimation of bacterial populations. *African Journal of Microbiology Research*, 12(31), 736–740. <https://doi.org/10.5897/AJMR2018.8893>
- Maksong, S., Yemor, T., Yanmanee -, S., Arreola, J., Vahidpour, F., Wagner, T., -, al, Bertz, M., Molinnus, D., Oktari, A., Supriatin, Y., Kamal, M., & Syafrullah, H. (2017). The Bacterial Endospore Stain on Schaeffer Fulton using Variation of Methylene Blue Solution. *Journal of Physics: Conference Series*, 812(1), 012066. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/812/1/012066>
- Maldonado, R., Carrillo, P., Ramirez, L., & Carvajal, F. (2018). Elaboración de una bebida fermentada a base de quinoa (*Chenopodium quinoa*) Production of a fermented drink based on quinoa (*Chenopodium quinoa*). *Enfoque UTE*, 9(3).
- Martínez, K. (2021). *COMPORTAMIENTO DE Colletotrichum spp. EN LA MAZORCA DE CACAO (Theobroma cacao L.) BAJO CONDICIONES DE LABORATORIO, EN MILAGRO, ECUADOR. UNIVERSIDAD AGRARIA DEL ECUADOR.*
- Martínez, L., & Porras, A. (2022). Lectura interpretada del antibiograma. *Guia ABE. Infecciones En Pediatría. Lectura Interpretada Del Antibiograma (En Linea) Disponibles En: Http://Www.Guia-Abe.Es, Consultado.*
- Martínez-Salinas, A. A., Villacís-Aldáz, L. A., Viera-Arroyo, W. F., Jacome Montesdeoca, R. I., Espín-Chico, M. C., León-Gordón, O. A., & Santana-Mayorga, R. (2019). Evaluación de nuevas tecnologías de producción limpia de la mora de castilla (*Rubus glaucus Benth*), en la zona Andina de Ecuador, para un buen vivir de los fruticultores. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 7(1). <https://doi.org/10.36610/j.jsab.2019.070100063>
- Mata, G., & Salmones, D. (2021). Técnicas de aislamiento, cultivo y conservación de cepas de hongos en el laboratorio. In *Instituto de Ecología, AC.* https://www.inecol.mx/inecol/images/pdf/libro_cepas.pdf
- Menezes, M. (2013). Aspectos Biológicos E Taxonômicos De Espécies Do Gênero *Colletotrichum*. In *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica* (Vol. 3, Issue 0).
- Mizumoto, S., Hirai, M., & Shoda, M. (2006). Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72(5), 869–875. <https://doi.org/10.1007/S00253-006-0389-3>
- Nuero, O. M., Alfonso, C., Amo, F. Del, & Reyes, F. (1993). Study of β -1,3-glucanase activity during autolysis of *Aspergillus nidulans* by FPLC ion-exchange chromatography. *Letters in Applied Microbiology*, 17(3). <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.1993.tb01435.x>
- Núñez Lara, R. M., & Vinuesa Páez, A. S. (2023). *Bacterias Del Género Bacillus Como Agentes De Control Biológico In Vitro Del Hongo Fitopatógeno Alternaria Sp* [Universidad Politécnica Salesiana]. <https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/25311>
- Paredes-Buenaño, A. E. (2015). *Diseño de un Biorreactor para la obtención de biogás y bioabono a partir de residuos orgánicos en el canton Patate.* Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Pavone, D. (2020). *Botrytis cinerea*, un hongo patógeno de plantas que amenaza los cultivos agrícolas y la seguridad alimentaria. *Revista TecnoVita*.
- Pedraza-Herrera, L. A., Lopez- Carrascal, C. E., & Uribe Vélez, D. (2020). Mecanismos de acción de *Bacillus spp. (Bacillaceae)* contra microorganismos fitopatógenos durante su interacción con plantas. *Acta Biológica Colombiana*, 25(1). <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>

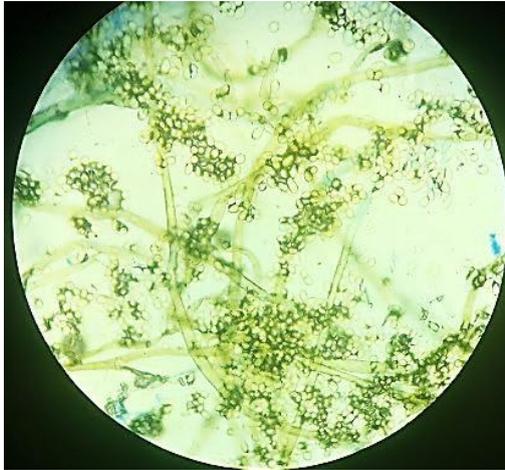
- Pérez, E., & Rivas, A. (2021). *Determinación de la sensibilidad de los microorganismos frente a antimicrobianos de origen natural y la concentración mínima inhibitoria (CMI) por métodos fenotípicos*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/167611>
- Pimentel-Silva, E. (2022). *Actividad antifúngica mediada por lipopéptidos y policétidos producidos por cepas del género Bacillus*. [Tesis de Grado]. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Pincay, A., Noboa, M., Viera, W., Herrera, K., León, A., & Jackson, T. (2021). Evaluación in vitro del potencial antagonista de *Trichoderma* sp. y hongos endófitos de mora (*Rubus glaucus Benth*) para el control de *Botrytis cinerea*. *Journal of Science and Research: Revista Ciencia e Investigación*, 6(1).
- Reyes-Estebanez, M., Sanmartín, P., Camacho-Chab, J. C., De la Rosa-García, S. C., Chan-Bacab, M. J., Águila-Ramírez, R. N., Carrillo-Villanueva, F., De la Rosa-Escalante, E., Arteaga-Garma, J. L., Serrano, M., & Ortega-Morales, B. O. (2020). Characterization of a native *Bacillus velezensis*-like strain for the potential biocontrol of tropical fruit pathogens. *Biological Control*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104127>
- Rios Velasco, C., Caro Cisneros, J. M., Berlanga Reyes, D. I., Ruiz Cisneros, M. F., Ornelas Paz, J. J., Salas Marina, M. Á., Guerrero Prieto, V. M., Rios Velasco, C., Caro Cisneros, J. M., Berlanga Reyes, D. I., Ruiz Cisneros, M. F., Ornelas Paz, J. J., Salas Marina, M. Á., & Guerrero Prieto, V. M. (2016). Identificación y actividad antagonica in vitro de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* spp. contra hongos fitopatógenos comunes. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 34(1).
- Rivera-Méndez, W., Brenes-Madriz, J., & Zúñiga-Vega, C. (2019). Laboratorio de Biocontrol: Investigación vinculada con la producción agrícola. *Revista Tecnología En Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4640>
- Rivera-Salas, M. M., Basilio-Heredia, J., Tovar-Pedraza, J. M., Martín-Hernández, C. S., Valdez-Torres, J. B., Cruz-Lachica, I., & García-Estrada, R. S. (2024). Optimization of fermentation temperature and time for production of an antifungal extract from *Bacillus amyloliquefaciens* B17. *Mexican Journal of Phytopathology*.
- Rodríguez, E., González, J., & Mayek, N. (2009). La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana Mill.*): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1), 53–63. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33092009000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Rodríguez-Hernández, M. G., Gallegos-Robles, M. Á., Rodríguez-Sifuentes, L., Fortis-Hernández, M., Luna-Ortega, J. G., González-Salas, U., Rodríguez-Hernández, M. G., Gallegos-Robles, M. Á., Rodríguez-Sifuentes, L., Fortis-Hernández, M., Luna-Ortega, J. G., & González-Salas, U. (2020). Cepas nativas de *Bacillus* spp. como una alternativa sostenible en el rendimiento de forraje de maíz. *Terra Latinoamericana*, 38(2), 313–321. <https://doi.org/10.28940/TERRA.V38I2.690>
- Rodríguez-López, É. S., Cárdenas-Soriano, E., Hernández-Delgado, S., Gutiérrez-Diez, A., & Mayek-Pérez, N. (2013). Analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. infection of avocado fruits. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(3). <https://doi.org/10.1590/S0100-29452013000300029>
- Rojo-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., & Allende-Molar, R. (2017). Situación actual de *Colletotrichums* spp. en México: Taxonomía,

- caracterización, patogénesis y control. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-9>
- Romero, B., & Granados, E. (2018). *Botrytis, biología del patógeno: la base de un control químico eficiente / Syngenta Ornamentales*. <https://www.syngentaornamentales.co/news/articulo/botrytis-biologia-del-patogeno-la-base-de-un-control-quimico-eficiente>
- Rosales-López, C. (2019). Los bioprocesos en la biotecnología: uso de biorreactores para la producción y el escalamiento de productos de interés comercial. *Revista Tecnología En Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v32i9.4626>
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. Á., Cristóbal-Alejo, J., Valencia-Botín, A., & Reyes-Ramírez, A. (2018). Actividad antagonista de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7). <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i7.877>
- Ruiz-Sánchez, E., Mejía-Bautista, M. A., Cristóbal-Alejo, J., Valencia-Botín, A., & Reyes-Ramírez, A. (2018). Actividad antagonista de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(7), 1325–1332. <https://doi.org/10.29312/remexca.v5i7.877>
- Serrat-Díaz, M., & Mendez-Hernandez, A. A. (2015). Construction and Experimental Validation of a Homemade Stirred Tank Bioreactor for Lab-scale Submerged Fermentations. *Tecnología Química*, 35, 362–375.
- Shi, L. J., Wu, Y. M., Yang, X. Q., Xu, T. T., Yang, S., Wang, X. Y., Yang, Y. Bin, & Ding, Z. T. (2020). The Cocultured *Nigrospora oryzae* and *Collectotrichum gloeosporioides*, *Irpex lacteus*, and the Plant Host *Dendrobium officinale* Bidirectionally Regulate the Production of Phytotoxins by Anti-phytopathogenic Metabolites. *Journal of Natural Products*, 83(5). <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c00036>
- Sierra-García, I. N., Romero-Tabarez, M., & Orduz-Peralta, S. (2012). Determination of the antimicrobial and insecticidal activities in extracts produced by bacteria isolated from soil. In *Actual Biol* (Vol. 34, Issue 96).
- Tauma-Salvador, E. (2023). *Caracterización Morfológica y Genética de aislamientos de Botrytis cinerea en arándanos*. Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Toral-Navarro, L. (2019). *Control biológico de Botrytis por la cepa Bacillus sp. e implicaciones en la producción de plantas de interés agrícola* [Tesis Doctoral Industrial]. Universidad de Granada.
- Trinidad-Ángel, E., Ascencio-Valle, F. de J., Ulloa, O. A., Ramírez-Ramírez, O. C., Ragazzo-Sánchez, J. A., Calderón-Santoyo, M., & Bautista Rosales, P. U. (2017). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp. causante de antracnosis en aguacate de Nayarit, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 19. <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i19.664>
- Valdéz, L., Calero, D., Carballo, M., Capote, M., Gonzáles, I., Álvarez, J., & W, R. (2017). Caracterización Morfológica, Cultural Y Patogénica De Aislados De *Colletotrichum* sp. Produciendo Antracnosis En Mango (*Mangifera Indica* L.). *La Granja*, 26(2), 38–51.
- Vásquez, E., & Millones, C. (2023). Isolation and Identification of Bacteria of Genus *Bacillus* from Composting Urban Solid Waste and Palm Forest in Northern Peru. *Microorganisms*, 11(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030751>

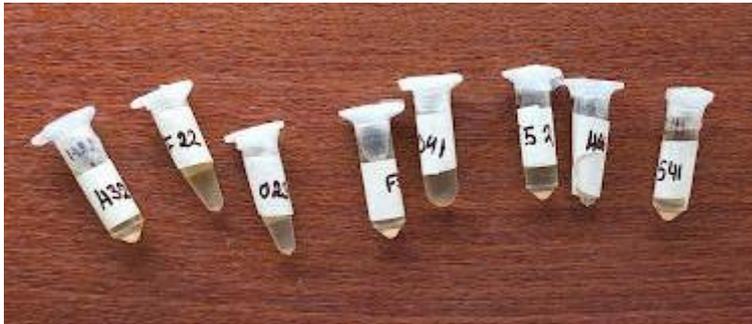
- Veloso, J. S., Duarte, I. G., Farias, O. R. de, & Câmara, M. P. S. (2022). Antracnose do cajueiro: etiologia, sintomatologia e aspectos epidemiológicos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*. <https://doi.org/10.31976/0104-038321v280009>
- Viera-Arroyo, W. F., Tello-Torres, C. M., Martínez-Salinas, A. A., Navia-Santillán, D. F., Medina-Rivera, L. A., Delgado-Párraga, A. G., Perdomo-Quispe, C. E., Pincay-Verdezoto, A. K., Báez-Cevallos, F. J., Vásquez-Castillo, W. A., & Jackson, T. (2020). Control Biológico: Una herramienta para una agricultura sustentable, un punto de vista de sus beneficios en Ecuador. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 8(2), 128–149. <https://doi.org/10.36610/J.JSAB.2020.080200128>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & Santos-Villalobos, S. (2018). The genus *Bacillus* as a biological control agent and its implications in the agricultural biosecurity. *Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1).
- Vinchira-Villarraga, D., & Moreno-Sarmiento, N. (2019). Control biológico: Camino a la agricultura moderna Biological control: Path to modern agriculture. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 21(1).
- Xochilt Zelaya-Molina, L., Fernando Chávez-Díaz, I., de los Santos-Villalobos, S., Iván Cruz-Cárdenas, C., Ruíz-Ramírez, S., & Rojas-Anaya, E. (2022). *Control biológico de plagas en la agricultura mexicana*. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342022000900069
- Yanet-Suárez, L., & Cabrales, C. P. (2016). Identificación de especies de cepas nativas de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. y evaluación de su potencial antagonista in vitro frente al hongo fitopatógeno nativo *Moniliophthora roreri* en el departamento de Norte de Santander. *Respuestas*, 13(1). <https://doi.org/10.22463/0122820x.553>
- Zhang, N., Wang, Z., Shao, J., Xu, Z., Liu, Y., Xun, W., Miao, Y., Shen, Q., & Zhang, R. (2023). Biocontrol mechanisms of *Bacillus*: Improving the efficiency of green agriculture. In *Microbial Biotechnology* (Vol. 16, Issue 12, pp. 2250–2263). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14348>

8 Anexos

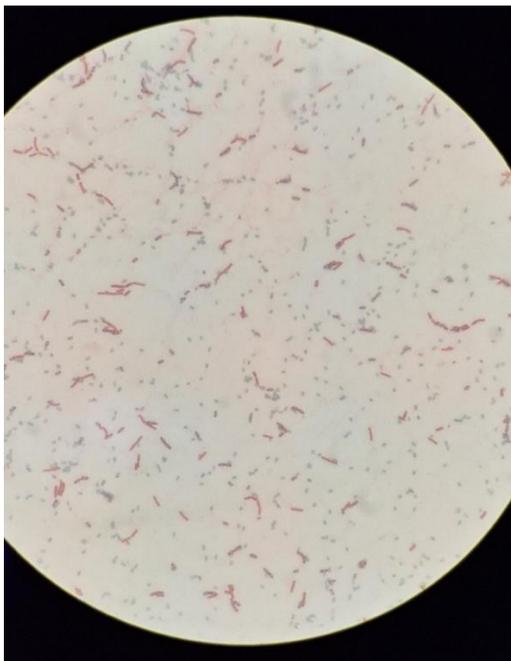
Anexo 1 Observación microscópica de Botrytis sp. Aumento 40x



Anexo 2 Banco cepas de Bacillus sp.



Anexo 3 Tinción de endosporas de la cepa O41



Anexo 4 Observación microscópica de Colletotrichum sp. Aumento 40x.

