



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**

**EVALUACIÓN *in vitro* DE CEPAS DE *Bacillus* spp., PARA EL CONTROL DE
Colletotrichum gloeosporioides Y *Botrytis cinerea***

**Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:
Ingenieras en Biotecnología**

AUTOR: DOMÉNICA ALEJANDRA CEVALLOS AMAGUA

EMA ISABEL RIVERA PAREDES

TUTOR: RAMIRO DANIEL ACURIO VÁSCONEZ

Quito-Ecuador

2026

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, Doménica Alejandra Cevallos Amagua con documento de identificación N° 1726076332 y Ema Isabel Rivera Paredes con documento de identificación N° 1724160526; manifestamos que:

Somos las autoras 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, 18 de febrero del año 2026

Atentamente,



Doménica Alejandra Cevallos Amagua
1726076332



Ema Isabel Rivera Paredes
1724160526

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

Nosotras, Doménica Alejandra Cevallos Amagua con documento de identificación No.1726076332 y Ema Isabel Rivera Paredes con documento de identificación No.1724160526, 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 autoras del Trabajo experimental: “Evaluación *in vitro* de cepas de *Bacillus* spp., para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*”, 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, 18 de febrero del año 2026

Atentamente,



Doménica Alejandra Cevallos Amagua
1726076332



Ema Isabel Rivera Paredes
1724160526

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Ramiro Daniel Acurio Vásconez con documento de identificación N° 1714819495, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: EVALUACIÓN *in vitro* DE CEPAS DE *Bacillus* spp., PARA EL CONTROL DE *Colletotrichum gloeosporioides* Y *Botrytis cinerea* , realizado por Doménica Alejandra Cevallos Amagua con documento de identificación N° 1726076332 y por Ema Isabel Rivera Paredes con documento de identificación N° 1724160526, 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, 18 de febrero del año 2026

Atentamente,



Ing. Ramiro Daniel Acurio Vásconez MSc.

1714819495

Dedicatoria

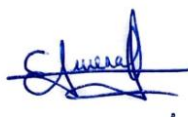
Este trabajo de titulación está dedicado a todos aquellos que me han acompañado a lo largo de mi vida. De manera especial, a mis padres, Fernando Cevallos y Tania Amagua, quienes han sido un pilar fundamental en mi formación personal y profesional, brindándome apoyo y valores en cada etapa de mi camino. A mis hermanas, Samantha Cevallos y Sofía Cevallos, por llenar mi vida de risas y buenos momentos. A mis abuelitos, Francisco Amagua y América Coello, por su amor incondicional y por ser un sostén invaluable. A mis amigos, con quienes compartí tantos momentos, y que, con su compañía, se convirtieron en mi hogar. A quienes ya no están, pero dejaron huellas y grandiosas enseñanzas que me guiaron a lo largo este proceso. Y finalmente, a mi sol, quien me enseñó a querer, a mejorar y a ser una mejor versión de mí misma. A todos, gratitud eterna.



Doménica Alejandra Cevallos Amagua

1726076332

Este trabajo de titulación está dedicado a mis pilares de vida, mis abuelitos Germánico Paredes y Eugenia Márquez, mis padres Mónica Paredes y Miller Rivera, quienes con su amor, apoyo y ejemplo me formaron e hicieron de mí la persona que soy hoy. A mi familia materna, quienes me han cuidado, acompañado y alentado a seguir adelante con la cabeza en alto y sin rendirme. A mi compañera de tesis que se ha convertido en una amiga para toda la vida y me ha enseñado que, pese a las diferencias y malentendidos, somos y seremos un gran equipo. A mi persona especial, con quien tuve la dicha de coincidir y me ha motivado a mejorar y lograr a paso seguro mis objetivos.



Ema Isabel Rivera Paredes

1724160526

Agradecimiento

En primera instancia, extendemos nuestro agradecimiento a la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario – AGROCALIDAD por darnos apertura a sus laboratorios y permitirnos culminar este trabajo de titulación con éxito. A los ingenieros Hernando Regalado y Jairo Guevara del laboratorio de Fitopatología, por su orientación, enseñanzas y tiempo dedicado a esta investigación, al brindarnos la oportunidad de ganar experiencia y conocimientos en el ámbito práctico y teórico de nuestra carrera.

De igual manera, agradecemos al departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana y a todos los docentes quienes nos han impartido sus conocimientos a lo largo de la carrera. Un agradecimiento especial a nuestro tutor de tesis, el MSc. Daniel Acurio, por su guía y dedicación durante todo el proceso y demostrarnos que el conocimiento científico no tiene límite ni fin.

Por último, pero no menos importante, un gracias eterno a nuestras familias por ser la inspiración y el aliento para cumplir esta meta, por enseñarnos que todo se puede lograr y que el éxito se construye día a día. Gracias a todos quienes forman parte de nuestras vidas y quienes dejan un pedacito de sí mismos para nosotras ser lo que hoy y siempre seremos, profesionales en Biotecnología.

Resumen

En el Ecuador, el sector agrícola enfrenta una creciente problemática fitosanitaria causada por los hongos *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*, que ha generado el uso irracional de compuestos químicos y pérdidas económicas en cultivos de *Vitis vinifera* y *Theobroma cacao*. Por tal motivo, el propósito del presente trabajo es evaluar por medio de un ensayo *in-vitro* cepas de *Bacillus* spp. para el control de los hongos fitopatógenos *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*. Para ello, se analizaron cinco cepas del género *Bacillus* (AEC-00215, AEC-00256, AEC-00257, AEC-00258 y AEC-00259) a una concentración de 1×10^7 UFC/mL sobre aislados fúngicos de *Botrytis cinerea* de *Vitis vinifera* y *Colletotrichum gloeosporioides* de *Theobroma cacao*, mediante ensayos de siembra dual con un total de 18 unidades experimentales (UE) para cada hongo. Se consideró el uso de amonio cuaternario al 20 % como control positivo y agua como control negativo. Para ello, se inoculó cada hongo en el centro de una caja Petri que contenía extracto malta agar (EMA) e incubó durante 24 y 48 horas a 28 ± 2 °C, paralelamente, las cepas bacterianas fueron cultivadas en caldo Luria-Bertani (LB) y se incubaron toda la noche a 35 ± 2 °C. Tras 48 y 72 horas de incubación de *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*, las bacterias se dispusieron en forma triangular alrededor del crecimiento micelial. Se midió el radio de crecimiento de los hongos al séptimo día de incubación y se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR). De acuerdo con los análisis estadísticos, se comprobó que las cinco cepas bacterianas inhiben el crecimiento de ambos hongos fitopatógenos, siendo *B. subtilis* (AEC-00258) con el 73,98 % la que presentó la mejor inhibición para *B. cinerea* y *B. amyloliquefaciens* (AEC-00259) con el 69,05 % la más apta para el control de *C. gloeosporioides*. Finalmente, los ensayos demostraron que *Bacillus* spp. es altamente eficaz como agente biocontrolador bajo condiciones de laboratorio, destacando su potencial aplicación para tratamientos preventivos en etapa de precosecha.

Palabras clave: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Bacillus* spp., biocontrolador, *in-vitro*.

Abstract

In Ecuador, the agricultural sector faces an increasing phytosanitary problem caused by the fungi *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides*, which has led to the irrational use of chemical compounds and economic losses in *Vitis vinifera* and *Theobroma cacao* crops. Therefore, the aim of this study was to evaluate, through an *in vitro* assay, *Bacillus* spp. Strains for the control of the phytopathogenic fungi *C. gloeosporioides* and *B. cinerea*. Five strains of the genus *Bacillus* (AEC-00215, AEC-00256, AEC-00257, AEC-00258 and AEC-00259) at a concentration of 1×10^7 CFU/mL were evaluated against fungal isolates of *B. cinerea* from *Vitis vinifera* and *C. gloeosporioides* from *Theobroma cacao* using dual culture assays, with a total of 18 experimental units per fungus. A 20 % quaternary ammonium solution was used as a positive control and water as a negative control. Each fungus was inoculated in the center of Petri dishes containing malt extract agar and incubated for 24 and 48 hours at 28 ± 2 °C, while bacterial strains were cultured in Luria-Bertani broth and incubated overnight at 35 ± 2 °C. After 48 and 72 hours of fungal incubation, bacterial strains were placed in a triangular arrangement around the mycelial growth. Fungal radial growth was measured on the seventh day of incubation, and the percentage of radial growth inhibition was calculated. Statistical analyses confirmed that all five bacterial strains inhibited the growth of both phytopathogenic fungi, with *Bacillus subtilis* (AEC-00258) showing the highest inhibition against *B. cinerea* (73,98 %) and *Bacillus amyloliquefaciens* (AEC-00259) being the most effective against *C. gloeosporioides* (69,05 %). These results demonstrate that *Bacillus* spp. is highly effective as a biocontrol agent under laboratory conditions, highlighting its potential application for preventive treatments during the preharvest stage.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Bacillus* spp., biocontrol agent, *in vitro*.

Índice de contenidos

1	Introducción.....	1
2	Fundamentación teórica.....	5
2.1	Género <i>Bacillus</i>	5
2.1.1	Taxonomía	5
2.1.2	Generalidades del microorganismo.....	5
2.1.2.1	<i>Bacillus pumilus</i>	6
2.1.2.2	<i>Bacillus megaterium</i>	7
2.1.2.3	<i>Bacillus subtilis</i>	7
2.1.2.4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	8
2.1.3	Biotecnología del género	9
2.2	Especies <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	10
2.2.1	Taxonomía	10
2.2.2	Distribución geográfica.....	10
2.2.3	Generalidades de los microorganismos.....	11
2.2.3.1	Especie <i>Botrytis cinerea</i>	11
2.2.3.2	Especie <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	12
2.2.4	Patogenia de ambas especies.....	13
2.2.4.1	<i>Botrytis cinerea</i>	13
2.2.4.2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	14
2.3	Especies <i>Vitis vinifera</i> y <i>Theobroma cacao</i>	16
2.3.1	Taxonomía	16
2.3.2	Distribución geográfica.....	17
2.3.3	Generalidades del cultivo.....	18
2.3.3.1	Cultivo de <i>Vitis vinifera</i>	18
2.3.3.2	Cultivo de <i>Theobroma cacao</i>	18
2.3.4	Mecanismos de control de fitopatógenos.....	19
2.3.4.1	<i>Vitis vinifera</i>	19
2.3.4.2	<i>Theobroma cacao</i>	20
2.4	Pruebas de laboratorio para la identificación de los microorganismos.....	21
2.4.1	Ensayos de caracterización microscópica de hongos y bacterias	21
2.4.1.1	Tinción diferencial de Gram	21
2.4.1.2	Tinción especial de endosporas.....	21
2.4.1.3	Tinción con azul de lactofenol	22
2.4.2	Ensayos metabólicos	22

2.4.2.1	Pruebas bioquímicas y enzimáticas.....	22
2.4.2.2	Perfil metabólico BIOLOG.....	25
2.4.3	Ensayo de antagonismo.....	25
2.4.3.1	Método de inhibición simultánea (Cultivo dual)	26
2.4.3.2	<i>Bacillus</i> spp. frente a cepas fúngicas de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	27
3	Materiales y métodos.....	28
3.1	Ubicación del ensayo	28
3.2	Activación y masificación de cepas bacterianas y aislados fúngicos	28
3.2.1	Cepas bacterianas.....	28
3.2.2	Aislados fúngicos.....	28
3.3	Pruebas de diagnóstico de cepas bacterianas y aislados fúngicos	29
3.3.1	Género <i>Bacillus</i>	29
3.3.1.1	Indicador morfológico.....	29
3.3.1.2	Indicador metabólico.....	30
3.3.2	Especies <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	36
3.3.2.1	Indicador morfológico.....	36
3.3.2.2	Indicador metabólico.....	37
3.3.2.3	Indicador molecular	37
3.4	Pruebas de antagonismo.....	41
3.5	Análisis estadístico.....	43
4	Resultados y discusión.....	45
4.1	Cepas bacterianas.....	45
4.1.1	Indicador morfológico.....	45
4.1.2	Indicador metabólico.....	49
4.2	Aislados fúngicos.....	51
4.2.1	Indicador morfológico.....	51
4.2.1.1	<i>Botrytis cinerea</i>	51
4.2.1.2	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	54
4.2.2	Indicador metabólico BIOLOG	57
4.2.3	Indicador molecular	59
4.2.3.1	Identificación molecular de <i>Botrytis cinerea</i>	59
4.2.3.2	Identificación molecular de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	60
4.3	Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)	61
4.3.1	<i>Bacillus</i> spp. Vs <i>Botrytis cinerea</i>	61
4.3.2	<i>Bacillus</i> spp. Vs <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	65
5	Conclusiones y recomendaciones	69

6	Bibliografía.....	70
7	Anexos	80

Índice de figuras

Figura 1 Ciclo de vida del género <i>Bacillus</i> spp.	6
Figura 2 Mapa de distribución geográfica de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ...	11
Figura 3 Ciclo de vida de <i>Botrytis cinerea</i>	14
Figura 4 Ciclo de vida de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	16
Figura 5 Mapa de distribución geográfica del cultivo de <i>Vitis vinifera</i> y <i>Theobroma cacao</i>	18
Figura 6 Ensayo de interacción antagónica bacteria vs hongo	26
Figura 7 Descomposición del peróxido de hidrógeno por acción de la enzima catalasa.....	34
Figura 8 Representación de viraje de color en discos de prueba de oxidasa	35
Figura 9 Tipos de inoculación para pruebas bioquímicas.....	36
Figura 10 Metodología de ensayo de antagonismo.....	43
Figura 11 Colonias de <i>Bacillus</i> spp.....	47
Figura 12 Tinción de Gram de <i>Bacillus</i> spp.	48
Figura 13 Tinción de endosporas de <i>Bacillus</i> spp.....	49
Figura 14 Resultados patrón de crecimiento macroscópico de la muestra 17-00-34.....	52
Figura 15 Estructuras morfológicas microscópicas de la muestra 17-00-34	54
Figura 16 Resultados patrón de crecimiento macroscópico de la muestra 014-25-00308.....	56
Figura 17 Estructuras morfológicas microscópicas de la muestra 014-25-00308	57
Figura 18 Patrón metabólico del hongo <i>B. cinerea</i>	58
Figura 19 Patrón metabólico del hongo <i>C. gloeosporioides</i>	58
Figura 20 Resultados electroforesis con primers C _{729+/-} y BC _{108+/563-} para muestra 17-00-34.....	60
Figura 21 Resultados electroforesis con primers MKC _{gF/R} para muestra 014-25-00308	61
Figura 22 Resultados aplicación de tratamientos bacterianos frente a <i>B. cinerea</i>	62
Figura 23 Resultados aplicación de tratamientos bacterianos frente a <i>C. gloeosporioides</i>	65

Índice de tablas

Tabla 1 Clasificación taxonómica del género <i>Bacillus</i> spp.	5
Tabla 2 Clasificación taxonómica de la especie <i>Botrytis cinerea</i>	10
Tabla 3 Clasificación taxonómica de la especie <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	10
Tabla 4 Clasificación taxonómica de la especie <i>Vitis vinifera</i>	16
Tabla 5 Clasificación taxonómica de la especie <i>Theobroma cacao</i>	17
Tabla 6 Protocolo de ciclaje para <i>Botrytis cinerea</i> con primers C729+/-.....	39
Tabla 7 Protocolo de ciclaje para <i>Botrytis cinerea</i> con BC108+/BC563-	40
Tabla 8 Protocolo de ciclaje de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	40
Tabla 9 Clasificación del PICR.....	43
Tabla 10 Detalle de tratamientos aplicados	44
Tabla 11 Análisis de Varianza (ANOVA)	44
Tabla 12 Resultados pruebas bioquímicas y enzimáticas	50
Tabla 13 Resultados del análisis estadístico con prueba post hoc de Duncan para <i>B. cinerea</i>	64
Tabla 14 Resultados del análisis estadístico con prueba post hoc de Duncan para <i>C. gloeosporioides</i>	68

Índice de ecuaciones

Ecuación 1 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial26

Índice de anexos

Anexo 1 Convenio específico AGROCALIDAD.....	80
Anexo 2 Características macroscópicas de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	82
Anexo 3 Resultados fotográficos prueba de citrato	82
Anexo 4 Resultados fotográficos prueba catalasa.....	83
Anexo 5 Resultados fotográficos prueba oxidasa	83
Anexo 6 Resultados fotográficos prueba hidrólisis de caseína.....	84
Anexo 7 Resultados fotográficos prueba hidrólisis del almidón	84
Anexo 8 Resultados fotográficos prueba TSI	85
Anexo 9 Resultados fotográficos prueba de crecimiento en NaCl 7 %	85
Anexo 10 Resultados fotográficos prueba de reducción de nitratos.....	85
Anexo 11 Resultados fotográficos de prueba óxido fermentativo	86
Anexo 12 Resultados fotográficos prueba motilidad.....	86
Anexo 13 Resultados fotográficos prueba Voges Proskauer	86
Anexo 14 Resultados BIOLOG <i>B. cinerea</i>	87
Anexo 15 Resultados BIOLOG <i>C. gloeosporioides</i>	87
Anexo 16 Mecanismos de inhibición de cepa AEC-00259	88
Anexo 17 Resultado efecto inhibitorio de cepa AEC-00256.....	88

1 Introducción

El sector agrícola constituye uno de los pilares fundamentales de la economía de los países en vías de desarrollo. En el Ecuador la producción agrícola es una de las principales fuentes de empleo e ingresos no petroleros, de la que depende la mayoría de los ecuatorianos residentes de las zonas rurales. Según estadísticas del año 2025 reportadas por el Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca, este sector aporta con 2,2 millones de plazas de trabajo y contribuye con el 5,56 % al Producto Interno Bruto (PIB) nacional. En los últimos años, la capacidad productiva agrícola ha incrementado notablemente debido a la alta demanda del mercado internacional, lo que ha impulsado una producción más sostenible y competitiva. (Tamayo et al., 2024).

Dentro del sector primario, una de las actividades productivas de mayor importancia es el cultivo agrícola con fines alimentarios (Cedeño & Dilas, 2022; Mendoza et al., 2022). Entre los cultivos más representativos del país se destaca el cacao (*Theobroma cacao*), considerado el segundo producto agroexportador tradicional del Ecuador después del camarón, con una participación del 15,6 % del total de rubros no petroleros generados hasta el mes de octubre del 2025. Por otra parte, cultivos de fruta no tradicionales como la uva, la pitahaya, el babaco y la uvilla contribuyen con el 1,5 % del valor aportado según datos estadísticos del Banco Central del Ecuador (2025).

El cacao también denominado como “Pepa de oro” se distingue por la alta calidad de sus características organolépticas, que lo posicionan como un producto emblemático en el turismo gastronómico. La actividad cacaotera del país, su trascendencia y comercialización señala su protagonismo a lo largo de los años en el marco del mercado internacional, siendo uno de los productos de mayor elección y consumo (Mendoza et al., 2022).

A nivel mundial, el cultivo de uva de mesa (*Vitis vinifera*) representa el 31 % de la producción destinada a la comercialización directa con un alto aporte económico. Aproximadamente, se destinan más de 7,5 millones de hectáreas de cosecha, distribuidas en Europa y Asia con el 60 % y el 20,4 %, respectivamente. En contraste, la producción frutífera del Ecuador aún presenta limitaciones, y el consumo nacional de la uva y sus derivados depende en gran medida de las importaciones de países como Chile, Perú, Estados Unidos y México (Flores & Capa, 2024; Gutiérrez, 2017).

Considerando las condiciones del país para participar y competir en el mercado global con productos de alto valor, el Ecuador busca mantener estándares fitosanitarios óptimos, que aseguren la calidad de sus productos agrícolas de exportación. Sin embargo, en la actualidad existe un aumento en la incidencia de patologías vegetales. El proceso de postcosecha de los frutos dada sus condiciones de almacenamiento propician un ambiente favorable para la proliferación de los agentes patógenos, tal es el caso de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides* (Gañán et al., 2015).

Botrytis cinerea es el agente causal de la enfermedad del moho gris y podredumbre del racimo en la especie *Vitis vinifera*, su presencia implica un daño significativo en la agricultura vitícola ecuatoriana. La enfermedad se caracteriza por afectar a las bayas durante el proceso de cosecha, almacenamiento, tránsito y comercialización, siendo altamente susceptibles a sufrir lesiones cuticulares (Latorre et al., 2015). El control químico es una de las estrategias más empleadas para mitigar las infecciones de *B. cinerea*, no obstante, su uso y aplicación prolongada en las poblaciones de viñedos, ha desencadenado la resistencia en nuevas cepas del fitopatógeno (Elmer & Reglinski, 2006).

Por otro lado, *Colletotrichum gloeosporioides* puede causar pérdidas de hasta el 80% de las plantaciones debido a la enfermedad de la antracnosis, la cual genera el marchitamiento,

la desecación y la muerte de los tejidos vegetales (Arce et al., 2019; Gautam, 2014). La capacidad de control con fungicidas se ha visto mermado debido a la adaptabilidad y a la elevada variabilidad genética del hongo, de manera similar, las estructuras de resistencia se implantan en los surcos de la mazorca, manteniéndose en estado quiescente o de latencia hasta que las condiciones del ambiente y de la fisiología del hospedero le favorezcan para su reactivación (Arce et al., 2019; Zakaria, 2021).

Debido a las repercusiones agroeconómicas consecuentes de las enfermedades de postcosecha inducidas por los hongos cosmopolitas *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*, el sector agrícola ha intensificado el uso de pesticidas de origen sintético, lo cual, implica un alza en los costos de producción, un mayor impacto ambiental en áreas productivas, y riesgos a la salud para la mano de obra rural y los consumidores (Arce et al., 2019).

Por lo cual, se potencia el desarrollo de nuevas estrategias sostenibles y viables, enfocadas al control biológico de fitopatógenos. Precisamente, se ha demostrado por medio de ensayos de interacción microbiana que, al implementar cepas bacterianas del género *Bacillus* spp. estas son capaces de producir compuestos bioactivos como enzimas líticas (proteasas, quitinasas, celulasas), antibióticos y sideróforos. Estos actúan eficientemente en el control natural de organismos patógenos, siendo una opción aceptable para mejorar el manejo fitosanitario de cultivos (Méndez et al., 2018).

En este contexto, el presente trabajo tiene como principal objetivo evaluar bajo condiciones de laboratorio, distintas cepas de *Bacillus* spp. como agentes biocontroladores de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*. Para cumplir tal fin, se consideró aislar e identificar mediante indicadores morfológicos, metabólicos y moleculares, las cepas de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*, de cultivos de *Vitis vinifera* y *Theobroma cacao* respectivamente. De modo que, se formuló la hipótesis respecto a que las cepas de *Bacillus* spp.

tendrán un efecto significativo sobre el porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR), de las cepas fúngicas.

2 Fundamentación teórica

2.1 Género *Bacillus*

2.1.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica del género *Bacillus* spp. se visualiza a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1 Clasificación taxonómica del género *Bacillus* spp.

Clasificación taxonómica	
Dominio	Bacteriae
Filo	Bacillota
Clase	Bacilli
Orden	Caryophanales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i> ; <i>Priestia</i>
Especies	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> ; <i>Bacillus megaterium</i> ; <i>Bacillus pumilus</i> ; <i>Bacillus subtilis</i>

Fuente: (Villarreal et al., 2018)

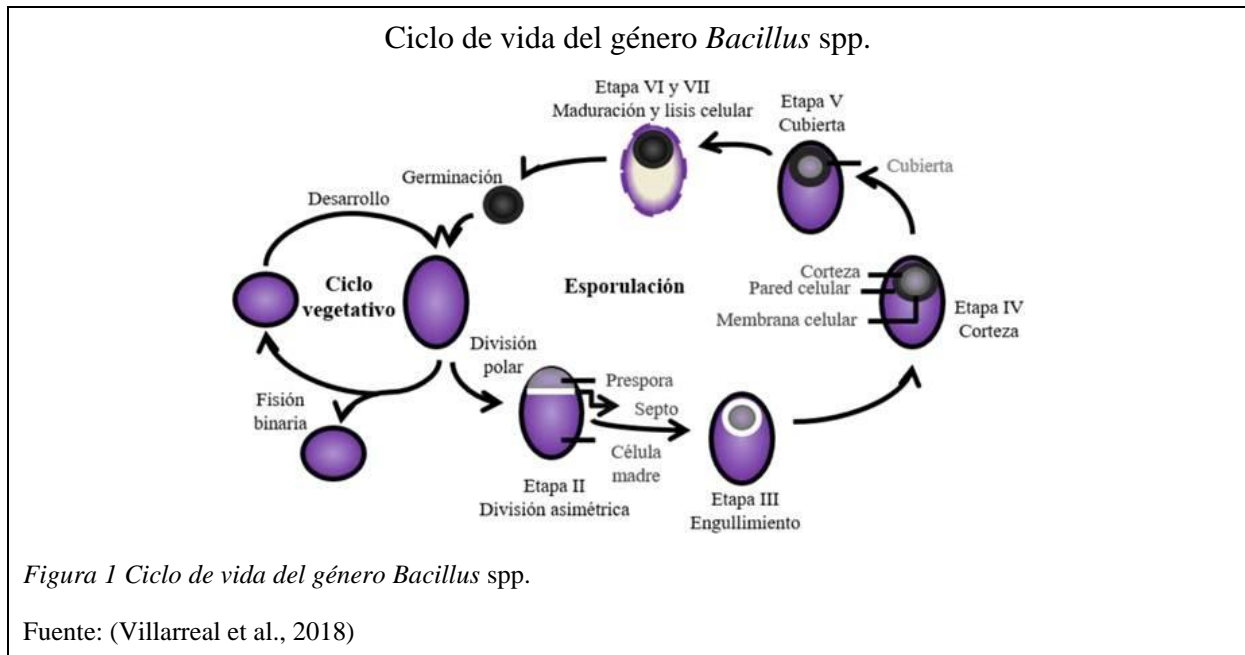
Elaborado por: (Las autoras, 2025)

2.1.2 Generalidades del microorganismo

Las bacterias del género *Bacillus* son microorganismos Gram positivos, que se distinguen por su forma bacilar (bacilo alargado) y por su movilidad flagelar. Una de sus principales características es su capacidad de producir esporas o endosporas como mecanismo de defensa, lo que le permite la propagación y la prevalencia en la naturaleza. Además, se destacan por presentar versatilidades metabólicas, ya que se pueden desarrollar en condiciones aeróbicas o anaeróbicas facultativas. Su crecimiento óptimo ocurre a un pH neutro y dentro de un rango de temperatura entre 30 – 45 °C, esto debido a que la mayoría de las especies son mesófilas (Dobrzyński et al., 2023; Villarreal et al., 2018).

El ciclo de vida de este género (Figura 1) consta de dos fases principales: crecimiento vegetativo y esporulación. Durante la primera etapa la bacteria prolifera exponencialmente por fisión binaria bajo condiciones específicas y la segunda etapa se destaca por presentar

mecanismos de supervivencia a causa de la presencia de factores de estrés, como, cambios de temperatura, pH, carencia de nutrientes. Esto da lugar a la formación de endosporas, estos cuerpos de resistencia permanecen viables por largos períodos de tiempo y germinan nuevamente en respuesta a señales químicas que muestran un medio favorable para el desarrollo vegetativo (González et al., 2022; Villarreal et al., 2018).



2.1.2.1 *Bacillus pumilus*

B. pumilus es una cepa microbiana benéfica de elevada actividad ecológica y biológica. Su presencia e interacción en la naturaleza se ve influenciada por el contenido de Clústeres de Genes Biosintéticos (CGBs) en su genoma, esta ventaja molecular permite la síntesis de metabolitos secundarios como la bacilisina, un dipéptido con actividad antibacteriana. Además, favorece la producción de IAA (Ácido indolacético) una auxina promotora de crecimiento vegetal. Por otro lado, *B. pumilus* tiene también la capacidad de fijar nitrógeno de ambientes terrestres contaminados con metales pesados, de modo que, su aplicación en el contexto

agrícola como agente bioinoculante favorece la obtención de cultivos vegetales inocuos y de alta calidad (De Bashan et al., 2010; Herrera et al., 2020).

2.1.2.2 *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium es un microorganismo de gran interés biotecnológico que ha adquirido relevancia en los últimos años. Se encuentra ampliamente distribuido en suelos agrícolas y se distingue por promover el crecimiento vegetal mediante la interacción con los sistemas radiculares y la rizosfera, lo que estimula directamente el desarrollo de las plantas y la protección contra la toxicidad de metales pesados. Así mismo, se considera una bacteria útil para el control efectivo de diversas enfermedades fitopatógenas, gracias a la producción de metabolitos secundarios como iturina A, surfactina y fengicina (Hur et al., 2024).

Por otra parte, esta cepa microbiana sobresale por su aptitud para la expresión de proteínas recombinantes, ya que tiene características peculiares: no produce endotoxinas asociadas a la membrana externa y no posee proteasas alcalinas que degraden el producto génico recombinante. Por estas razones, *B. megaterium* se ha convertido en una herramienta útil para la producción de enzimas, proteínas y antibióticos enfocados en la industria (Bunk et al., 2010).

2.1.2.3 *Bacillus subtilis*

Bacillus subtilis es una de las especies más representativas del género *Bacillus* spp. por su elevado potencial agrobiotecnológico. En la naturaleza, esta cepa bacteriana exhibe una acción antagonista directa contra organismos fúngicos de alto grado de patogenicidad, esta característica obedece a su capacidad de producir compuestos bioactivos denominados lipopéptidos (LP) y enzimas hidrolíticas capaces de degradar los polisacáridos estructurales de la pared celular de patógenos; de igual manera, induce la resistencia sistémica como mecanismo

de defensa del huésped frente a futuros ataques (Ben Khedher et al., 2015; Ongena & Jacques, 2008).

La importancia de estimular el metabolismo bacteriano de *B. subtilis* en el cultivo *in vitro* para la producción de metabolitos secundarios radica en entender que su patrón de desarrollo está influenciado por factores nutricionales y ambientales (Maget & Peypoux, 1994). Tasaki et al. (2017) hacen referencia a la capacidad de adaptación de *B. subtilis* a diversas condiciones del ambiente y como su morfología y crecimiento dependen de ellas, tal es el caso que, los cambios estructurales macroscópicos varían en función de la consistencia y componentes del medio de cultivo y la naturaleza de las cepas bacterianas (cepa de laboratorio y cepa salvaje); por otro lado, la presencia de oxígeno y las alteraciones en la expresión génica inducidas a nivel de laboratorio, desencadenan la síntesis de compuestos biológicamente activos (Coutte et al., 2010).

2.1.2.4 *Bacillus amyloliquefaciens*

Bacillus amyloliquefaciens es una bacteria aeróbica, que se caracteriza por tener forma de bastón y capacidad de formar esporas ovoides. Habitualmente se encuentra en ambientes naturales como el suelo, el aire y en diferentes alimentos, especialmente en productos lácteos en polvo (Saint-Pierre et al., 2022). Esta especie se distingue por poseer propiedades fisiológicas notables, estabilidad genética y un metabolismo ampliamente adaptable, lo que permite un rápido desarrollo y ciclos de fermentación cortos (72 horas), en comparación con otros cultivos microbianos (Zalila et al., 2023).

En el ámbito agrícola, esta bacteria se ha destacado por su facultad de mejorar la calidad del suelo y promover el crecimiento de los cultivos, ya que contribuye al aumento del contenido de carbono en los compost aplicados. Además, desempeña un papel fundamental en el biocontrol de patógenos de las plantas vasculares, debido a su potencial para reducir la incidencia de enfermedades en diferentes especies. Esto se debe por su habilidad de producir

enzimas, proteínas y metabolitos secundarios, como hidrolasas de almidón, surfactinas, fengicinas, iturinas, celulosa, queratinasas, entre otros, los cuales presentan efectos antagónicos contra fitopatógenos fúngicos y bacterianos (Liang et al., 2024; Zalila et al., 2023).

2.1.3 Biotecnología del género

El género *Bacillus* posee una gran relevancia y se encuentra ampliamente distribuido en varios agrosistemas, tanto acuáticos como terrestres, siendo una de sus principales aplicaciones el control biológico de enfermedades en cultivos vegetales. Una amplia variedad de cepas se distingue por su potencial antagónico frente a diferentes microorganismos fitopatógenos que afectan cultivos como, maíz, arroz y especies frutales. Varias investigaciones han demostrado que especies como *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. amyliquefaciens* y *B. licheniformis* tienen la aptitud de inhibir el desarrollo de enfermedades fitopatógenas (Villarreal et al., 2018).

Por otro lado, el uso indiscriminado de pesticidas, fungicidas e insecticidas ha generado un impacto negativo en el medio ambiente. En este contexto, *Bacillus* spp. ofrece una alternativa sostenible, contribuyendo a la fertilidad del suelo, la disponibilidad de nutrientes y solubilización de compuestos esenciales (Barros et al., 2020). Por ejemplo, *B. thuringiensis* puede sustituir a ciertos pesticidas químicos, al poseer proteínas Cry, responsables de su actividad insecticida frente a lepidópteros, coleópteros y dípteros (Portela et al., 2013).

Además, este género se destaca por la capacidad de sintetizar metabolitos secundarios y compuestos bioactivos, los cuales son fundamentales para la elaboración de productos farmacéuticos, enzimas industriales, bioplástico y antibióticos. A su vez, las especies pueden jugar un rol muy importante en la biorremediación, promoviendo la remoción de contaminantes en suelo y agua, y promoviendo métodos alternativos que sustituyan a los convencionales (Kanazawa, 2024).

2.2 Especies *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*

2.2.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica de ambas especies se presenta en las Tabla 2 y Tabla 3.

Tabla 2 Clasificación taxonómica de la especie *Botrytis cinerea*

Clasificación taxonómica	
Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Leotiomycetes
Orden	Helotiales
Familia	Sclerotiniaceae
Género	<i>Botrytis</i>
Especie	<i>Botrytis cinerea</i>

Fuente: (Fekrikohan et al., 2024)

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Tabla 3 Clasificación taxonómica de la especie *Colletotrichum gloeosporioides*

Clasificación taxonómica	
Dominio	Eukaryota
Reino	Fungi
Filo	Ascomycota
Clase	Sordariomycetes
Orden	Glomerellales
Familia	Glomerellaceae
Género	<i>Colletotrichum</i>
Especie	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>

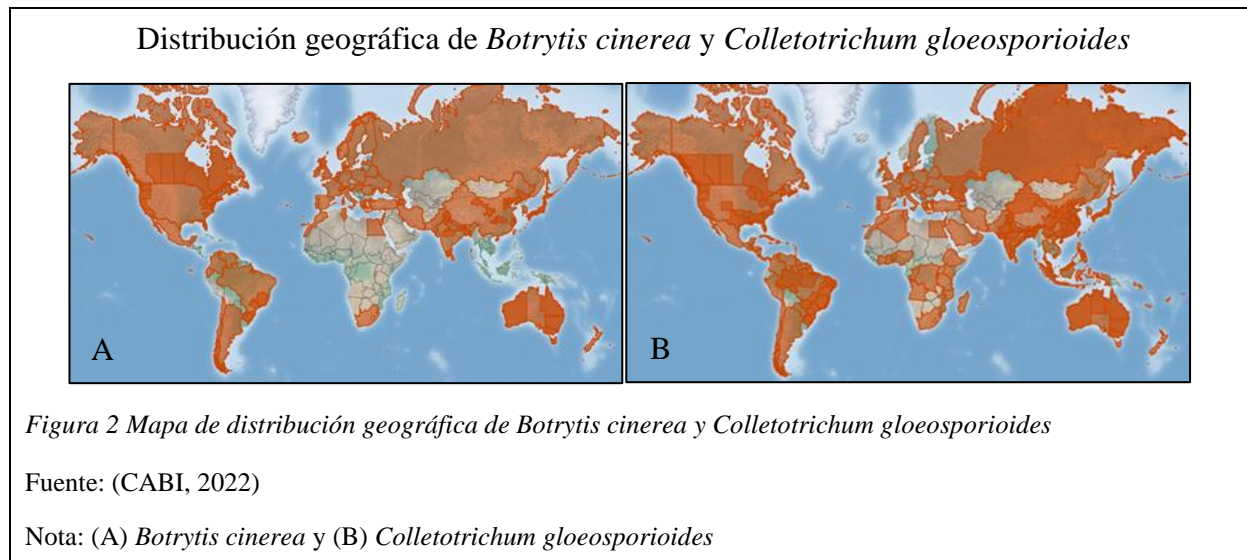
Fuente: (GBIF, 2023)

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

2.2.2 Distribución geográfica

Botrytis cinerea se distribuye mayoritariamente en América del Norte y América del sur, así mismo presenta una alta incidencia en regiones agrícolas de Europa, Asia Oriental y Oceanía como se observa en la Figura 2. En campo el patógeno prefiere zonas con alta humedad relativa y temperatura templadas (Schumacher, 2017).

Por otra parte, *Colletotrichum gloeosporioides* es un hongo de distribución mundial, mayoritariamente concentrado en el América Latina desde Argentina hasta el Norte de Canadá, seguido por Asia, Europa, África y Oceanía. Presente en zonas de climas cálidos y tropicales (Zakaria, 2021).



2.2.3 Generalidades de los microorganismos

2.2.3.1 Especie *Botrytis cinerea*

B. cinerea es un hongo fitopatógeno saprófito responsable de la enfermedad denominada “moho gris”, la cual afecta significativamente a una amplia variedad de cultivos agrícolas de importancia económica a nivel mundial. Este hongo se destaca por ser un patógeno generalista, debido a que es capaz de infectar a más de 200 especies vegetales tales como, hortalizas, plantas frutales, entre otras. Su alta adaptabilidad y rápida reproducción le ha permitido desarrollar resistencia a fungicidas, por lo que, se considera uno de los patógenos con más relevancia en la actualidad (Cheung et al., 2020).

Desde el punto de vista morfológico, este fitopatógeno presenta características macroscópicas y microscópicas distintivas. *Botrytis cinerea* desarrolla inicialmente un micelio aéreo de color blanco que al madurar se tornan en un color gris pálido, de textura algodonosa y esponjosa (Abbey et al., 2024). Por otro lado, según Pei et al., (2019) los cultivos fúngicos

producidos en PDA (Dextrosa Papa Agar), presentan conidióforos que se caracterizan por ser de color pardo, con longitudes de 520 a 2250 μm x 6 a 18 μm . Estas estructuras producen ramificaciones apicales de los cuales se originan conidios que son unicelulares, de color pardo y con forma ovoide con longitudes de 6,75 a 13.5 μm x 3,9 a 6,1 μm .

2.2.3.2 Especie *Colletotrichum gloeosporioides*

Colletotrichum es el único género descrito dentro de la familia Glomerellaceae con más de 200 especies reconocidas, de las cuales, el complejo *C. gloeosporioides* es considerado como el principal responsable de la enfermedad de la antracnosis (Talhinhas & Baroncelli, 2021; Zakaria, 2021). Este patógeno se caracteriza por ser una especie polífaga capaz de infectar alrededor de 470 especies vegetales, desde árboles hasta gramíneas, provocando el marchitamiento y la muerte de los tejidos vegetales; cabe recalcar que, la enfermedad se manifiesta con la formación de manchas circulares y oscuras de tamaño variable en los órganos aéreos de la planta, más el ablandamiento y pudrición en los frutos (Gautam, 2014; Reboledo et al., 2015).

Partiendo de las características biológicas del hongo, Gautam (2014) menciona que se identifican dos estados reproductivos que lo definen taxonómica y morfológicamente. En primera instancia, se encuentra la fase anamórfica imperfecta o asexual, de la que se obtienen conidios como estructuras reproductivas de *Colletotrichum gloeosporioides*; por el contrario, la fase teleomórfica perfecta o sexual, pertenece a *Glomerella cingulata* hongo heterotálico que da origen a estructuras fusiformes llamadas ascosporas (Solís & Zamarripa, 2013; Talhinhas & Baroncelli, 2021).

El patrón morfológico del cultivo *in vitro* de *C. gloeosporioides*, a nivel macro y microscópico difiere entre sí según el hospedero, el medio de cultivo empleado y las condiciones de cultivo. De forma general, el hongo alcanza su óptimo desarrollo a una

temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ en ciclos de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, favoreciendo la aparición de micelio aéreo algodonoso, circular y crateriforme de coloración grisácea o rosada, de igual manera, presenta masas anaranjadas de textura mucoide que se forman debido a la acumulación de esporas en condiciones de alta humedad. Por otro lado, los acérvulos, son estructuras de fructificación que contienen conidios unicelulares, hialinos y cilíndricos de 20 μm de longitud y de 5 a 7 μm de ancho, responsables de la formación del apresorio durante la fase de inoculación (Gautam, 2014). Ver Anexo 2.

2.2.4 Patogenia de ambas especies

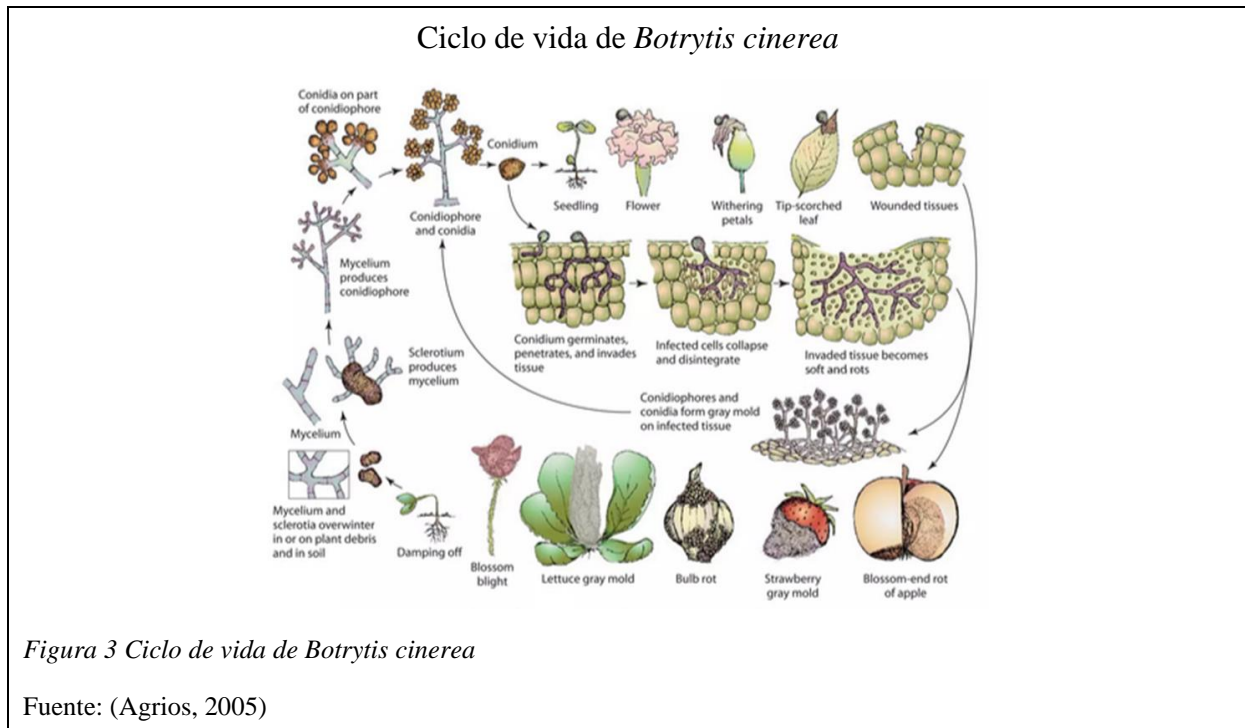
2.2.4.1 *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea puede afectar a una amplia variedad de cultivos, dañando hojas, tallos, flores y frutos. La infección comienza desde tejidos lesionados o fisuras naturales, lo que permite una rápida extensión de la enfermedad. En etapas iniciales, el tejido infectado no causa afecciones visibles, sin embargo, la proliferación masiva de conidios causa una acelerada propagación de esta. Durante el ciclo de infección, el fitopatógeno se comporta como biotrofo por un intervalo corto de tiempo y posteriormente adopta una conducta necrotrófica agresiva, lo que induce a cambios bioquímicos como, aumento de compuestos volátiles, azúcares y nitrógeno contenido en los tejidos en maduración (Cheung et al., 2020; Terrones et al., 2019).

Durante la propagación de la infección, el hongo despliega factores de virulencia como, ácido oxálico (OA), enzimas degradadoras y fitohormonas análogas que alteran el metabolismo, el sistema inmunológico y estructura celular del hospedero. A su vez, el rápido desarrollo de micelio en la superficie de las plantas posibilita la infección en tejidos, permitiendo mayor expansión de la enfermedad a toda la planta y a plantas vecinas (Cheung et al., 2020).

Su mecanismo de acción permite obtener una alta tasa de efectividad infectiva debido a su ciclo de vida, alta reproducción y probabilidad de sobrevivencia por períodos prolongados. Principalmente se propaga por vía aérea, mediante esporas de conidios asexuales provenientes

de conidióforos maduros, así mismo, el micelio de esclerocios o semillas sirven como fuente de inóculo (Figura 3). De igual manera, en condiciones específicas el hongo puede desarrollar un ciclo sexual heterotálico, en el cual los esclerocios originan apotecios que liberan ascosporas tras la fertilización de microconidios como una clase de apareamiento opuesto; sin embargo, esta fase es poco común en la naturaleza (Cheung et al., 2020).



A su vez, cabe mencionar que habitualmente la infección se produce en campo, permaneciendo quiescente o latente, por lo que, existe una reactivación de esta durante el almacenamiento, transporte o mercado de las especies vegetales, ocasionando pérdidas relevantes a nivel económico (Terrones et al., 2019).

2.2.4.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

El desarrollo de enfermedades causadas por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* está influenciado por condiciones ambientales como la humedad relativa, la temperatura, el estado de las estructuras vegetativas, al igual que, la variabilidad genética del fitopatógeno, de tal manera que se incrementa la interacción huésped – patógeno (Zakaria, 2021). La

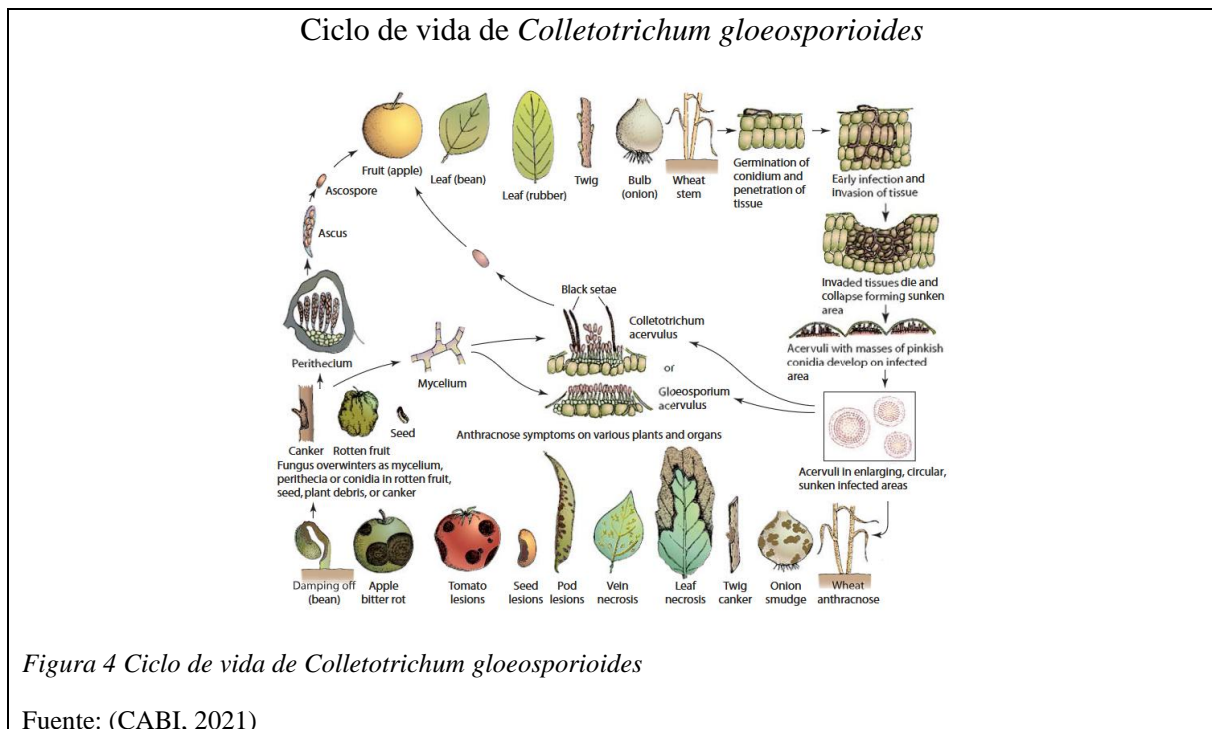
complejidad a nivel de genes de *C. gloeosporioides* define la relación de compatibilidad y comportamiento que mantiene con sus hospederos. Cannon et al. (2012) mencionan que una cepa patógena se convierte a endófito por la alteración de un gen de patogenicidad, modificando su mecanismo de acción en el huésped, volviéndolo menos susceptible a la infección de otras cepas.

Durante la fase de inoculación los conidios de *Colletotrichum gloeosporioides* diseminados en el ambiente por acción del viento y salpicaduras de lluvia, se adhieren a las estructuras vegetativas de la planta por medio de interacciones hidrofóbicas. Como consecuencia de la germinación de los conidios, se lleva a cabo un proceso de penetración directa a través de una estructura especializada denominada apresorio, el cual cuenta con clavijas de penetración que le otorga al hongo la capacidad de atravesar la cutícula y la epidermis para inducir una infección sistémica. De igual manera, en casos particulares, el hongo penetra por medio de orificios naturales o heridas en tejidos vegetales afectados (Gautam, 2014; Reboledo et al., 2015).

Durante el proceso de colonización, existen dos estrategias de infección, una general en la que se lleva a cabo una invasión intramural subcuticular, la cual consiste en el desarrollo de hifas bajo la cutícula y su extensión por toda la planta ocasionando una alteración a nivel de estructuras morfoanatómicas con engrosamientos y degradaciones de tejido. Mientras que otra es una invasión intracelular, cuya tendencia es específica de *Colletotrichum gloeosporioides*, donde las células epidérmicas son colonizadas a manera que se estimula la formación de una hifa primaria para posterior desarrollo de hifas necrotróficas secundarias, manifestando sintomatología visible en la zona afectada (Gautam, 2014; Wharton & Diéguez, 2004).

Por último, en la fase de reproducción se forman pequeñas estructuras conocidas como acérvulos, los cuales se encuentran rodeados por setas alargadas, y en su interior contienen

conidióforos cortos capaces de liberar y dispersar las esporas asexuales (conidios) al medio por estímulos externos y factores biológicos (Sharma & Kulshrestha, 2015). Ver Figura 4.



2.3 Especies *Vitis vinifera* y *Theobroma cacao*

2.3.1 Taxonomía

La clasificación taxonómica de las especies *Vitis vinifera* y *Theobroma cacao* se visualiza en la Tabla 4 y Tabla 5 respectivamente.

Tabla 4 Clasificación taxonómica de la especie *Vitis vinifera*

Clasificación taxonómica	
Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Vitales
Familia	Vitaceae
Género	<i>Vitis</i>
Especie	<i>Vitis vinifera</i>

Fuente: (Parihar & Sharma, 2021)

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Tabla 5 Clasificación taxonómica de la especie *Theobroma cacao*

Clasificación taxonómica	
Dominio	Eukaryota
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Género	<i>Theobroma</i>
Especie	<i>Theobroma cacao</i>

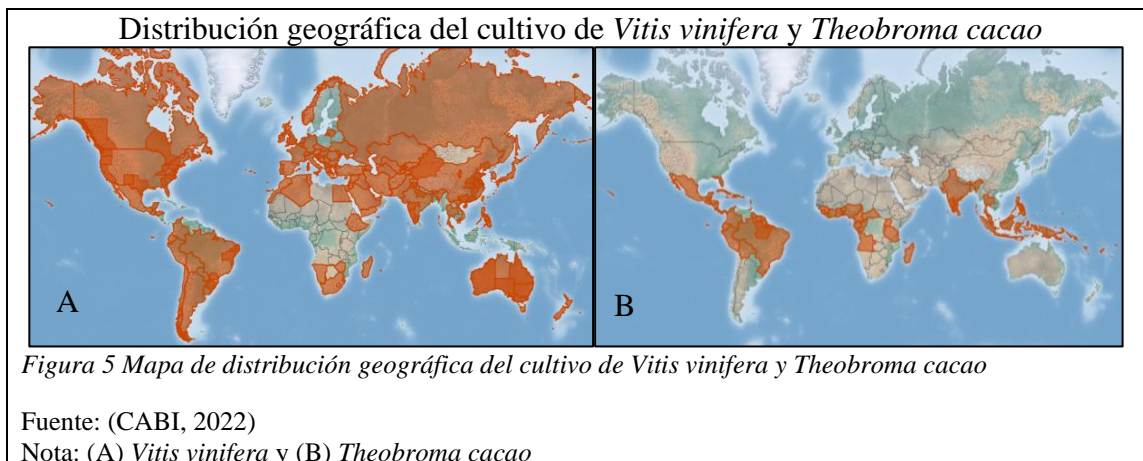
Fuente: (Trópicos, 2025)

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

2.3.2 Distribución geográfica

Actualmente *Vitis vinifera* se cultiva en más de 70 países, incluyendo China, India, Irán, Turquía, Brasil, México, Sudáfrica, Chile, Argentina, Estados Unidos y otros países pertenecientes al Mediterráneo europeo, como Francia, Italia y España (Parihar & Sharma, 2021). En el Ecuador, los cultivos de vid se encuentran distribuidos en diferentes provincias que presentan condiciones adecuadas para su desarrollo, entre ellas Pichincha, Bolívar, Tungurahua, Cañar (Azogues) e Imbabura (Ibarra) (Santander et al., 2022).

La distribución inicial de la especie *Theobroma cacao* se extiende desde América del Sur, tomando en cuenta a países como Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Brasil, Mesoamérica hasta África (occidental y central) y Asia. A nivel nacional, el cultivo de cacao se produce en 21 provincias de las cuales las más representativas son Los Ríos, Manabí, Guayas y Esmeraldas; cabe señalar que el Ecuador en el mundo es uno de los mayores productores aparte de Costa de Marfil, Ghana, Camerún, Nigeria, Indonesia y Brasil (Cedeño & Dilas, 2022; Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, 2018). Ver Figura 5.



2.3.3 Generalidades del cultivo

2.3.3.1 Cultivo de *Vitis vinifera*

Vitis vinifera (vid) pertenece a la familia Vitaceae y constituye al 90 % de las especies del género *Vitis* a nivel global. Su centro de origen se ubica en Asia occidental y el sur de Europa, regiones donde los países productores alcanzan una producción de más de 65 millones toneladas de uvas al año. Esta planta presenta una amplia diversidad de variedades del fruto (variedad morfológica): con y sin semillas, de tonalidades rojos, negros y blancos (Parihar & Sharma, 2021).

La vid se considera uno de los cultivos frutales más relevantes del mundo, con una superficie de cultivo de 7,9 millones de hectáreas y un alto valor económico (Torregrosa et al., 2015). Su aprovechamiento es amplio, aunque su principal destino es la producción de vinos de calidad, alrededor del 71 % se destina a mercados para su consumo fresco, el 25 % se utiliza para la elaboración de vinos, jugos y concentrados, y cerca del 4 % se comercializa como fruto seco.

2.3.3.2 Cultivo de *Theobroma cacao*

El cacao *Theobroma cacao* es un árbol de clima cálido y húmedo proveniente de la región neotropical, el cual, tiene protagonismo mundial por la calidad de su fruto o mazorca

para la elaboración de chocolates refinados y subproductos de valor nutricional (Plasencia et al., 2022; Tigselema et al., 2018).

En el Ecuador sobresalen dos variedades de cacao que posicionan al país como productor de alta gama en el mercado internacional. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (2022) atribuye al cacao Nacional Arriba (fino) el 60 % de la producción mundial, debido a que su cultivo maneja procesos de fermentación superior y el fruto conserva sofisticadas cualidades organolépticas, por otro lado, la variedad importada CCN51 o Colección Castro Naranjal (corriente u ordinaria) presenta un mejor rendimiento de producción (León et al., 2016). Según datos del INEC & ESPAC (2025) se destinaron 612.453 hectáreas para el cultivo de cacao, lo que representa el 42,7 % de la superficie total plantada con una producción de 403.699 toneladas obteniendo un rendimiento del 0,75 (t/ha).

2.3.4 Mecanismos de control de fitopatógenos

2.3.4.1 *Vitis vinifera*

La vid (*Vitis vinifera*) es una especie vegetal de gran relevancia económica que puede ser afectada por diversas plagas y enfermedades, las cuales ocasionan pérdidas significativas en la producción y calidad del fruto. Entre las principales patologías destacan el mildiu veloso causado por *Plasmopara viticola*; el mildiu polvoriento originado por *Erysiphe necator*; el moho gris inducido por *Botrytis cinerea* la podredumbre negra producida por *Phyllosticta ampellicida*. Las cuales han sido controladas por décadas por pesticidas químicos sintéticos que generan impactos en el medio ambiente (Pertot et al., 2017).

Al estar expuesta diferentes tipos de patógenos, *V. vinifera* activa diferentes mecanismos de defensa, regulados por vías de señalización hormonal, destacándose el ácido jasmónico (AJ), el etileno (ET) y el ácido salicílico (AS). Las rutas mediadas por el AJ y el ET están asociadas a la defensa contra patógenos necrotróficos, ya que promueven la síntesis de enzimas líticas que degradan la pared celular del patógeno. Por otro lado, el AS se relaciona con la respuesta

contra de patógenos biotróficos, favoreciendo la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) consiguiendo la muerte celular programada en tejidos infectados (Armijo et al., 2016).

Como se ha mencionado, el control químico ha sido el principal método de control de la vida, lo cual conlleva al desarrollo de resistencia de los patógenos a los fungicidas y pesticidas. Por ello, resulta indispensable implementar métodos alternativos basados en el uso de agentes de control biológico (León et al., 2024). Los cuales contribuyen a la biosupresión de patógenos, mejoran la nutrición, el desarrollo del cultivo, y aumenta la producción al reducir residuos tóxicos (Gutiérrez, 2017).

2.3.4.2 *Theobroma cacao*

La afectación de cultivos de cacao ha incrementado en los últimos años debido al emergente desarrollo de enfermedades de origen fitopatológico. En base a la información recopilada por Moreira et al. (2021) los principales patógenos de importancia agroeconómica son: *Phytophthora megakarya* y *P. palmivora* con la pudrición negra de la mazorca, *Moniliophthora perniciosa* provocando la enfermedad de la escoba de bruja, *M. roreri* con la moniliasis y *Colletotrichum gloeosporioides* con la antracnosis. Enfermedades que se caracterizan por comprometer la integridad de los órganos aéreos de la planta, generando pérdidas de producción mayores al 80 % (Torres et al., 2025).

Para el manejo fitosanitario de los cultivos de *T. cacao*, Moreira et al. (2021) establecen ciertas estrategias de control para su aplicación en campo. Uno de los métodos implementados de manera recurrente en la agricultura, es el uso de agentes químicos, sin embargo, a lo largo de los años se ha demostrado la pérdida de efectividad por la resistencia microbiana; por tal motivo, como nueva alternativa se considera el empleo de elicitores exógenos como el benzotiadiazol acibenzolar-S-metil (ASM) que activan proteínas asociadas a la patogénesis (PR) en el huésped, en particular, la PR-2 (β -1,3-glucanasa), PR-3 (Quitinasa) y PR-9 (Peroxidasa) sustancias responsables de desencadenar la resistencia sistémica adquirida (RSA)

(Gupta et al., 2013; Resende et al., 2002). Asimismo, existen controles culturales que interfieren con procesos biológicos del patógeno, físicos que emplean temperatura, biológicos con organismos antagónicos y botánicos mediante el uso de extractos vegetales (Moreira et al., 2021).

2.4 Pruebas de laboratorio para la identificación de los microorganismos

2.4.1 Ensayos de caracterización microscópica de hongos y bacterias

La tinción y observación microscópica constituyen técnicas microbiológicas clásicas que sirven como base para el estudio y la identificación de una amplia variedad de microorganismos. La aplicación de estas técnicas resulta útil para obtener una caracterización fenotípica general de organismos fúngicos y bacterianos, sobre todo de las estructuras morfológicas que los componen y diferencian. A continuación, se detalla información general sobre las tinciones aplicadas para la visualización de las cepas *Bacillus* spp. y los aislados fúngicos de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides* mediante un microscopio óptico compuesto.

2.4.1.1 Tinción diferencial de Gram

La tinción de Gram fue descrita por primera vez en 1884 por el bacteriólogo danés Hans Christian Gram, quien estableció la clasificación de las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, las cuales presentan diferencias estructurales a nivel de la pared celular. Con respecto al principio de la tinción de Gram, este se basa en la distinción de las bacterias en etapa de crecimiento mediante la aplicación de colorantes básicos, agentes fijadores y decolorantes que permiten la visualización de las células bacterianas en función de la cantidad de peptidoglicano, además de la forma y agrupación (Tortora et al., 2017).

2.4.1.2 Tinción especial de endosporas

La tinción de endosporas también denominada tinción de Schaeffer-Fulton, es considerada un método poco convencional de coloración y aislamiento de estructuras especializadas, como es el caso de las endosporas, las cuales son cuerpos esféricos de resistencia

en estado latente capaces de mantener la viabilidad celular bajo condiciones atmosféricas adversas. Por ende, el principio de esta técnica de tinción es el reconocimiento de bacterias esporulantes como resultado de la internalización del verde de malaquita, el calor y la contratinción con safranina en la célula (Tortora et al., 2017).

2.4.1.3 Tinción con azul de lactofenol

La tinción con azul de lactofenol es un método clásico y directo aplicado para impregnar color a las estructuras fúngicas, de tal manera que mantiene la integridad de los componentes facilitando su observación bajo el microscopio. Concretamente, las características tintoriales del reactivo inducen a la inactivación de enzimas causantes de la lisis celular, protegiendo las características morfológicas durante el proceso de improntas (González et al., 2020).

2.4.2 Ensayos metabólicos

2.4.2.1 Pruebas bioquímicas y enzimáticas

2.4.2.1.1 Prueba del citrato

La prueba del citrato facilita la identificación de organismos bacterianos capaces de descomponer la única fuente de carbono (citrato) del medio en oxalacetato y piruvato, mediante la acción de la enzima citrato permeasa en el ciclo del ácido tricarboxílico. La obtención de piruvato da como resultado la producción de sustancias alcalinas que por medio del indicador de pH se lleva a cabo el viraje de color de verde a azul (MacFaddin, 2004).

2.4.2.1.2 Prueba de TSI

La prueba TSI (Triple Sugar Iron Agar) permite diferenciar microorganismos según la habilidad para fermentar carbohidratos tales como glucosa, lactosa y sacarosa, además de su capacidad de producir gas y/o generar sulfuro de hidrógeno (H₂S). Este medio contiene indicadores de pH y sulfuro ferroso, que evidencian las reacciones metabólicas según el cambio

de color: amarillo indica fermentación ácida, rojo indica reacción alcalina y negro producción de H₂S (Leboffe & Pierce, 2010).

2.4.2.1.3 Prueba de crecimiento 7% NaCl

La prueba del 7% de salinidad con NaCl, tiene como objetivo distinguir la presencia de organismos halófilos, su tolerancia y dinámica de crecimiento frente a concentraciones elevadas de iones de sodio (Na⁺) (Saavedra et al., 2024).

2.4.2.1.4 Prueba de hidrólisis de almidón

La prueba de hidrólisis de almidón determina si un microorganismo produce la enzima α -amilasa, la cual degrada azúcares simples como maltosa o glucosa. Tras la incubación se añade yodo al medio: si el almidón permanece intacto el área se torna de color negra, caso contrario un halo claro alrededor del crecimiento indica que el almidón fue hidrolizado, por lo tanto, el microorganismo sintetiza α -amilasa (Miłek & Lamkiewicz, 2022).

2.4.2.1.5 Prueba de hidrólisis de caseína

La prueba de hidrólisis de caseína identifica microorganismos capaces de producir la enzima caseasa, responsable de degradar la caseína. Estas bacterias secretan exoenzimas que catalizan la hidrólisis de la caseína en péptidos o aminoácidos aprovechables como fuente de nitrógeno. En el medio Milk Agar la acción enzimática se observa por la formación de un halo claro alrededor del crecimiento microbiano, indicando hidrólisis positiva, mientras las cepas no productoras conservan el color opaco del medio (Leboffe & Pierce, 2010).

2.4.2.1.6 Prueba de reducción de nitratos

La prueba de reducción de nitratos determina si una bacteria puede utilizar el nitrato (NO₃⁻) como aceptor final de electrones en condiciones anaerobias, transformándolo en nitritos (NO₂⁻), mediante la enzima nitrato reductasa. La reacción se evidencia por cambios de color o formación de gas en el medio. Consta de dos fases, la primera emplea dos reactivos (α -naftilamina 0,5 % y ácido sulfanílico 0,8 %) promoviendo un viraje de color de amarillo a rojo,

lo que indica la reducción de nitrito, mientras que, la ausencia de este color tras añadir zinc confirma una reducción completa (fase 2) (Leboffe & Pierce, 2010).

2.4.2.1.7 Prueba de Voges Proskauer

La prueba de Voges Proskauer permite reconocer la presencia de microorganismos productores de acetoina, compuesto resultante de la fermentación de la glucosa a través de la ruta de Embden Meyerhof. Para interpretar los resultados, es necesario la adición de los reactivos de Barrit (α -naftol + KOH 40 %) promotores de la oxidación de la acetoina a diacetilo dando una coloración rosada en la superficie del medio (MacFaddin, 2004).

2.4.2.1.8 Prueba óxido fermentativa de Hugh y Leifson

La prueba de Oxidación/Fermentación tiene como principio la identificación del metabolismo de las bacterias aerobias estrictas y anaerobias facultativas en un medio compuesto por uno hidrato de carbono (dextrosa) el cual se convierte en ácido pirúvico; en un proceso fermentativo el medio del ensayo con y sin parafina cambia de verde a amarillo, mientras que, en la respiración, únicamente el tubo sin parafina cambia de color (MacFaddin, 2004).

2.4.2.1.9 Prueba de motilidad

La prueba de motilidad permite verificar si la cepa bacteriana es móvil o inmóvil a través de la presencia estructuras de locomoción denominadas flagelos. Para ello, se emplea un medio semisólido con sales de tetrazolio, que manifiesta el crecimiento del microorganismo por medio de la extensión a lo largo de la línea de siembra, acompañado por la aparición de color rosado. En caso de bacterias inmóviles el crecimiento se limita a la línea de punción (MacFaddin, 2004).

2.4.2.1.10 Prueba catalasa

La prueba de la catalasa resulta útil para detectar la presencia de la enzima catalasa, capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno o agua oxigenada (H_2O_2) en dos moléculas de agua y un átomo de oxígeno molecular. La presencia de la enzima es verificable mediante la formación de burbujas (Granados & Villaverde, 1997).

2.4.2.1.11 Prueba oxidasa

La prueba de la oxidasa es un tipo de test enzimático que se fundamenta en la detección de la enzima citocromo oxidasa en microorganismos aerobios. Esta enzima participa en la transferencia de electrones desde un sustrato inorgánico hacia el oxígeno en la cadena respiratoria; para confirmar la presencia de la enzima, se agrega el reactivo de Kovacs y se produce un marcaje de color violeta (Granados & Villaverde, 1997).

2.4.2.2 Perfil metabólico BIOLOG

El ensayo BIOLOG permite determinar el perfil metabólico de hongos filamentosos mediante la Microplaca FF MicroPlate, la cual contiene una alta gama de sustratos y ensayos de sensibilidad química. El principio del método se basa en la comparación de valores de absorbancia obtenidos con índices de lecturas de referencia de especies almacenados en el software en el sistema. Durante el proceso los valores de absorbancia reflejan la actividad respiratoria del microorganismo, evidenciada por cambios de color debidos a un indicador redox o por incremento de turbidez por el crecimiento fúngico (BIOLOG, 2010).

Este análisis requiere aislados fúngicos puros, a partir de los cuales se prepara una suspensión de inoculación que se dispensa en los pocillos de la microplaca. Posteriormente, la placa se incuba durante el período de 1 a 10 días por 26 ± 2 °C, y los resultados se interpretan mediante el software del sistema de identificación microbiana BIOLOG (BIOLOG, 2010).

2.4.3 Ensayo de antagonismo

Los ensayos de antagonismo microbianos son técnicas experimentales utilizados para evaluar la capacidad de un microorganismo de inhibir el crecimiento de otro, a través de la producción de compuestos antimicrobianos, competencia por nutrientes o secreción de enzimas líticas. Estas pruebas se fundamentan principalmente en métodos de difusión en agar (medio de cultivo), donde los metabolitos secundarios producidos por la cepa antagonista se difunden en

el medio, generando zonas claras de inhibición alrededor del crecimiento microbiano sensible (Balouiri et al., 2016).

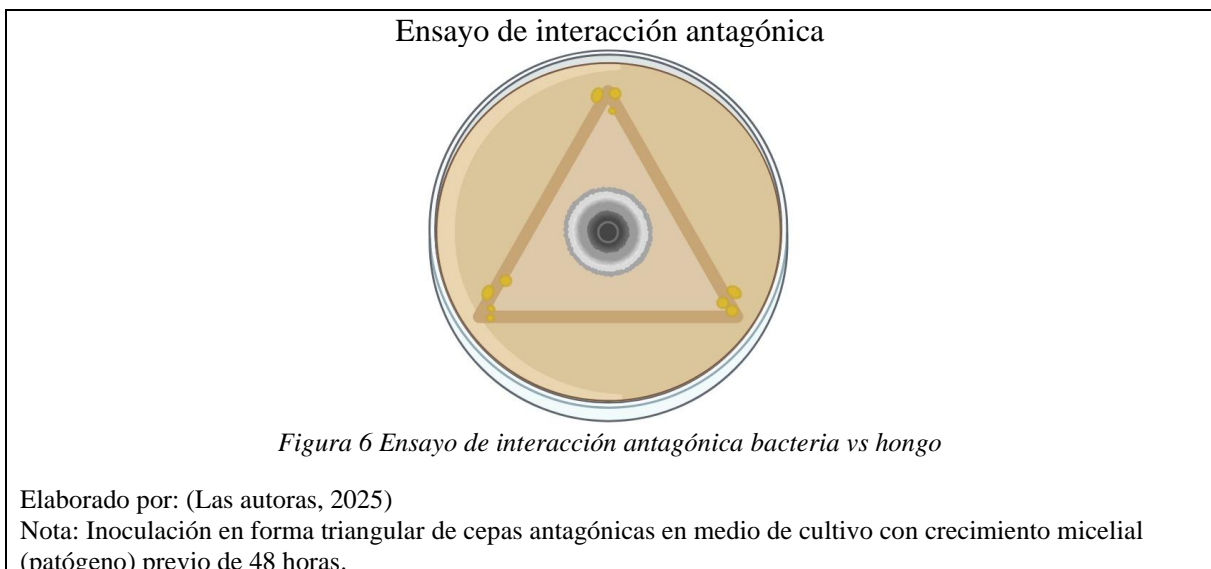
2.4.3.1 Método de inhibición simultánea (Cultivo dual)

En esta técnica, las cepas productoras (antagónicas) y sensibles (patógenas) se siembran de manera simultánea en el mismo medio sólido a una distancia determinada de 2 a 3 cm entre inóculo. Después de la incubación, la presencia de zonas de inhibición alrededor del antagonista confirma su efecto inhibidor (antagonismo directo), resultado de competencia, secreción antagónica o exclusión competitiva (Molina et al., 2020). El porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) se calcula con la siguiente fórmula:

$$\%Inhibición = \frac{(R1 - R2)}{R1} \times 100$$

Ecuación 1 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial

Donde: R1 = radio de crecimiento del hongo en el control (sin antagonista); R2 = radio del crecimiento del hongo en presencia del microorganismo antagonista.



2.4.3.2 *Bacillus* spp. frente a cepas fúngicas de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*

Las especies de *Bacillus* spp. se encuentran entre los agentes de control biológico más estudiados, ya que presentan propiedades antagónicas derivadas de la producción de antibióticos, enzimas hidrolíticas, hormonas vegetales y metabolitos secundarios (Miljaković et al., 2020). Varios estudios indican la capacidad antagónica de cepas de *Bacillus* spp, contra aislados fúngicos de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

3 Materiales y métodos

3.1 Ubicación del ensayo

El presente trabajo de investigación se desarrolló en el laboratorio de Fitopatología de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoosanitario – AGROCALIDAD, ubicado en la Av. Interoceánica Km. 14 ½, sector La Granja –Tumbaco (Anexo 1).

3.2 Activación y masificación de cepas bacterianas y aislados fúngicos

3.2.1 Cepas bacterianas

Las cinco cepas crioconservadas del laboratorio de Fitopatología – AGROCALIDAD (AEC-00215, AEC-00256, AEC-00257, AEC-00258 y AEC-00259) fueron reactivadas de forma individual y axénica en placas de Agar Nutritivo (AN) mediante el método de extensión en placa. Para ello, se depositó 100 µL de cada bacteria con una micropipeta y con un asa de Digralesky estéril se distribuyó el inóculo de manera uniforme por toda la superficie. Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C por 48 horas. Transcurrido este tiempo y bajo las mismas condiciones, se tomó una colonia aislada de cada cultivo con un asa metálica, y se sembró por el método de agotamiento por estrías en medio Luria Bertani Agar (LB) para obtener colonias individuales y puras (Schaad et al., 2001).

3.2.2 Aislados fúngicos

La activación de los hongos fitopatógenos se la realizó en una cabina de flujo laminar, el proceso se llevó a cabo por duplicado mediante la inoculación de un pedazo de agar de 0,7 cm de diámetro (plot) de los aislados fúngicos conservados bajo los códigos de laboratorio 17-00-34 (*B. cinerea* de *Vitis vinifera*) y 014-25-00308 (*C. gloeosporioides* de *Theobroma cacao*). El plot se dispuso en el centro de placas individuales de Agar Papa-Dextrosa (PDA) las cuales se incubaron a 28 ± 2 °C por siete días. Al cabo del periodo de desarrollo y con un asa de punción, se tomó el micelio aéreo de las placas activadas previamente y se realizaron subcultivos en Extracto de Malta Agar (EMA) para favorecer su crecimiento. Las placas se

mantuvieron en una incubadora marca Precision Scientific modelo 6LM a la misma temperatura y en completa oscuridad hasta su uso (Gaitán et al., 2006; Pedroza, 2015).

3.3 Pruebas de diagnóstico de cepas bacterianas y aislados fúngicos

3.3.1 Género *Bacillus*

3.3.1.1 Indicador morfológico

A partir de los cultivos bacterianos de 48 horas de crecimiento en medio Luria Bertani Agar (LB), se procedió a caracterizar y fotografiar las colonias desarrolladas bajo un estereomicroscopio marca Motic modelo SMZ168, de tal manera que se reportaron parámetros como color, forma, elevación, borde, superficie y consistencia.

Adicionalmente, para la identificación microscópica de las cepas de *Bacillus* spp. se llevó a cabo una tinción de Gram, para la cual se emplearon cinco portaobjetos limpios a los que se les dispensó una gota de agua destilada estéril y con un asa bacteriológica se tomó una colonia de cada bacteria, y en conjunto con la gota se extendió uniformemente con leves movimientos para evitar la ruptura celular. Cada frotis bacteriano se fijó con calor por intervalos de 30 segundos. Tras enfriar, a cada portaobjetos se le agregó cristal violeta como colorante primario y se dejó reposar por 60 segundos hasta lavar con agua destilada, posteriormente, para fijar el color se añadió un mordiente yódico por 60 segundos seguido de un proceso de lavado, de igual forma, se adicionó un agente decolorante (solución alcohol-cetona) por 30 segundos y, por último, se realizó la contra tinción con safranina por 60 segundos (Tortora et al., 2017).

Del mismo modo, para la tinción de endosporas, se tomaron los cultivos bacterianos de 96 horas de incubación, a partir de los cuales se realizaron nuevos frotis fijados con calor y se les añadió oxalato verde malaquita hasta cubrir el inóculo. Posteriormente, cada placa se calentó por cinco minutos evitando la evaporación del colorante. Los portaobjetos se lavaron con agua destilada y se aplicó safranina por 60 segundos. Una vez listas las placas con las tinciones

respectivas, se visualizaron bajo un microscopio campo claro y oscuro marca Olympus modelo BX43F a un aumento de 60x con aceite de inmersión (Tortora et al., 2017).

3.3.1.2 Indicador metabólico

Se realizaron nueve pruebas bioquímicas y dos pruebas enzimáticas: prueba del citrato, TSI, crecimiento 7 % NaCl, hidrólisis de almidón, hidrólisis de caseína, reducción de nitratos, Voges Proskauer (VP), óxido fermentativo (OF), motilidad, catalasa y oxidasa. Cada una de las pruebas se efectuó por triplicado, incluyendo el tubo control (sin microorganismo) para comprobar la esterilidad de los medios.

3.3.1.2.1 Prueba del citrato

Para la evaluación del citrato como fuente de carbono, se utilizó el medio comercial Simmons Citrate Agar (TM media, India), el cual contiene: agar, cloruro de sodio (NaCl), citrato de sodio, fosfato dipotásico, fosfato amónico dibásico, sulfato de magnesio y azul de bromotimol. Se pesaron 4,85 g en una balanza analítica y se disolvieron en 200 mL de agua destilada, se ajustó el pH a 6,8, consiguientemente se calienta hasta su ebullición en una plancha agitadora y calentadora de marca Thermo Scientific modelo SP131325, y se dispensó en tubos 7 mL y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos. Luego del tiempo de esterilización se dispusieron los tubos en forma horizontal para formar el pico de flauta. Las cepas se inocularon por estría en la superficie como se observa en la Figura 9, posteriormente se incubaron a 37 °C durante 48-72 horas (Schaad et al., 2001).

3.3.1.2.2 Prueba de TSI

Para determinar la capacidad bacteriana de fermentar distintos hidratos de carbono, se empleó el medio comercial Triple Sugar Iron Agar (TSI) (BD DIFCO™) el cual contiene extracto de carne bovina, extracto de levadura, digerido pancreático de caseína, peptona de proteasa N° 3, 0,1 % de dextrosa, 1,0 % de lactosa, 1,0 % de sacarosa, sulfato ferroso, cloruro sódico, tiosulfato sódico, agar y rojo fenol. El proceso de pesaje se realizó por medio de una

balanza analítica marca AE ADAM modelo PW 254, para lo cual, se calculó 13 g del preparado comercial en 200 mL de agua, y se mezcló hasta disolver por completo. Se dispensó 7 mL de medio en tubos de ensayo limpios y se esterilizó por autoclave a 120 °C por 15 minutos. Una vez autoclavados, se ubicaron los tubos de forma inclinada en un ángulo de 45 ° hasta solidificar. Cada colonia bacteriana se inoculó por punción y en zigzag a lo largo del pico de flauta. Para finalizar, se dejó incubando por 168 horas a 37 °C y los resultados se interpretaron a través de un viraje de color de naranja rojizo a amarillo debido a la acidificación del sustrato (MacFaddin, 2004).

3.3.1.2.3 Prueba de crecimiento 7 % NaCl

Se preparó caldo nutritivo (peptona 0,75 g; extracto de carne 0,45 g) en 150 mL de agua destilada y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos, posteriormente a la esterilización se agregó 1,5 % de cloruro de sodio (NaCl) por medio de filtro estériles de 0,45 µm y, por último, se dispensó 5 mL en cada uno de los tubos. Cada cepa se inoculó por inmersión con asa de punción estéril y se incubó a 37 °C durante 4 días (Harwood, 1989).

3.3.1.2.4 Prueba de hidrólisis de almidón

Para esta prueba bioquímica se preparó caldo nutritivo (peptona 0,75 g; extracto de carne 0,45 g) en 150 mL de agua destilada, se homogenizó y se esterilizó a 121 °C por 15 minutos. Luego del procedimiento de esterilización, se dejaron templar los tubos con caldo y se agregó 0,5 % de almidón soluble por medio de filtros estériles de 0,45 µm. Finalmente se distribuyeron 5 mL por tubo. Cada cepa se inoculó por inmersión con asa de punción estéril y se incubó a 37 °C durante 48 horas. Posterior al tiempo de incubación, se adicionaron 2 a 3 gotas de solución de yodo al 1 % en el medio (Harwood, 1989).

3.3.1.2.5 Prueba de hidrólisis de caseína

Para detectar la presencia de la enzima caseasa se empleó un medio suplementado a base de 5,6 g de leche desnatada en polvo, 1,0 g de triptón, 500 mg de extracto de levadura, 200 mg de dextrosa y 3,0 g de agar. Cada ingrediente se pesó por separado en una balanza analítica

marca AE ADAM modelo PW 254 y se disolvió en 200 mL de agua destilada por agitación y calentamiento en una plancha marca Thermo Scientific modelo SP131325. El medio de cultivo se esterilizó a 120 °C por 15 minutos, una vez listo, se dispensó en cajas Petri estériles de 35 mm x 10 mm, las cajas se dejaron enfriar y posteriormente se expusieron a luz UV por 15 minutos. Con un asa metálica, se tomó una colonia individual de cada cepa bacteriana con 48 horas de crecimiento y se inoculó mediante la técnica de agotamiento por estrías. Las placas se dejaron en incubación por un periodo de 48 horas a 37 °C. Los resultados se observaron bajo un estereomicroscopio marca Motic modelo SMZ168 (Schaad et al., 2001).

3.3.1.2.6 Prueba de reducción de nitratos

Para la preparación del medio de nitrato en una balanza analítica marca AE ADAM modelo PW 254 se pesó KNO₃ 1 % (1,5 g), peptona (0,75 g) y extracto de carne (0,45 g) por 150 mL de agua destilada y se ajustó el pH a $7,0 \pm 0,2$, posteriormente se dispensó 5 mL de medio por tubo y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Luego de esterilización, se dejó enfriar los tubos y fueron inoculados mediante punción con asa estéril (Figura 9) tomando una colonia activa de cada cepa de *Bacillus* spp.; posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 48 horas. Tras la incubación, se agregó ácido sulfanílico (reactivo A) y α -naftalamina en ácido acético (reactivo B), agitando levemente para homogenizar; en caso de no manifestar un cambio de color, se lleva a cabo la prueba complementaria de Zinc (Harwood, 1989).

3.3.1.2.7 Prueba de Voges Proskauer

La capacidad de las bacterias de llevar a cabo un proceso de fermentación butanodiólica mediante la producción de acetoína se determinó a través de su cultivo en medio comercial MR-VP Broth (BD BBL™) el cual está formulado por digerido pancreático de caseína, digerido péptico de tejido animal, dextrosa y fosfato potásico. Como paso inicial, en una balanza analítica marca AE ADAM modelo PW 254 se pesó 2,55 g del medio en polvo, el cual se disolvió y homogeneizó completamente en 150 mL de agua destilada. Sucesivamente, se

dispensó 5 mL del medio en tubos de ensayo previamente esterilizados en estufa marca REBELK modelo RS-70P+, y se autoclavarón a 120 °C por 15 minutos. A su vez, con un asa bacteriológica se tomó una colonia de cada bacteria y se inoculó por punción efectuando leves movimientos circulares. Los tubos se dejaron incubando por cinco días a 30 °C, pasado ese periodo, para visualizar e interpretar los resultados, se añadió 1,2 mL de α -naftol al 5 % y 0,4 mL de hidróxido de potasio (KOH) al 40 % a cada tubo, por último, se dejó reposar de 10 a 15 minutos hasta observar la formación de un halo rosado-rojo intenso en la superficie del medio (MacFaddin, 2004).

3.3.1.2.8 Prueba de óxido fermentativo

Para determinar el tipo de metabolismo de los carbohidratos de las cepas de *Bacillus* spp., se utilizó O/F Basal Medium (TM Media, India), el cual contiene: cloruro de sodio (NaCl), caseína enzimática hidrolizada, agar, fosfato dipotásico y azul de bromotimol, con un pH final de $6,0 \pm 0,2$ (TM MEDIA). Para la preparación se disolvió 1,88 g en 200 mL de agua destilada y se añadió 2 g de dextrosa, posteriormente se calentó hasta su ebullición por un minuto en una placha agitadora y calentadora de marca Thermo Scientific modelo SP131325 y, por último, se dispensó 7-10 mL por cada tubo y se esterilizó a 118 °C por 10 minutos. Tras la esterilización, se inocularon los 2 tubos con cada cepa por punción con un asa estéril; para su evaluación, el primer tubo se dejó sin cubrir (condición aerobia) y al segundo tubo se le adicionó parafina estéril (condición anaerobia). Los tubos se incubaron a 37 °C por 14 días (Schaad et al., 2001).

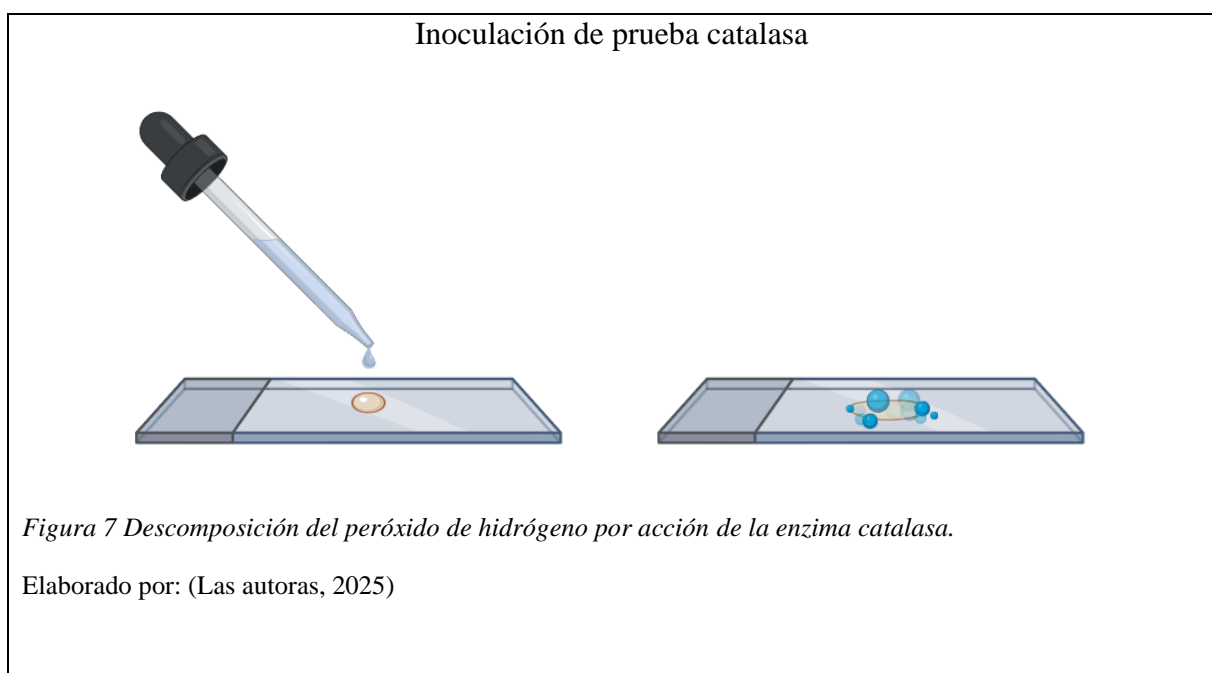
3.3.1.2.9 Prueba de motilidad

Para confirmar la presencia de las estructuras de motilidad celular (flagelos) se preparó el medio semisólido de Edwards y Ewing con una modificación en el protocolo establecido por MacFaddin (2004), al adicionar sales de tetrazolio para visualizar el desplazamiento bacteriano. Inicialmente, se procedió con el pesaje de los siguientes ingredientes: 0,51 g de extracto de carne, 1,7 g de peptona, 0,85 g de cloruro de sodio (NaCl) y 0,68 g de agar. Los componentes sólidos se disolvieron en 170 mL de agua destilada hasta tener una mezcla homogénea, seguido,

se ajustó a un pH de 7,3 y se esterilizó a 120 °C por 15 minutos. Tras salir del autoclave, se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura de 56 °C y con un filtro de membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 25 mm x 0,45 µm se añadió una solución de 2-3-5-Trifenil-2H-tetrazolio (TTC) al 1 %. Asimismo, se dispensó 10 mL de medio en 17 tubos y con un asa de punción recta se inoculó por triplicado una colonia aislada de cada bacteria. Los cultivos y los controles se mantuvieron en incubación a 37 °C por 72 horas.

3.3.1.2.10 Prueba de catalasa

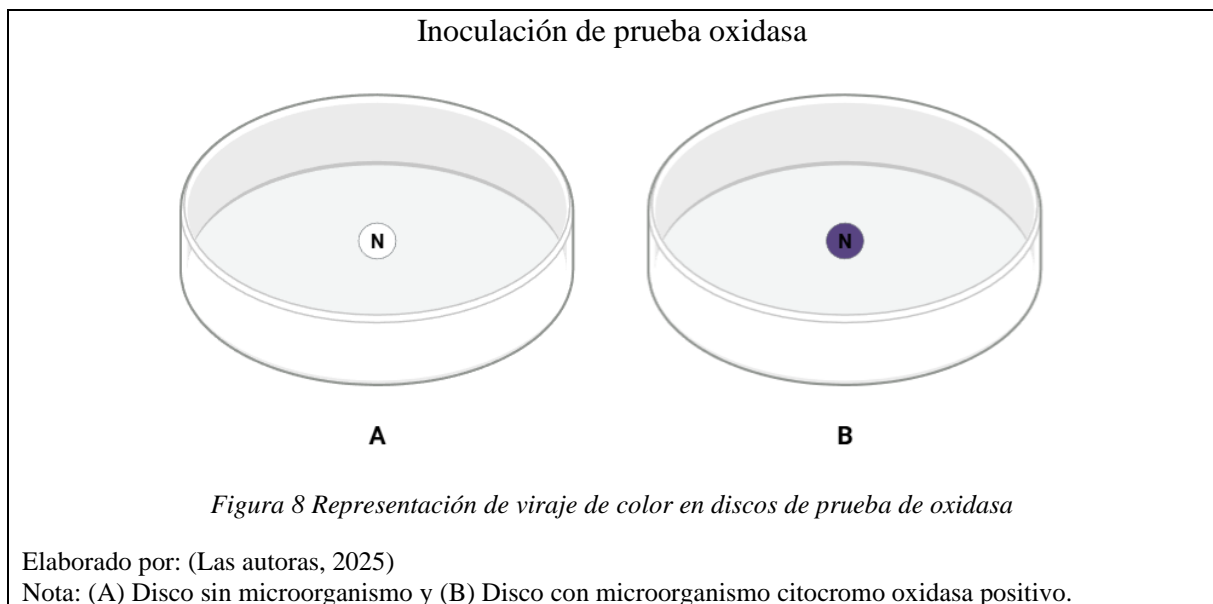
La enzima catalasa fue revelada siguiendo la técnica descrita por Granados & Villaverde (1997) donde, en un portaobjetos limpio se dispuso con un asa metálica una colonia de 24 horas del microorganismo, al cual se añadió una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30 % y sin homogenizar la mezcla, se dejó actuar por un minuto hasta la formación de burbujas de oxígeno. El proceso se repitió para cada una de las bacterias estudiadas como se muestra en la Figura 7.



3.3.1.2.11 Prueba de oxidasa

Para detectar la presencia de la enzima citocromo oxidasa en las cepas de *Bacillus*, se emplearon seis discos comerciales impregnados con tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) en

dimetilsulfóxido (DMSO) de la marca Thermo Scientific™, los cuales se dispusieron de forma individual en cajas Petri de 35 mm x 10 mm (Figura 8). Cada disco fue hidratado con una gota de agua destilada previo a la inoculación de las colonias bacterianas de 24 horas de crecimiento, las cuales, se extendieron sobre los discos por medio de un asa metálica. La prueba se dejó incubar a temperatura ambiente de uno a dos minutos, hasta mostrar un cambio de color a azul o morado (Granados & Villaverde, 1997; Thermo Fisher Scientific, 2025).



Inoculación de pruebas bioquímicas

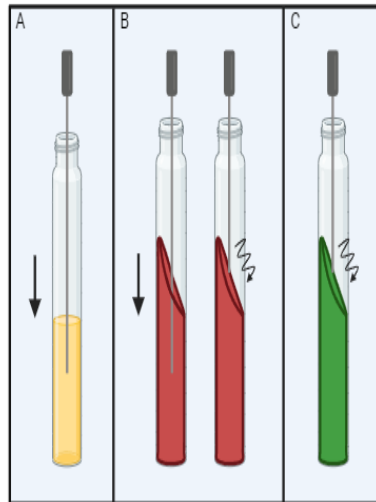


Figura 9 Tipos de inoculación para pruebas bioquímicas

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (A) Inoculación por punción; (B) Inoculación por punción y estría en pico de flauta; (C) Inoculación por estría en pico de flauta.

3.3.2 Especies *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*

3.3.2.1 Indicador morfológico

Para la obtención y observación de las estructuras morfológicas microscópicas de los hongos *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* se utilizó la técnica de microcultivo en portaobjetos con el propósito de conservar la disposición natural y la integridad de sus estructuras. Para ello, en una caja Petri se preparó una cámara húmeda estéril, donde se colocó papel filtro con agua estéril y dos varillas de vidrio en su interior que sirvieron como soporte para el portaobjetos. Sobre este se ubicó un bloque de medio de cultivo (EMA), obtenido mediante cortes con bisturí. El microorganismo se inoculó sobre el bloque en cuatro cuadrantes, mediante un asa de punción y posteriormente se cubrió con un cubreobjetos. La cámara húmeda se incubó por 7 días a 25 °C en una incubadora marca Precision Scientific modelo 6LM. Finalizado el periodo de incubación, con pinzas estériles se despegó suavemente el cubreobjetos, descartando el medio de cultivo con crecimiento fúngico en una solución de hipoclorito de sodio al 2 %, sobre el portaobjetos se añadió una gota de azul de lactofenol y se montó nuevamente el cubreobjetos,

por último, se observaron las estructuras del hongo en un microscopio campo claro – oscuro marca Olympus modelo BX43F con objetivos de 10x y 40x (González et al., 2010).

3.3.2.2 Indicador metabólico

La identificación metabólica de los hongos filamentosos se realizó mediante el sistema BIOLOG FF MicroPlate™, que permite evaluar la oxidación de diferentes fuentes de carbono para generar un perfil metabólico característico. Las cepas fúngicas (*C. gloeosporioides* y *B. cinerea*) se cultivaron en Extracto de Malta Agar (EMA) a 28 ± 2 °C y, a partir de cultivos puros de siete días de crecimiento, con hisopos estériles se tomó la biomasa micelial de la superficie del sustrato, reconstituyendo el inóculo en 16 mL de fluido de inoculación estéril FF-IF (0,25 % Phytigel y 0,03 % Tween 40). La densidad celular de cada muestra se ajustó hasta alcanzar una transmitancia del 75 %. Por otro lado, en cada pocillo de la microplaca se dispensó 100 µL de la suspensión fúngica mediante una pipeta multicanal y puntas estériles, posteriormente las placas multipocillos se incubaron a 26 ± 2 °C de 1 a 10 días en una incubadora marca Precision Scientific modelo 6LM. Los cambios de color y turbidez, indicativos de la actividad metabólica, se registraron diariamente mediante el lector Biolog MicroStation™ a 490 nm y 750 nm, y los resultados fueron analizados con el software Microlog™ para comparar los patrones de oxidación con la base de datos de referencia y determinar la identidad presuntiva de ambas cepas (BIOLOG, 2010).

3.3.2.3 Indicador molecular

3.3.2.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico de los aislados fúngicos se realizó utilizando el DNeasy® Plan Mini Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Entre los materiales y equipos empleados se incluyeron: microtubos de 1,5 mL estériles, micropipetas con puntas estériles, centrífuga refrigerada marca EPPENDORF modelo 5804R, vórtex y baño térmico (baño agua maría) marca Precision Scientific modelo 185. Previamente, todos los reactivos se

llevaron a temperatura ambiente y el baño térmico se precalentó a 65 °C. Inicialmente se realizó una molienda mecánica, se tomó 100 g de material fúngico fresco de *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*, se maceró complementemente en un mortero enfriado con nitrógeno líquido y con pistilo estéril, luego se colectó el polvo liofilizado en tubos de 1,5 mL. Posteriormente se adicionó 400 µL de tampón AP1 y 4 µL de RNase A, y se incubó durante 10 minutos a 65 °C, invirtiendo el tubo periódicamente (2 a 3 veces) para favorecer la lisis celular. Luego se añadió 130 µL del tampón P3, se homogenizó e incubó 5 minutos en hielo. El lisado se centrifugó durante 5 minutos a 20 000 x g (14 000 rpm) y se transfirió a una columna QIAshredder y se centrifugó por 2 minutos a 20 000 x g (14 000 rpm), se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo al cual se le adicionó 1,5 volúmenes de tampón AW1, mezclando por pipeteo. De esta mezcla se cargaron alícuotas de 650 µL sobre la columna de purificación con membrana de sílice, colocada en un tubo de recolección de 2 mL y se centrifugó 1 minuto a ≥ 6000 x g; a continuación, la columna se lavó con 500 µL del tampón AW2, se centrifugó 1 minuto a $\geq 20\ 000$ x g, se descartó el flujo y se repitió el lavado con otros 500 µL del mismo tampón, seguido de una centrifugación final de 2 minutos a $\geq 20\ 000$ x g para retirar sales e inhibidores. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo microcentrífugo de 1,5 mL - 2 mL, se adicionaron 100 µL de tampón de elución AE directamente sobre la membrana y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente; luego se centrifugó 1 minuto a ≥ 6000 x g para recuperar el ADN genómico purificado. El ADN obtenido se almacenó en frío hasta su posterior cuantificación y uso de las reacciones PCR (QIAGEN, 2016).

3.3.2.3.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A partir del ADN extraído se realizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) bajo tres protocolos de amplificación del gen ITS mediante el uso de primers específicos de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Para la preparación de la máster mix (MM) las cantidades de cada reactivo se calcularon en función de los datos obtenidos de la

cuantificación de ADN de ambas cepas fúngicas, esto con el fin de obtener volumen final de 25 μ L por muestra.

Para la amplificación de los genes de *B. cinerea* se siguió la metodología aplicada por Rigotti et al. (2002) para lo cual, se trabajó con Dream Buffer PCR a una concentración 1X, 3 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP's, 0,4 μ M de primers Forward C729+ (5'-AGCTCGAGAGAGATCTCTGA-3') y Reverse C729- (5'-CTGCAATGTTCTGCGTGGAA-3'), 2,5 U/50 μ L de la enzima Taq polimerasa DNA, agua libre de nucleasas y la muestra de ADN fúngico. El protocolo de ciclaje térmico empleado para los cebadores C729+ y C729- se detalla en la Tabla 6.

Tabla 6 Protocolo de ciclaje para *Botrytis cinerea* con primers C729+/-

Protocolo de amplificación de <i>Botrytis cinerea</i>			
Etapa	N ° de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:s)
Desnaturalización	1	95	3:00
Desnaturalización		94	0:20
Hibridación	34	60	0:20
Extensión		72	0:30
Extensión final	1	72	10:00

Fuente: (Rigotti et al., 2002)

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Asimismo, se probó la amplificación de un fragmento específico de *B. cinerea* con los cebadores BC108+/BC563- según lo descrito por Rigotti et al. (2006). Para ello, la mezcla de reacción estuvo conformada por Dream Buffer PCR 1X, 3mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTP's, 0,4 μ L de los primers Fordward BC108+ (5'-ACCCGCACCTAATTCGTCAAC-3') y Reverse BC563 (5'-GGGTCTTCCGATACGGGAGAA-3'), junto con 2,5 U/50 μ L de Taq ADN polimerasa, agua libre de nucleasas y la muestra de ADN del hongo. El programa de amplificación se observa en la Tabla 7.

Tabla 7 Protocolo de ciclaje para *Botrytis cinerea* con BC108+/BC563-

Protocolo de amplificación de <i>Botrytis cinerea</i>			
Etapa	N ° de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:s)
Desnaturalización	1	95	3:00
Desnaturalización		94	0:20
Hibridación	34	54	0:20
Extensión		72	0:30
Extensión final	1	72	10:00

Fuente: (Rigotti et al., 2006).

Elaborado por: (Las autoras, 2025).

Por otro lado, el protocolo para la amplificación de *C. gloeosporioides* se lo obtuvo de Kamle et al. (2013) donde la MM incluyó el Dream Buffer 1X, 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTP's, 0,2 μM de cada primer, siendo el Forward MKCgF (5'-TTGCTTCGGCGGGTAGGGTC-3') y el Reverse MKCgR (3'-ACGCAAAGGAGGCTCCGGGA-5'), 0,7 U/50 μL de enzima Taq, agua libre de nucleasas y la muestra de ADN. De igual manera, para el ciclaje térmico se consideró lo descrito en la Tabla 8.

Tabla 8 Protocolo de ciclaje de *Colletotrichum gloeosporioides*

Protocolo de amplificación de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>			
Etapa	N ° de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (min:s)
Desnaturalización	1	94	5:00
Desnaturalización		94	0:60
Hibridación	30	58	2:00
Extensión		72	0:60
Extensión final	1	72	5:00

Fuente: (Kamle et al., 2013)

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

3.3.2.3.3 Electroforesis

Para la preparación del gel de agarosa al 1,5 % se elaboró una solución EDTA 0,5 M disolviendo 18,61 g de EDTA en 100 mL de agua estéril Tipo I, ajustando el pH a 8,0, esterilizando y almacenado a 4 °C. Con la solución preparada previamente se formuló el tampón

TBE 5X, mezclando 54 g de Tris base, 27,5 g de ácido bórico y 20 mL de EDTA 0,5 M en 1 L de agua destilada, ajustando el pH a 8,3 y conservando la mezcla en refrigeración. Para la electroforesis, se utilizó TBE 0,5X, obtenido mediante dilución del concentrado 5X. El gel de agarosa al 1,5 % se preparó disolviendo 0,975 g de agarosa en 65 mL de TBE 0,5X, se calentó la mezcla en una plancha agitadora y calentadora de marca Thermo Scientific modelo SP131325 hasta su completa homogeneización, se dejó templar y se añadió 3 µL de SYBR SafeTM DNA Gel Stain (Brown & Tuite, 1998).

En la cámara de electroforesis marca Thermo Scientific modelo 7303 A2 (OWL) se colocaron las barras de soporte y el peine, se vertió el gel preparado y se dejó solidificar durante 20 minutos. Una vez polimerizado, se retiró el peine y se añadió el tampón TBE 0,5X hasta cubrir completamente el gel. Los pocillos se orientaron hacia el cátodo para permitir la migración del ADN hacia el ánodo. En cada pocillo se cargaron 4 µL del producto PCR mezclados con 1 µL de tampón de carga Blue JuiceTM 10X, junto con el marcador de peso molecular, un control positivo y un control negativo. La corrida se realizó a 100 V durante 45 minutos. Finalmente, los amplicones se visualizaron en un transiluminador de luz UV, y el tamaño molecular de cada producto PCR se estimó mediante el marcador de referencia utilizado (Brown & Tuite, 1998).

3.4 Pruebas de antagonismo

El ensayo de antagonismo por cultivo dual se llevó a cabo para cada aislado fúngico, considerando tres repeticiones por los seis tratamientos (cinco cepas de *Bacillus* y control positivo). En primera instancia, se realizó la siembra por plot a partir de un cultivo puro de cada hongo en medio Extracto de Malta Agar (EMA) y se dejó incubar a 28 ± 2 °C por un tiempo estimado de 48 horas para *Botrytis* y 72 horas para *Colletotrichum*.

Simultáneamente, se prepararon las suspensiones bacterianas a partir de cultivos sólidos de 48 horas de crecimiento en medio Luria Bertani Agar (LB), para ello, con la punta de una micropipeta, se tomó una colonia individual del microorganismo seguido, se liberó la punta en el interior de un tubo de ensayo con caldo nutritivo (extracto de carne y peptonas) estéril, las suspensiones se repitieron por duplicado para cada cepa obteniendo un total de diez tubos. Los tubos se incubaron durante toda la noche a 35 ± 2 °C. Por último, las bacterias fueron ajustadas a una concentración de 1×10^7 UFC/mL por densidad óptica (DO) en el espectrofotómetro marca SPECTRONIC 20 a una longitud de onda de 600 nm (AGDIA, 2020).

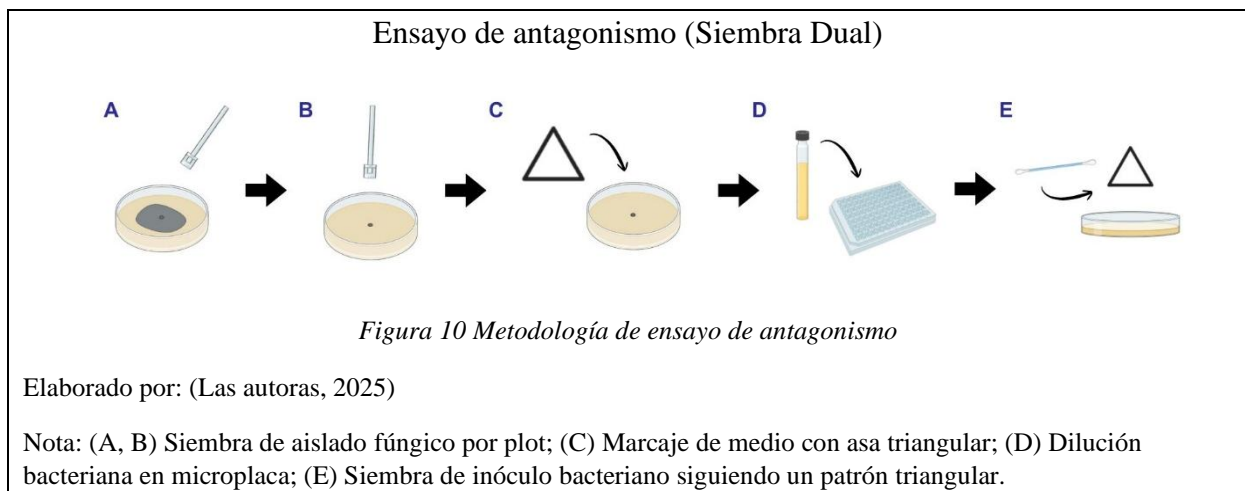
El ensayo para cada hongo se ejecutó en cabinas de flujo separadas, siguiendo el método detallado a continuación. Primero, con una micropipeta, se tomó 100 μ L del inóculo bacteriano y se dispensó en un pozo de una microplaca estéril; en segundo lugar, con un hisopo autoclavado se absorbió el contenido de la microplaca y siguiendo un patrón triangular, se inoculó la bacteria alrededor del crecimiento micelial; el ensayo se repitió por triplicado para cada tratamiento hasta alcanzar un total de 18 unidades experimentales en cada hongo, tomando en cuenta que, los controles positivos emplearon amonio cuaternario al 20% y los controles negativos fueron agua. Las placas del ensayo se incubaron por siete días a 28 ± 2 °C. Para finalizar, el efecto antagónico de las bacterias se determinó mediante la aplicación de la fórmula de porcentaje de inhibición de crecimiento radial (Ecuación 1) y se clasificó de acuerdo con la escala utilizada por Corrales et al. (2010) (Tabla 9), cuyos datos fueron obtenidos al séptimo día a través de la medición del radio del hongo con un calibrador manual (pie de rey Total TMT312001). La metodología se basó en lo desarrollado por Anith et al. (2021) con modificaciones en la forma de inoculación de la bacteria (Figura 10).

Tabla 9 Clasificación del PICR

Nivel de antagonismo	Porcentaje de inhibición
Negativo	< 10 %
Bajo	10 % - 39 %
Medio	40 % - 69 %
Positivo	70 % - 100 %

Fuente: (Corrales et al., 2010)

Elaborado por: (Las autoras, 2025)



3.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de los ensayos de antagonismo de cada hongo se analizaron estadísticamente por separado a través de un Análisis de Varianza (ANOVA) complementado con la prueba Post Hoc de Duncan de diferenciación de medias a un nivel de significancia del 95 % mediante un Diseño Completamente al Azar (DCA) considerando tres repeticiones por tratamiento, obteniendo un total de 18 unidades experimentales (UE) por hongo. Se confirmó la normalidad mediante la prueba de Shapiro Wilks con el valor residual de PICR. Los datos fueron procesados con el programa estadístico InfoStat (2020) considerando como variables independientes las distintas cepas de *Bacillus* y el control positivo, mientras que, como variable

dependiente se definió el porcentaje de inhibición de crecimiento fúngico. Ver Tabla 10 y Tabla 11.

Tabla 10 Detalle de tratamientos aplicados

Codificación	Descripción	Tratamiento
C+	Amonio cuaternario al 20%	T0
AEC-00215	<i>B. pumilus</i>	T1
AEC-00256	<i>B. megaterium</i> AB4	T2
AEC-00257	<i>B. megaterium</i> CT11	T3
AEC-00258	<i>B. subtilis</i>	T4
AEC-00259	<i>B. amyloliquefaciens</i>	T5

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Tabla 11 Análisis de Varianza (ANOVA)

Factores de variabilidad	Grados de libertad
Tratamientos	5
Error experimental	12
Total	17

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

4 Resultados y discusión

4.1 Cepas bacterianas

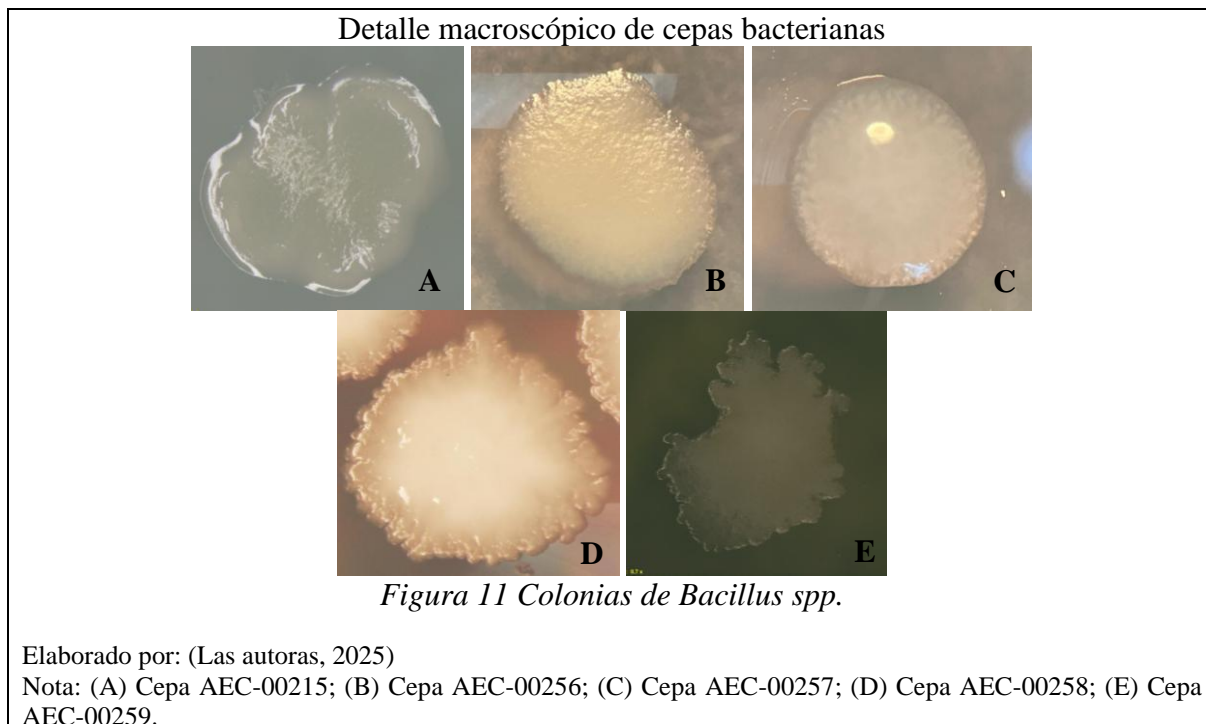
4.1.1 Indicador morfológico

La caracterización morfológica de cepas de *Bacillus* spp. cultivadas en medio Luria Bertani Agar (LB) permitió evaluar las características distintivas de cada una (Figura 11). La cepa AEC-00215 (*Bacillus pumilus*) presentó colonias de color blanco cremoso, con forma irregular y elevación crateriforme. Su borde se visualizó ondulado, la superficie rizoidal y consistencia mucoide. Estos resultados evidencian la variabilidad morfológica de especies dentro del género, ya que, conforme lo señalado por Realpe et al. (2002) esta cepa bacteriana puede formar colonias β -hemolíticas con aspecto liso, mucoide o rugoso con bordes ondulados, lo que indica que estas características no definidas están dentro del comportamiento común de la especie, demostrando la capacidad de adaptación de la bacteria.

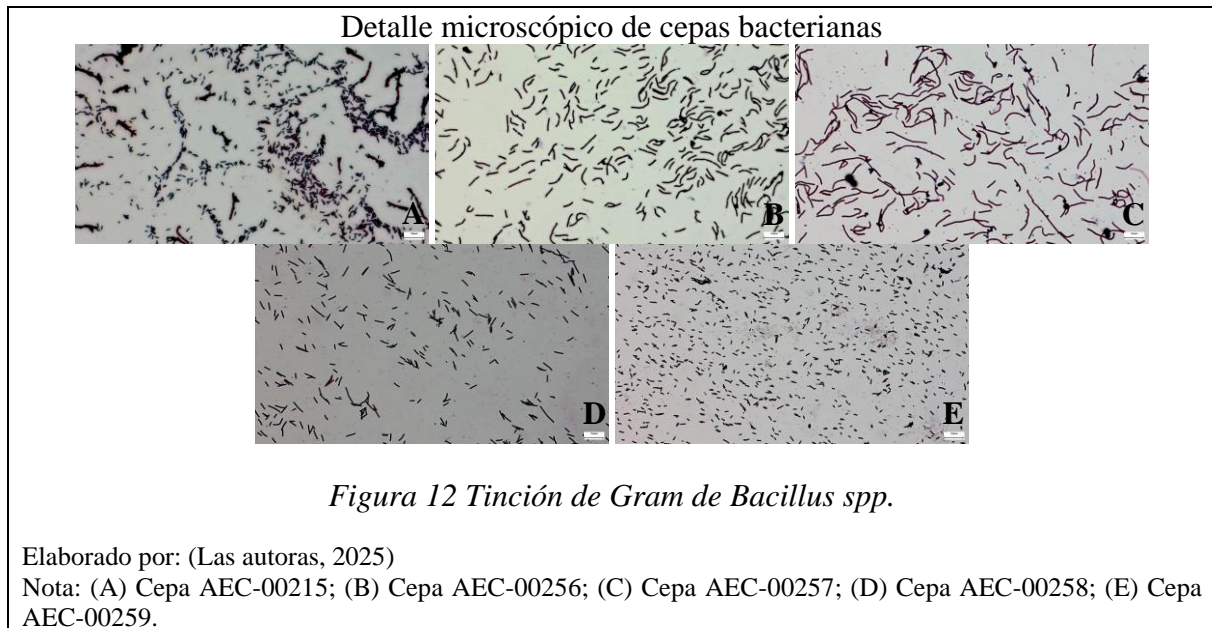
Las cepas AEC-00256 y AEC-00257 (*Bacillus megaterium*) exhibieron morfologías similares entre sí, sin embargo, con colorimetría, superficies y bordes distintos. Las colonias de la cepa AEC-00256 presentaron color blanco, forma circular y elevada, con borde lobulado, superficie compleja y consistencia mucoide. De manera similar, la cepa AEC-00257 presentó características semejantes. Dicho esto, *B. megaterium* tiene la capacidad de presentar colonias de color blanco, con forma redonda y superficie lisa cultivada en medio LB Agar según lo reportado por Pishchik et al. (2021), a su vez otras cepas se muestran morfológicamente divergentes con colonias cóncavas, lisas y de color blanco lechoso descritas por Andriani et al. (2017), lo cual concuerda parcialmente con los resultados obtenidos de la cepa AEC-00256 y AEC-00257, sugiriendo variabilidad por factores genéticos o condiciones de crecimiento *in vitro*.

Por su parte, la cepa AEC-00258 (*Bacillus subtilis*) mostró colonias de color blanco cremoso, con forma irregular y elevación plana, a su vez, borde ondulado, superficie lisa y consistencia mucoide, características que pueden ser comparadas con descripciones de la especie. Según lo descrito por Zhenxiang et al. (2018) las colonias de *B. subtilis* se presentan de color gris o blancas, de forma circular, opacas, planas y secas en LB agar y agar nutritivo, así mismo, se manifiestan de color gris o blanco, circulares, opacas, con crestas gruesas, superficie lisa y húmeda cultivadas en TSA con suero. La comparación con la literatura evidencia que la cepa AEC-00258 comparte algunas características como el color claro, la opacidad, la superficie y el aspecto húmedo, sin embargo, existen diferencias notables en la forma irregular y el borde ondulado, lo que puede atribuirse a las variaciones intrínsecas de las cepas o a las condiciones de cultivo.

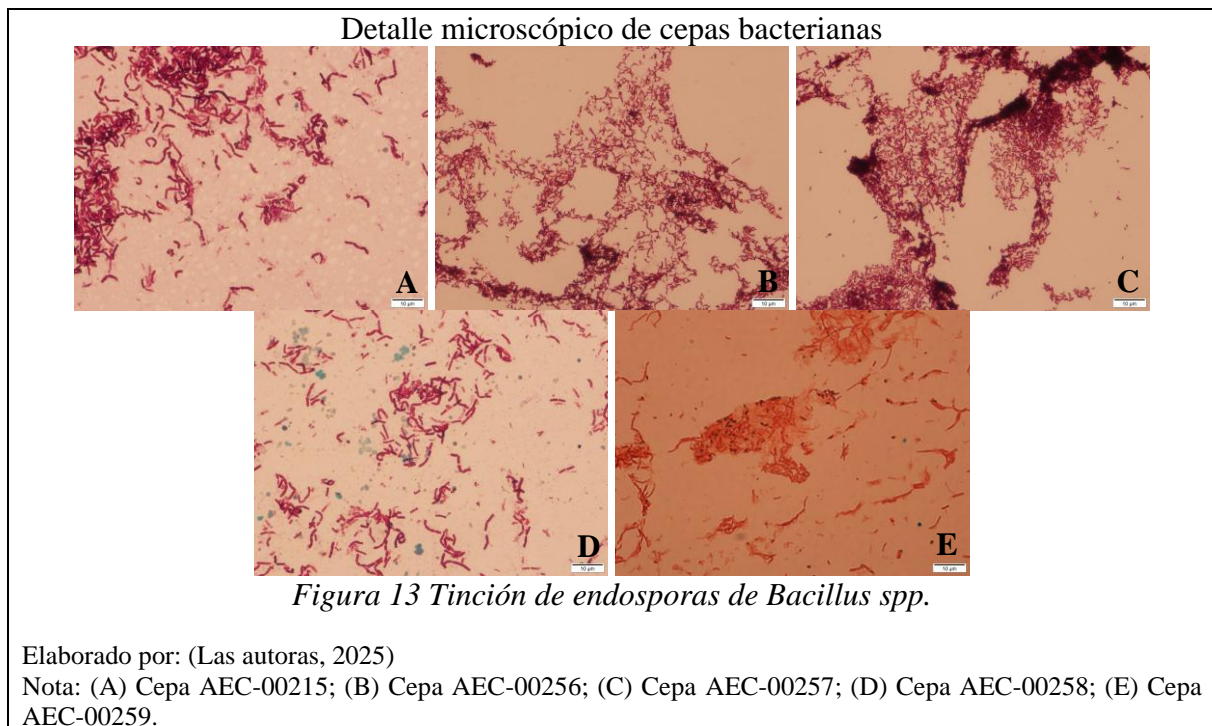
Por último, la cepa AEC-00259 (*Bacillus amyloliquefaciens*) presentó colonias de color blanco amarillento, forma irregular con elevación plana, borde irregular, superficie arrugada y consistencia mucoide, rasgos que pueden compararse con las descripciones para esta especie. Conforme lo señalado por Li et al. (2024) las colonias de *B. amyloliquefaciens* en LB agar son parcialmente circulares, con coloración amarilla pálida opaca, centro elevado y superficie arrugada, mientras que Deng et al. (2025) indican que las colonias de esta cepa son opacas, de color blanco lechoso, circulares con bordes irregulares y con centro elevado. Al comparar estos antecedentes con los resultados obtenidos para la cepa AEC-00259 se observa concordancia en algunos rasgos como, superficie arrugada, opacidad, colorimetría y la tendencia a formar elevaciones centrales o planas, además de la forma de los bordes, lo que respalda la identidad de la cepa.



Con respecto a la caracterización morfotintorial de las cepas de *Bacillus* spp. de 48 horas de crecimiento en medio LB. La tinción diferencial de Gram permitió observar células con forma bacilar de tamaño variable dispuestas en cadenas, y un patrón colorimétrico púrpura (Gram positivas) en las cinco muestras analizadas (Figura 12). Estos resultados concuerdan con lo reportado por Méndez et al. (2018) y San Miguel et al. (2024) quienes destacan que la forma y el color constituyen rasgos distintivos de este género. Por el contrario, Tortora et al. (2017) señalan que las bacterias del género *Bacillus* se pueden describir como Gram variables, al presentar una tinción con coloración rosada, propia de Gram negativas, como consecuencia de emplear cultivos en fase estacionaria próximos a la pérdida de viabilidad celular.



Los resultados de la tinción especial de endosporas de las cinco cepas bacterianas confirmaron la presencia de estructuras de resistencia teñidas de verde, con forma ovoide y localizadas fuera de la célula vegetativa (Figura 13). Estas observaciones coinciden con lo descrito por San Miguel et al. (2024) quienes mencionan que, dentro de la fisiología de *Bacillus*, las esporas presentan una forma oval o cilíndrica y se posicionan de manera central, subterminal o terminal. Asimismo, Corrales & Caycedo (2020) indican que el calor promueve la internalización del verde de malaquita en cúmulos de quelatos y calcio contenidos en el protoplasto de las endosporas, lo que permite su visualización en contraste con la safranina. Además, la síntesis de ácido dipicolínico en el córtex de la espora le confiere la capacidad de sobrevivir y tolerar condiciones adversas.



4.1.2 Indicador metabólico

Los resultados de la actividad metabólica bacteriana presentados en la Tabla 12, se ajustan en términos generales a lo expuesto por MacFaddin (2004) y Deng et al. (2025). En primera instancia, todas las especies de *Bacillus* mostraron resultados positivos para la presencia de la enzima citrato permeasa (Anexo 3), catalasa (Anexo 4), citocromo oxidasa (Anexo 5), caseinasa (Anexo 6) y enzimas amilolíticas (Anexo 7). No obstante, según la bibliografía consultada, *B. pumilus* suele reportar un resultado negativo para la prueba de la hidrólisis del almidón; mientras que Corrales et al. (2010) señalaron resultados variables al evaluar distintas cepas de *B. subtilis*.

De manera similar, en la prueba de TSI se confirmó que todas las cepas bacterianas tienen la capacidad de fermentar los tres hidratos de carbono (glucosa, lactosa y sacarosa), sin producción de gas ni ácido sulfhídrico (Anexo 8). Asimismo, se evidenció crecimiento en todos los tubos de caldo nutritivo suplementados con una concentración de sal de 7 % (Anexo 9). De acuerdo con Sánchez et al. (2016) *B. amyloliquefaciens* KISA 34 y *B. subtilis* KISA 71, son

capaces de tolerar elevadas concentraciones salinas tanto en condiciones de laboratorio como en aplicaciones de campo; sin embargo, esta tolerancia depende de cada cepa evaluada.

Por último, en la prueba de reducción de nitratos, la cepa AEC-00215 fue la única que no presentó la capacidad de transformar el nitrato en nitritos (Anexo 10). De igual manera, en la determinación del metabolismo oxidativo o fermentativo no manifestó cambios en la coloración del medio, lo que sugiere que el resultado pudo verse afectado por condiciones experimentales. Por otro lado, las cepas AEC-00258 y AEC-00259 se clasificaron como anaerobias facultativas, evidenciando crecimiento tanto en medio con parafina y sin ella; por su parte, la cepa AEC-00256 de *B. megaterium* se clasificó como aerobia estricta al presentar un metabolismo oxidativo (Anexo 11). En cuanto a la prueba de la motilidad, las cepas AEC-00256 y AEC-0257 exhibieron un crecimiento limitado a la línea de punción (Anexo 12) y, adicionalmente, dieron un resultado negativo en la prueba de Voges Proskauer para producción de acetoina (Anexo 13).

Tabla 12 Resultados pruebas bioquímicas y enzimáticas

Detalle	AEC-00215	AEC-00256 AB4	AEC-00257 CT11	AEC-00258	AEC-00259
Citrato	+	+	+	+	+*
TSI	A/A	A/A	A/A	A/A	A/A
NaCl 7 %	+	+	+	+	+
Hidrólisis almidón	+	+	+	+	+
Hidrólisis caseína	+	+	+	+	+
Reducción nitratos	-	+*	+*	+	+
VP	+*	-	-	+	+
O/F	-/-	+/-	-/-	+/+	+/+
Motilidad	+	-	-	+	+
Catalasa	+	+	+	+*	+
Oxidasa	+	+	+	+	+

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (+) Resultado positivo; (-) Resultado negativo; (+*) Resultado variable con tendencia positiva y (A) Reacción ácida.

En este contexto, el perfil fisiológico y bioquímico del género *Bacillus* spp. es compatible con diferentes sustratos y se asocia a una alta plasticidad metabólica (Deng et al., 2025). No obstante, algunas pruebas realizadas se consideran complementarias, como las de metabolismo óxido-fermentativo (O/F), oxidasa y TSI, las cuales pueden diferir con lo descrito de forma clásica para el género. De acuerdo con Schaad et al. (2001), los resultados de las pruebas bioquímicas pueden variar en función de factores experimentales como el tipo medio de cultivo utilizado, tiempo de incubación, condiciones de temperatura y la fase fisiológica del microorganismo.

Asimismo, los autores mencionan que la interpretación de los resultados de las pruebas bioquímicas debe realizarse de manera conjunta para precisar la identificación del microorganismo, dado que, la variabilidad fenotípica es común en especies con gran diversidad fisiológica; además, ensayos desarrollados para caracterizar a otros grupos bacterianos pueden generar respuestas inconsistentes cuando se aplican en *Bacillus* spp. Por último, Luan et al. (2023) indican que la expresión de determinadas enzimas puede manifestarse con distinta intensidad entre cepas de una misma especie, como consecuencia de diferencias genéticas intraespecíficas y mecanismos de regulación metabólica.

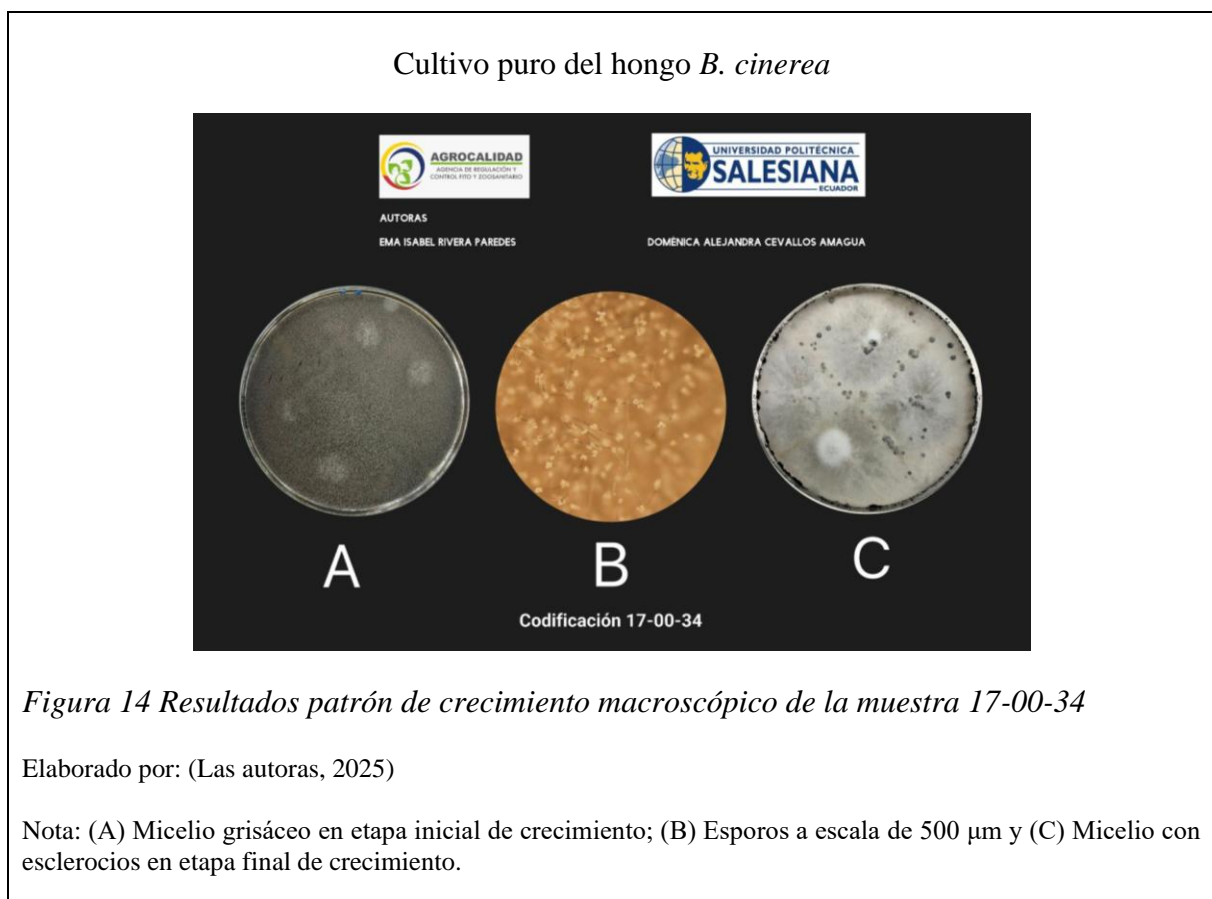
4.2 Aislados fúngicos

4.2.1 Indicador morfológico

4.2.1.1 *Botrytis cinerea*

El cultivo puro de *Botrytis cinerea* correspondiente a la muestra conservada 17-00-34 obtenida de *Vitis vinifera* mostró crecimiento radial y uniforme luego de siete días de incubación en medio EMA en condiciones específicas. Macroscópicamente, el hongo se presentó con textura algodonosa, con micelio inicialmente blanco y crecimiento aéreo (Figura 14). El desarrollo de este confirma la obtención de un aislado fúngico axénico. El desarrollo del hongo fitopatógeno coincide con los patrones morfológicos comunes que presenta la especie.

En medios ricos en carbono, *B. cinerea* presenta un micelio aéreo denso y color blanco – grisáceo durante sus primeras etapas de crecimiento, esto es de gran importancia ya que, permite diferenciar la fase vegetativa antes del inicio de la fase reproductiva del microorganismo. Así mismo, varios autores indican que existe una variabilidad fenotípica entre aislamientos, sin embargo, los cultivos mantienen su morfología característica, la cual permite una correcta identificación en cultivos puros; esta variabilidad se ve reflejado en las tasas de crecimiento, esporulación y formación de esclerocios (cuerpos de resistencia), pero no altera el crecimiento micelial inicial (Meng et al., 2020).



La evaluación microscópica del aislado fúngico 17-00-34 mediante el método de microcultivo y tinción con azul de lactofenol permitió visualizar las estructuras típicas fúngicas de *Botrytis cinerea* en su fase anamorfa. En la Figura 15 se identificaron conidióforos erectos con ramificaciones apicales en forma de “árbol”, característica distintiva del género *Botrytis*,

los cuales sostienen grupos densos de conidios maduros (A-B-C-E). Así mismo, se observaron conidios dispersos con forma ovoidal, hialinos y unicelulares encargados de la propagación asexual de la especie (F), además del desarrollo temprano de cuerpos de resistencia (esclerocios) (D). El desarrollo de estas estructuras sugiere la correcta manipulación, crecimiento de cultivos puros bajo condiciones controladas de microcultivo y que el cultivo tuvo capacidad reproductiva normal.

Al comparar estos resultados con la literatura, se observa una alta similitud con las descripciones reportadas por Fekrikohan et al. (2024) quienes indican que estas características estructurales se pueden presentar en condiciones normales. Los conidióforos pueden presentar terminaciones delgadas o engrosadas con variaciones según el aislado y el medio de cultivo. Además, los conidios se describen de forma ovalada, elipsoidal, piriforme o globosa, con un tamaño de $3 - 9 \times 3 - 9 \mu\text{m}$ y con la probabilidad de presentar septos. Por último, la literatura también menciona que estas estructuras constituyen el principal método de propagación asexual y tienen la capacidad de exhibir una amplia variación morfológica. La morfología registrada en el estudio coincide plenamente con los patrones descritos.

Detalle microscópico del hongo *B. cinerea*

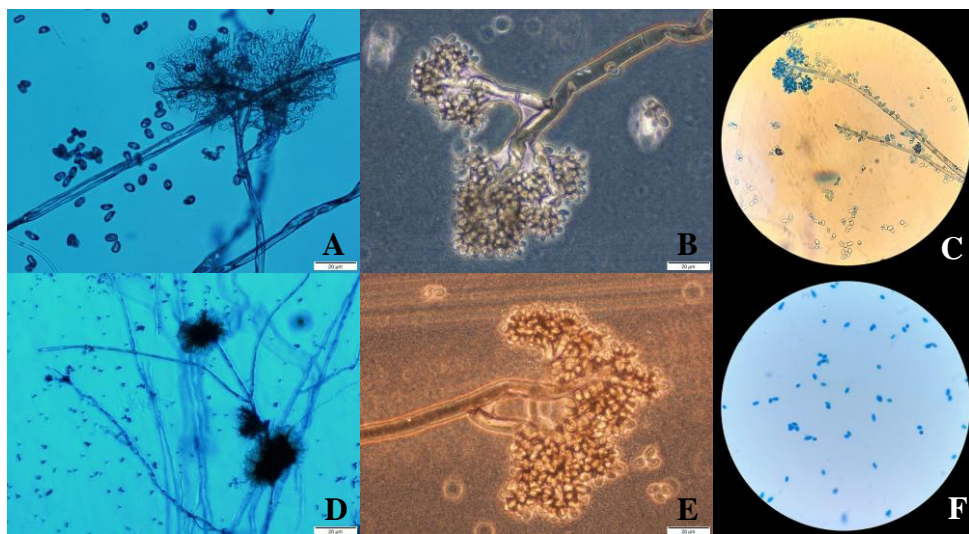


Figura 15 Estructuras morfológicas microscópicas de la muestra 17-00-34

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (A-B-C-E) Conidióforos con conidios en ramificación apical; (D) Esclerocios; (F) Conidios ovoides. Escala de barra: 20 µm.

4.2.1.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

Los resultados obtenidos de la caracterización macroscópica del hongo *C. gloeosporioides* evidenciaron la presencia de micelio aéreo de textura lanosa y algodonosa, crateriforme con bordes externos planos de color blanco y anillos concéntricos grisáceos ligeramente elevados, de igual manera, se detectaron masas de esporas mucilaginosas de color naranja dispuestas alrededor del crecimiento fúngico y la aparición de exudados miceliales en forma de gotas superficiales. Por el contrario, el reverso de la colonia mostró halos circulares y dispersos de color negro alrededor del disco de inoculación (Figura 16).

Según lo reportado por Rodríguez et al. (2025) quienes en su estudio exhiben características morfológicas de un aislado del género *Colletotrichum* sp. de la mazorca de cacao, mencionan que en el 78 % de los cultivos fúngicos analizados predominó el micelio superficial de color gris y en el 62,7 % el reverso de las colonias fue de color negro, de igual

manera, reportaron que en el 51,79 % la textura era pulverulenta seguido en un 37,5 % de algodonosa, por último, únicamente en el 19,64 % de los casos hubo la formación de anillos concéntricos. Cabe destacar que, el patrón de crecimiento observado en la muestra 014-25-00308 es similar y coincide con lo reportado por el autor, tomando en cuenta que ambas investigaciones se realizaron bajo las mismas condiciones de temperatura y tiempo de incubación, con diferencias en el medio de cultivo empleado.

Por otro lado, Valdés et al. (2017) confirmaron que la presencia de masas conidiales de textura viscosa y de color naranja producto de la secreción de acérvulos maduros y carentes de setas, son rasgos de diagnóstico claves para la identificación de *C. gloeosporioides*; mientras que, los exudados miceliales no son considerados como un factor distintivo del fitopatógeno, y su aparición está relacionada por la exposición del cultivo a distintas temperaturas. En cambio, Otero et al. (2021) mencionan que la capacidad infectiva del hongo se ve potenciada mediante la síntesis de enzimas hidrolíticas extracelulares, las cuales, son secretadas con otras sustancias en forma de residuos metabólicos que se visualizan en la superficie del micelio.

Cultivo puro del hongo *C. gloeosporioides*

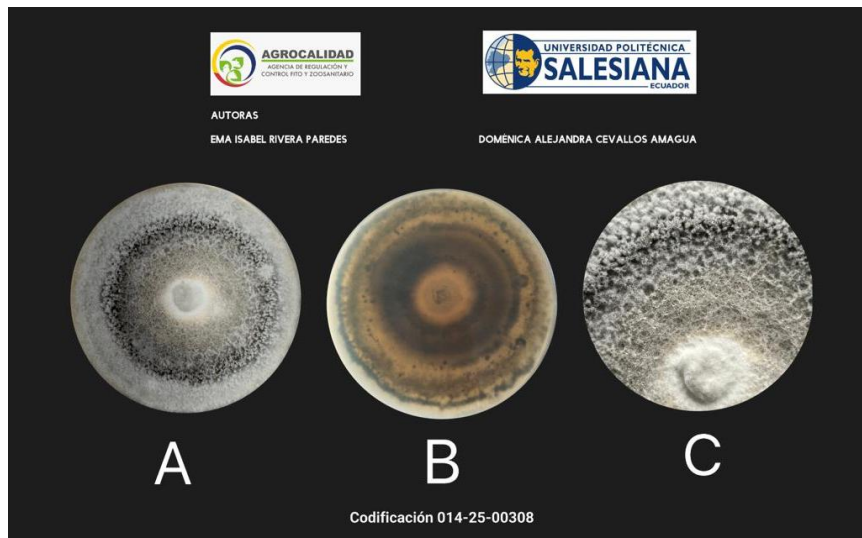
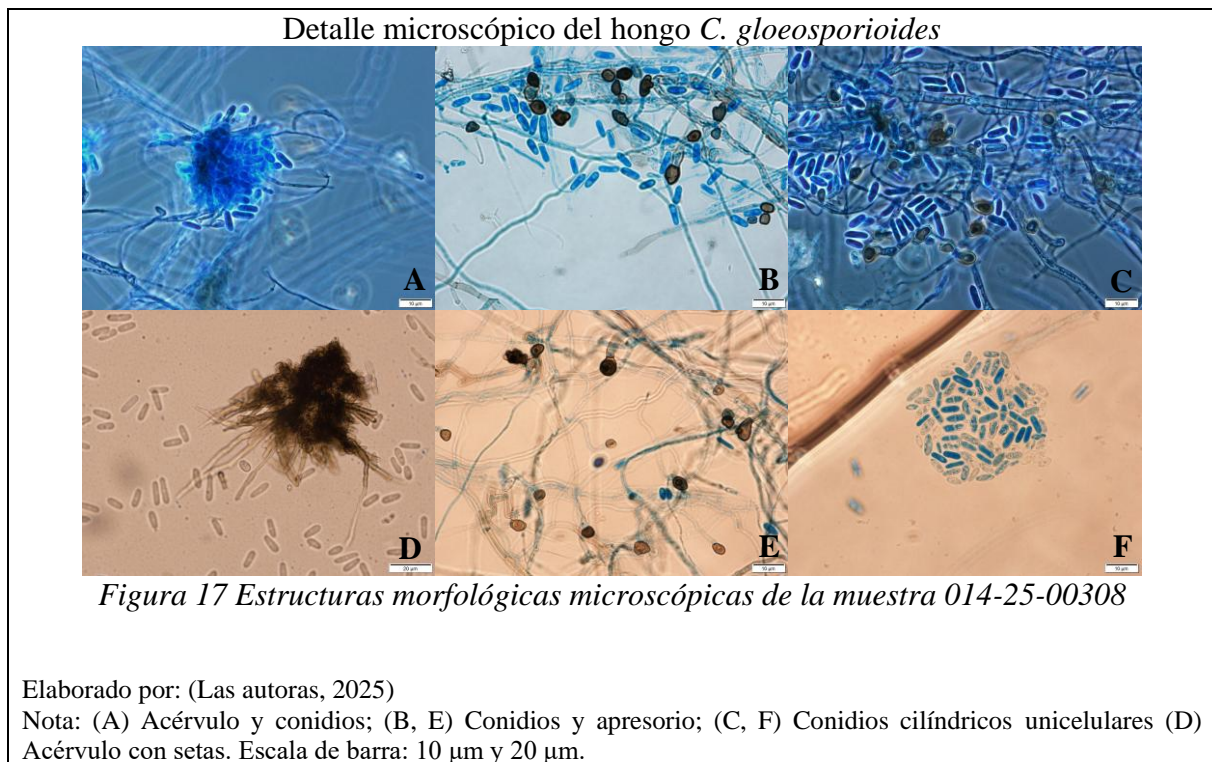


Figura 16 Resultados patrón de crecimiento macroscópico de la muestra 014-25-00308

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (A) Anverso, micelio grisáceo y crateriforme; (B) Reverso, halos circulares y (C) Micelio con textura lanosa.

A partir de las tinciones con azul de lactofenol fue posible observar microscópicamente las distintas estructuras que caracterizan a *C. gloeosporioides* (Figura 17). En primera instancia, se distinguió la presencia de acérvulos, los cuales se describen como agrupaciones de conidios y setas cortas de coloración oscura, de igual manera, las esporas asexuales se caracterizaron por ser hialinas, cilíndricas y rectas con extremos redondeados. Conviene señalar que, en cultivos de más de siete días de incubación se pudo identificar apresorios terminales con forma ovoide e irregular de color marrón oscuro conectados a los tubos germinativos. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Rodríguez et al. (2025) y Valdés et al. (2017).



4.2.2 Indicador metabólico *BIOLOG*

Los resultados del análisis de la actividad metabólica de ambos hongos fitopatógenos se obtuvieron al séptimo día de incubación mediante la comparación de los datos calculados de turbidez y colorimetría con los valores de umbral establecidos por el software. De modo que, la muestra 17-00-34 (Figura 18) se confirmó con el 100 % de probabilidad como *Botrytis cinerea* Persoon BGA (Anexo 14), mientras que, la identidad de la muestra 014-25-00308 (Figura 19) se reportó con el 99 % de probabilidad como *Colletotrichum gloeosporioides* Penzig & Saccardo BGA (Anexo 15). Es fundamental señalar que, el sistema BIOLOG maneja patrones metabólicos específicos y el reconocimiento e identificación del microorganismo se limita a cepas puras y aislados recientes de hongos esporulantes, lo que respalda que, los cultivos fúngicos empleados para este trabajo de investigación se mantuvieron en condiciones axénicas y en periodos de incubación adecuados evitando la degeneración fenotípica y posibles alteraciones en las respuestas fisiológicas de las especies fúngicas (BIOLOG, 2010).

Microplaca *BIOLOG FF*

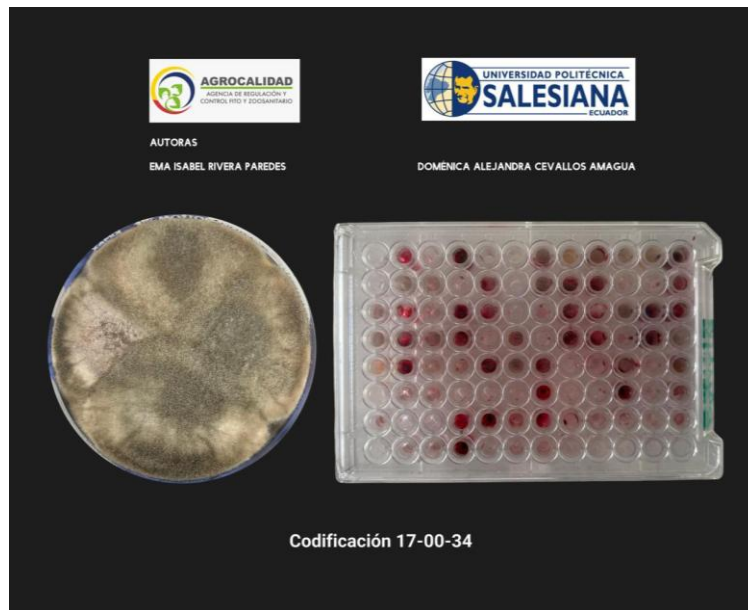


Figura 18 Patrón metabólico del hongo B. cinerea

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Microplaca *BIOLOG FF*



Figura 19 Patrón metabólico del hongo C. gloeosporioides

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

4.2.3 Indicador molecular

4.2.3.1 Identificación molecular de *Botrytis cinerea*

La electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % evidenció una amplificación correcta y específica para la especie de *Botrytis cinerea* con los dos pares de primers utilizados (Figura 20). En el lado izquierdo del gel, correspondiente a los primers C_{729+/-} se muestran bandas únicas e intensas pertenecientes a dos productos PCR amplificados alrededor de los 760 pb. La identificación de la especie mediante este par de primers C_{729+/-} demuestra su alta especificidad de detección molecular de *B. cinerea*. De acuerdo con lo descrito por Aoujil et al. (2025) estos cebadores permiten una identificación específica y sensible del fitopatógeno, ya que generan un fragmento aproximado de 700 pb, concordante con el tamaño esperado y respaldando la fiabilidad de los resultados obtenidos.

De manera similar, en el lado derecho del gel se visualizan las dos reacciones amplificadas con los primers BC₁₀₈₊ y BC₅₆₃₋, mostrando bandas definidas en 480 pb según el marcador de peso molecular, obteniéndose de igual manera resultados positivos para *B. cinerea* y confirmado la identidad del patógeno. Estos resultados concuerdan con lo planteado por Rigotti et al. (2006), quienes indican que este par de primers fueron diseñados dentro de la secuencia de 760 pb amplificada por C_{729+/-}, permitiendo generar fragmentos de 480 pb y 360 pb según el tipo de aislado analizado, y descartando la amplificación de otras 26 cepas del género *Botrytis* (incluyendo *B. allii*, *B. fabae* o *Fusarium* sp.), lo que confirma su gran especificidad para el fitopatógeno.

Amplificación de *B. cinerea*

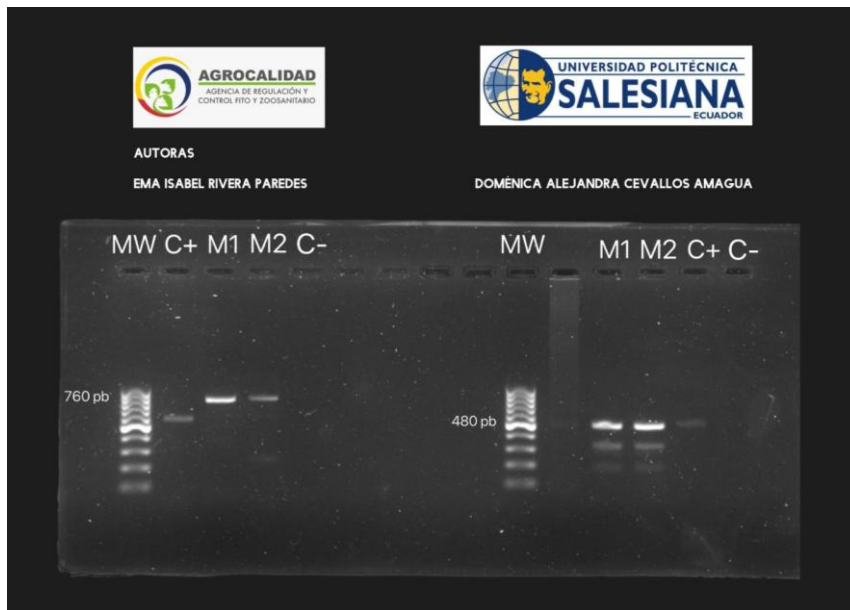


Figura 20 Resultados electroforesis con primers $C_{729+/-}$ y $BC_{108+/563-}$ para muestra 17-00-34

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (MW) Marcador de peso molecular de 1Kb; (M1) Muestra 17-00-34 pase 1; (M2) Muestra 17-00-34 pase 2; (C+) Control positivo; (C-) Control negativo.

4.2.3.2 Identificación molecular de *Colletotrichum gloeosporioides*

A partir del ensayo de diagnóstico por PCR de la muestra 014-25-00308 y sus subcultivos, los primers MKCgF y MKCgR permitieron registrar bandas de ADN fúngico amplificadas a los 380 pb según el marcador de peso molecular empleado (Figura 21), obteniéndose un resultado positivo para *C. gloeosporioides* y confirmando la presencia del fitopatógeno. Esto coincide con lo reportado por Kamle et al. (2013), quienes mencionan que al utilizar primers de secuencias específicas de la especie, la detección es más rápida, más precisa y sensible, reduciendo el riesgo de amplificaciones cruzadas con otras especies del género *Colletotrichum* estrechamente relacionadas como son *C. accutatum*, *C. falcatum* y *C. capsici*.

Amplificación de *C. gloeosporioides*

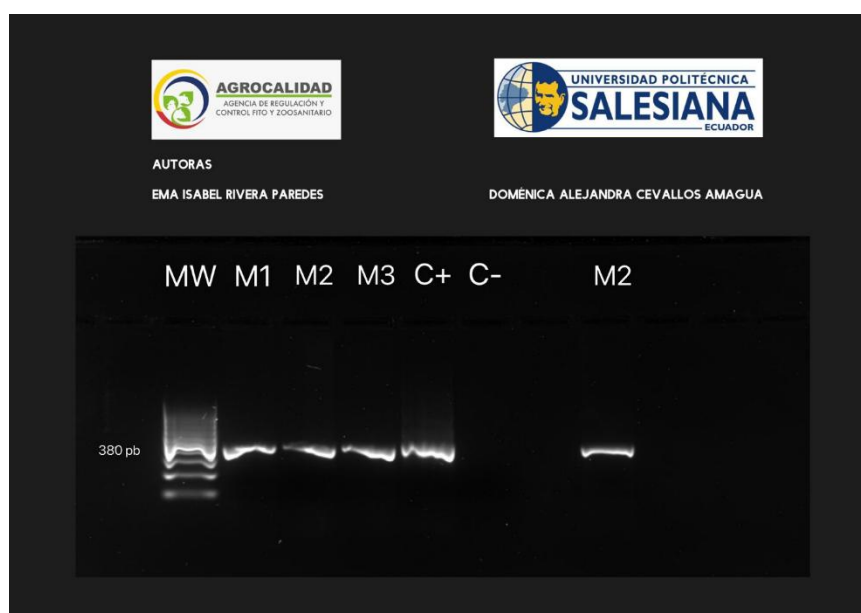


Figura 21 Resultados electroforesis con primers MKCg_{F/R} para muestra 014-25-00308

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (MW) Marcador de peso molecular de 1Kb; (M1) Muestra 014-25-00308 pase 1; (M2) Muestra 014-25-00308 pase 2; (M3) Muestra 014-25-00308 pase 3; (C+) Control positivo; (C-) Control negativo.

4.3 Porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR)

4.3.1 *Bacillus* spp. Vs *Botrytis cinerea*

En la prueba de antagonismo realizada frente a *Botrytis cinerea* por cultivos duales con siete días de incubación, manifestaron alteraciones del fitopatógeno al estar expuestos a los diferentes tratamientos. Por su parte, en el control positivo se observó una reducción del crecimiento fúngico alrededor del triángulo que delimita su desarrollo. Así mismo, en los tratamientos bacterianos correspondientes a las cepas AEC-00215, AEC-00256, AEC-00257, AEC-00258 y AEC-00259 mostraron varios niveles de proliferación micelial evidenciado por la presencia de zonas claras alrededor de la inoculación bacteriana. Finalmente, el control negativo mostró una extensión continua del hongo desde el punto central hasta los bordes de la placa (Figura 22).

Ensayo de antagonismo en *B. cinerea*



Figura 22 Resultados aplicación de tratamientos bacterianos frente a *B. cinerea*

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (C+) Amonio cuaternario al 20%; (A) AEC-00215; (B) AEC-00256; (C) AEC-00257; (D) AEC-00258; (E) AEC-00259; (C-) Agua.

El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados ($F = 3,47$; $p = 0,0360$), mostrando que los porcentajes de inhibición de los tratamientos son diferentes entre sí. A partir de esta significación, se aplicó la prueba post hoc de Duncan ($\alpha = 0,05$), la cual permitió identificar la agrupación estadística de los tratamientos.

Como se muestra en la Tabla 13 las cepas AEC-00258 (73,98 %), AEC-00215 (71,55 %) y AEC-00259 (71,54 %) conformaron el grupo A; de acuerdo con la clasificación detallada por Corrales et al. (2010) estos valores corresponden a un nivel de inhibición positiva (70-100 %). Estos porcentajes de inhibición se pueden deber a la actividad bioquímica y metabólica de cada especie evaluada.

En el caso de *B. subtilis* (AEC-00258) según lo descrito por Bu et al. (2021) la cepa ha demostrado la producción de metabolitos antifúngicos como lipopéptidos, proteasas y enzimas degradadoras de pared celular que afectan directamente a la integridad del fitopatógeno; así

mismo, en ensayos *in vitro* obtuvieron actividad fungistática de $39,63 \% \pm 4,73 \%$ y en pruebas *in vivo* (frutos tratados) un porcentaje de $86,57 \% \pm 2,55 \%$, siendo la concentración 10^8 UFC/mL la que genera el efecto inhibitorio.

De manera similar *B. pumilus* (AEC-00215) logró un alto porcentaje de inhibición, lo cual es congruente con los mecanismos descritos para esta especie, ya que, conforme con lo señalado por Dobrzyński, Jakubowska, et al. (2023) esta cepa sintetiza varios lipopéptidos como surfactina, pumilacidina y moléculas pertenecientes a la familia de las iturinas, las cuales son las responsables de su acción inhibitoria al detener el crecimiento micelial y la germinación de conidios de *B. cinerea*.

Así mismo, el desempeño de *B. amyloliquefaciens* (AEC-00259) se asemeja a lo reportado por Altieri et al. (2023) quienes indican que la cepa bacteriana presenta inhibición mediante antibiosis, debido a la producción de lipopéptidos, proteínas antifúngicas, enzimas líticas y compuestos volátiles, limitando el desarrollo de estructuras fúngicas, así mismo, destacan que la eficacia del agente antagónico incrementa luego de 6 a 9 días de colonización.

En conjunto, los porcentajes registrados en el grupo A reflejan la acción de los compuestos bioactivos secretados por cada especie, por lo que, sustenta la clasificación de estas dentro del nivel de inhibición positiva, confirmando su potencial como agentes de biocontrol.

Por su parte, la cepa AEC-00257 presentó una media de $65,85 \%$ ubicándola simultáneamente en los grupos A y B, indicando que no difiere de los tratamientos de ambos grupos y clasificándose dentro del rango de inhibición media ($40-69 \%$). Por último, el control positivo (C+) ($60,98 \%$) y la cepa AEC-00256 ($60,16 \%$) se clasificaron dentro del grupo B, registrando las medias más bajas del estudio, ambos dentro del nivel de inhibición media según la escala utilizada.

Respecto a las cepas de *Bacillus megaterium* (AEC-00256 y AEC-00257), su actividad antagónica encaja con lo que establece Acurio & García (2024), quienes señalan que la actividad antagónica se asocia a la producción de metabolitos secundarios destacando los lipopéptidos antifúngicos (iturina A, fengicina A), además se suma el mecanismo de antibiosis (secreción de compuestos antimicrobianos) y paralelamente la competencia por espacio y nutrientes. Si bien se observaron diferencias de porcentaje de inhibición entre las cepas evaluadas, estas no implicaron una variación en el nivel inhibitorio, ya que ambas se mantuvieron dentro del mismo rango, lo cual concuerda con lo reportado por la literatura, donde se menciona que las cepas pertenecientes a una misma especie no necesariamente presentan diferencias significativas, aun cuando se evidencien variaciones en sus valores porcentuales (Acurio & García, 2024).

Finalmente, la eficacia de amonio cuaternario (C+) para el control de *Botrytis cinerea* es coherente con el mecanismo de acción de este compuesto químico. Tal como indican (Vereshchagin et al., 2021), los QACs (compuestos de amonio cuaternario) ocasionan alteraciones en la integridad de la membrana celular, provocando desorden estructural y pérdida de funcionalidad de la célula, produciendo la muerte del microorganismo. En conjunto, los resultados sugieren que las cepas de *B. megaterium* poseen una actividad biocontroladora semejante al desempeño del amonio cuaternario, con la ventaja de producir una alternativa sostenible.

Tabla 13 Resultados del análisis estadístico con prueba post hoc de Duncan para B. cinerea

Tratamientos	Codificación	Media PICR +/- d.e.	Agrupación
T4	AEC-00258	73,98 +/- 6,14	A
T1	AEC-00215	71,55 +/- 9,86	A
T5	AEC-00259	71,54 +/- 1,41	A
T3	AEC-00257	65,85 +/- 2,44	A B
T0	Amonio cuaternario 20 %	60,98 +/- 2,44	B

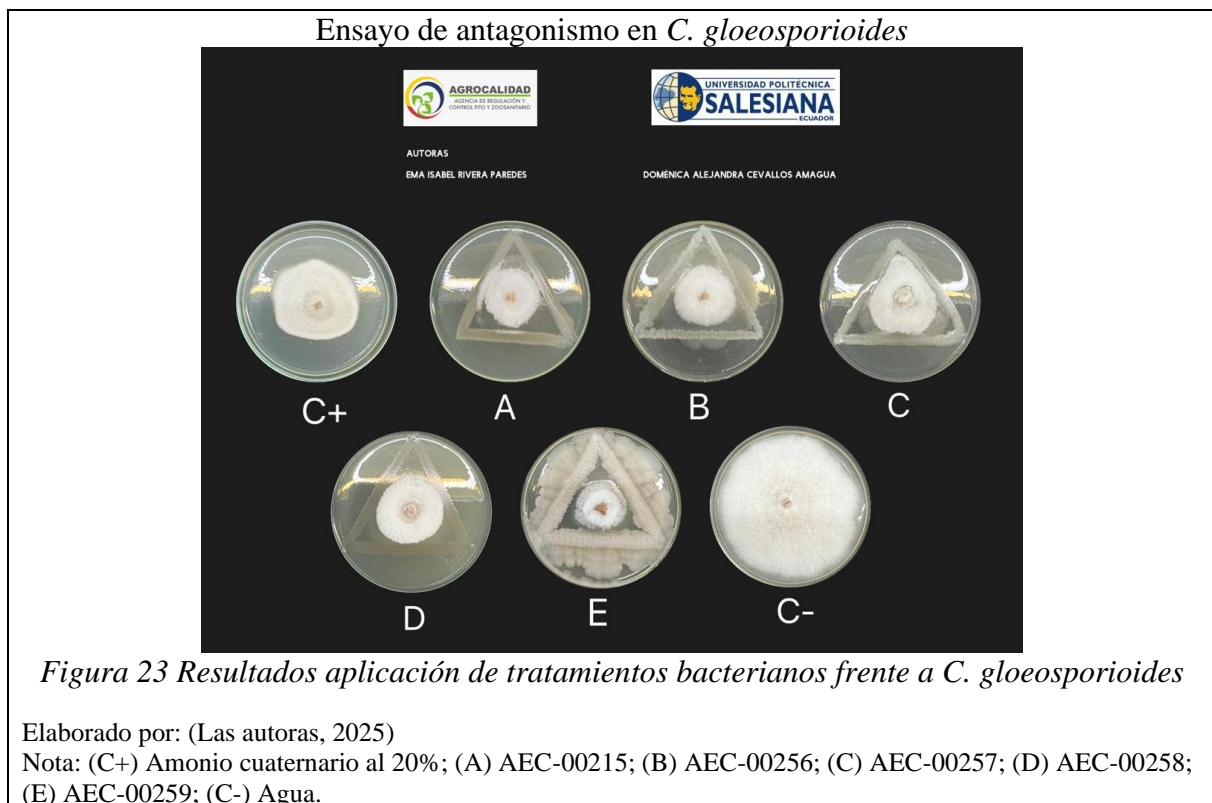
T2	AEC-00256	60,16 +/- 5,63	B
-----------	------------------	-----------------------	----------

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (PICR) Porcentaje de inhibición de crecimiento radial; (d.e.) Desviación estándar; Valores promedios agrupados con la misma letra son estadísticamente similares.

4.3.2 *Bacillus* spp. Vs *Colletotrichum gloeosporioides*

La actividad antagónica de las bacterias del género *Bacillus* spp. se evidenció mediante el ensayo de cultivo dual, en el cual el crecimiento del hongo fitopatógeno *C. gloeosporioides* se vio limitado al estar expuesto a los distintos tratamientos. Los resultados demostraron que las cinco cepas evaluadas (AEC-00215, AEC-00256, AEC-00257, AEC-00258 y AEC-00259) tienen la capacidad de inhibir al hongo, al reducir significativamente su desarrollo micelial en contraste con los controles positivo y negativo, al séptimo día de estudio (Figura 23).



Según lo expuesto previamente, los datos obtenidos del porcentaje de inhibición de crecimiento radial (PICR) determinaron que el tratamiento 5 (T5) perteneciente a la cepa AEC-00259 obtuvo los mejores resultados al exhibir el efecto inhibitorio más elevado con un valor medio de 69,05 % y agrupación (A) según la prueba post hoc de Duncan a una confianza del

95 % (Tabla 14). El valor obtenido en este ensayo se destacó por ser mínimamente superior al reportado por Martínez et al. (2025) quienes al evaluar el enfrentamiento de *B. amyloliquefaciens* frente a un aislado del género *Colletrotrichum*, registraron datos comprendidos entre el 54,27 % y el 68,11 % de inhibición. Cabe destacar que, en el registro fotográfico de esta cepa, se evidenció una dinámica paralela al controlar el crecimiento del hongo por competencia de espacio y por la síntesis de compuestos bioactivos que propiciaron la formación de un halo de inhibición (Anexo 16).

A su vez, el tratamiento con la segunda media más alta en la inhibición de *C. gloeosporioides* es el T4, alcanzando un valor de PICR de 53,97 % con agrupación en A y B, lo que indica que no hay diferencia estadística significativa con los otros tratamientos. El valor de inhibición registrado para la cepa AEC-00258 difiere notablemente de los datos publicados por Martínez et al. (2025) y Ruiz et al. (2014) quienes determinaron un antagonismo positivo con el 72,08 % e intervalos de 74,4 % y 80,6 % respectivamente. De esta forma, los datos reflejan que la bacteria *B. subtilis* empleada en esta investigación no tiene el mismo efecto antagónico que las cepas utilizadas por los otros autores. Este hecho podría atribuirse a la variabilidad genética a nivel de cepa, la cual está influenciada por factores ambientales como lo afirman Jiménez et al. (2018) quienes manifiestan que la biosíntesis de compuestos fúngicos depende de las condiciones de crecimiento de la bacteria, su capacidad de adaptación y respuesta al entorno.

Por otro lado, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos bacterianos restantes (T1, T2 y T3) con el tratamiento químico (T0), por lo que, la prueba de comparación múltiple de Duncan los agrupó con la letra B. Los resultados de la actividad biocontroladora de las cepas de *B. megaterium* AB4 (T2) y CT11 (T3) se aproximan a los alcanzados por Corrales et al. (2010) para el control del fitopatógeno de género *Fusarium*

spp. en el que se presentó una inhibición de 53,99 %. Conviene resaltar que, la interacción entre hongo y los tratamientos bacterianos T2 y T3, provocó el crecimiento inusual del micelio (Anexo 17). La inhibición producida por el T1 con un valor de PICR de 48,41 % se comparó con los datos de Castañeda & Sánchez (2016) donde al emplear una cepa nativa de *B. pumilus* frente al hongo *Fusarium*, se obtuvo una inhibición de 70,6 %.

El efecto del amonio cuaternario al 20 % de concentración frente a *C. gloeosporioides* demuestra que el compuesto químico es menos efectivo que los tratamientos biológicos aplicados. El PICR obtenido del T0 en esta investigación se reportó con la media más baja de 40,48 %, lo que concuerda con los resultados de Peng et al. (2022) al tener un valor de 43,72 % en el uso de un derivado de sales de amonio cuaternario tetrahidrogenarico a una concentración del 25 % frente al mismo fitopatógeno.

De acuerdo con la escala establecida por Corrales et al. (2010) (Tabla 9) todos los tratamientos se clasificaron en un nivel de antagonismo medio, al actuar como agentes fungistáticos y fungicidas contra *C. gloeosporioides*; esto se fundamenta con lo descrito por Valenzuela et al. (2024) quienes señalan que los procesos de competencia bacteriana, la producción de compuestos antimicrobianos y la síntesis de enzimas líticas se promueve debido a la activación de 89 genes. Por otro lado, Koumoutsi et al. (2004) y R et al. (2021) destacan que el efecto inhibitor de las bacterias se debe a la síntesis de lipopéptidos cíclicos codificados por clústeres génicos conocidos como péptidos de síntesis no ribosomal (NRPS). En cambio, Márquez et al. (2024) recalcan que la separación evolutiva de las especies de *Bacillus*, puede desencadenar la pérdida de la capacidad de producción de compuestos de control biológico, lo que explicaría la variación en el PICR de cada especie y sus cepas.

Tabla 14 Resultados del análisis estadístico con prueba post hoc de Duncan para C. gloeosporioides

Tratamientos	Codificación	Media PICR +/- d.e.	Agrupación
T5	AEC-00259	69,05 +/- 4,12	A
T4	AEC-00258	53,97 +/- 5,50	A B
T2	AEC-00256	50,79 +/- 9,91	B
T1	AEC-00215	48,41 +/- 14,55	B
T3	AEC-00257	46,83 +/- 3,64	B
T0	Amonio cuaternario 20 %	40,48 +/- 9,53	B

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (PICR) Porcentaje de inhibición de crecimiento radial; (d.e.) Desviación estándar; Valores promedios agrupados con la misma letra son estadísticamente similares.

5 Conclusiones y recomendaciones

Mediante las pruebas de diagnóstico morfológico, metabólico y molecular se logró confirmar que la identidad de las cepas bacterianas con potencial biocontrolador pertenecen al género *Bacillus* spp., mientras que, las cepas fúngicas patógenas se identificaron como *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

Las cepas de *Bacillus* spp. ejercen un efecto inhibitorio significativo frente a *Botrytis cinerea* al obtener un *p*-valor de 0,0360 y para *Colletotrichum gloeosporioides* un *p*-valor de 0,0307, lo que asegura el potencial de las especies bacterianas como agentes de biocontrol *in vitro*, y constituyen una alternativa sostenible frente al uso de compuestos químicos en la erradicación de ambos hongos fitopatógenos.

Las cinco cepas de *Bacillus* spp. presentaron efectos positivos bajo condiciones de laboratorio. En el caso de *B. cinerea*, las cepas AEC-00258 (*B. subtilis*), AEC-00215 (*B. pumilus*) y AEC-00259 (*B. amyloliquefaciens*) fueron las más efectivas debido a sus altos porcentajes de inhibición, mientras que, *C. gloeosporioides*, alcanzó en todos los tratamientos un antagonismo medio siendo la cepa AEC-00259 (*B. amyloliquefaciens*) la de mayor respuesta inhibitoria.

La implementación de las cepas de *Bacillus* fue clave para establecer nuevas perspectivas en el estudio del control de hongos fitopatógenos. En este contexto, se recomienda repetir el ensayo incorporando nuevas especies del género, como *B. thuringiensis* y *B. velezensis*, considerando sus propiedades biofuncionales. Conjuntamente, resulta pertinente evaluar si distintas concentraciones bacterianas potencian o retrasan la producción de antibióticos y enzimas de degradación. Finalmente, en vista de que la investigación se desarrolló bajo condiciones controladas de laboratorio, se sugiere analizar el comportamiento y la respuesta de *Bacillus* a factores ambientales cambiantes, con el fin de aproximar su eficacia a escenarios de campo.

6 Bibliografía

- Abbey, J., Alzohairy, S., Neugebauer, K., Hatlen, R., & Miles, T. (2024). Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* and identification of *Botrytis* species associated with blueberry in Michigan. *Frontiers in Microbiology*, *15*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1425392>
- Acurio, R., & García, J. (2024). Effect of *Bacillus megaterium* on strawberry crop. *Agronomía Mesoamericana*, *35*. <https://doi.org/10.15517/am.2024.59611>
- AGDIA. (2020). *User Guide: ACP-ELISA Bacterial Reagent Set*. www.agdia.com/info@agdia.comhttp://docs.agdia.com/DataSheets.aspx.
- Altieri, V., Rossi, V., & Fedele, G. (2023). Biocontrol of *Botrytis cinerea* as Influenced by Grapevine Growth Stages and Environmental Conditions. *Plants*, *12*(19). <https://doi.org/10.3390/plants12193430>
- Andriani, Y., Rochima, E., Safitri, R., & Rahayuningsih, S. (2017). Characterization of *Bacillus megaterium* and *Bacillus mycoides* Bacteria as Probiotic Bacteria in Fish and Shrimp Feed. *KnE Life Sciences*, *2*(6), 127. <https://doi.org/10.18502/cls.v2i6.1029>
- Anith, K. N., Nysanth, N. S., & Natarajan, C. (2021). Novel and rapid agar plate methods for in vitro assessment of bacterial biocontrol isolates' antagonism against multiple fungal phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, *73*(2), 229–236. <https://doi.org/10.1111/lam.13495>
- Aoujil, F., El Ghdaich, C., Hourmatallah, I., Yahyaoui, H., Hafidi, M., Aziz, A., & Habbadi, K. (2025). Phenotypic, Pathogenic, and Genetic Diversity of *Botrytis cinerea* Isolates from Moroccan Vineyards. *Microbiology Research*, *16*(10), 219. <https://doi.org/10.3390/microbiolres16100219>
- Arce, C., Varela, I., & Torres, S. (2019). Inhibición del crecimiento micelial de hongos asociados a antracnosis en ñame (*Dioscorea alata*). *Agronomía Mesoamericana*, 381–393. <https://doi.org/10.15517/am.v30i2.32653>
- Armijo, G., Schlechter, R., Agurto, M., Muñoz, D., Nuñez, C., & Arce, P. (2016). Grapevine pathogenic microorganisms: Understanding infection strategies and host response scenarios. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7, Number MAR2016). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00382>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. In *Journal of Pharmaceutical Analysis* (Vol. 6, Number 2, pp. 71–79). Xi'an Jiaotong University. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Banco Central del Ecuador. (2025). *Estadísticas del sector externo. Principales Productos no Petroleros de Exportación*. BCE. https://contenido.bce.fin.ec/documentos/informacioneconomica/SectorExterno/ix_ComercioExterior.html
- Barros, A., Rangseekaew, P., Lasudee, K., Pathom-aree, W., & Manzanera, M. (2020). Regulatory risks associated with bacteria as biostimulants and biofertilizers in the frame of the European Regulation (EU) 2019/1009. In *Science of the Total Environment* (Vol. 740). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140239>

- Ben Khedher, S., Kilani, O., Dammak, M., Jabnoun, H., Daami, M., & Tounsi, S. (2015). Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. *Comptes Rendus. Biologies*, 338(12), 784–792. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2015.09.005>
- BIOLOG. (2010). *C - BIOLOG_IU - FF Microplate 2010*.
- Brown, A., & Tuite, M. (1998). *Methods in Microbiology Volume 26*.
- Bu, S., Munir, S., He, Pengfei, Li, Y., Wu, Y., Li, X., Kong, B., He, Pengbo, & He, Y. (2021). *Bacillus subtilis* L1-21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 157. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104568>
- Bunk, B., Schulz, A., Stammen, S., Münch, R., Warren, M., Rohde, M., Janh, D., & Biedendieck, R. (2010). *Una historia corta sobre un gran insecto mágico*. <https://doi.org/https://doi.org/10.4161/bbug.1.2.11101>
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., & Weir, B. S. (2012). *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73, 181–213. <https://doi.org/10.3114/sim0014>
- Castañeda, E., & Sánchez, L. C. (2016). Evaluación del crecimiento de cuatro especies del género *Bacillus* sp., primer paso para entender su efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. *Nova*, 14(26), 53–62. <https://doi.org/10.22490/24629448.1751>
- Cedeño, E., & Dilas, J. (2022). Producción y exportación del cacao ecuatoriano y el potencial del cacao fino de aroma. *Qantu Yachay*, 2(1), 08–15. <https://doi.org/10.54942/qantuyachay.v2i1.17>
- Cheung, N., Tian, L., Liu, X., & Li, X. (2020). The destructive fungal pathogen *Botrytis cinerea*—insights from genes studied with mutant analysis. In *Pathogens* (Vol. 9, Number 11, pp. 1–46). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110923>
- Corrales, L., & Caycedo, L. (2020). Principios físicoquímicos de los colorantes utilizados en microbiología Principios físicoquímicos de los colorantes. *Nova*, 18(33), 73–100. <https://doi.org/10.22490/24629448.3701>
- Corrales, L., Sánchez, L., Cuervo, J., Bautista, D., González, Lady, & Guevara, M. (2010). Evaluación del efecto biocontrolador de *Bacillus* spp., frente a *Fusarium* spp., bajo condiciones de invernadero en *Rosmarinus officinalis* L. *Nova*, 8(13), 63–75. <https://doi.org/10.22490/24629448.440>
- Coutte, F., Lecouturier, D., Ait Yahia, S., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., & Dhulster, P. (2010). Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 499–507. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2504-8>
- De Bashan, L. E., Hernandez, J. P., Bashan, Y., & Maier, R. M. (2010). *Bacillus pumilus* ES4: Candidate plant growth-promoting bacterium to enhance establishment of plants in mine tailings. *Environmental and Experimental Botany*, 69(3), 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.04.014>

- Deng, T., Wang, L., & Zhu, T. (2025). Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* D39 and Identification of Its Antimicrobial Proteins Active Against Chestnut Blight. *Microorganisms*, 13(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms13061302>
- Dobrzyński, J., Jakubowska, Z., Kulkova, I., Kowalczyk, P., & Kramkowski, K. (2023). Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 14). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1194606>
- Dobrzyński, J., Wróbel, B., & Górska, E. B. (2023). Taxonomy, Ecology, and Cellulolytic Properties of the Genus *Bacillus* and Related Genera. In *Agriculture (Switzerland)* (Vol. 13, Number 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/agriculture13101979>
- Elmer, P. A. G., & Reglinski, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 55(2), 155–177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01348.x>
- Fekrikohan, S., Sharifnabi, B., Javan, M., Pollastro, S., Faretra, F., & De Miccolis, R. (2024). Genetic and Phenotypic Characterization of *Botrytis* Populations from Economic and Wild Host Plants in Iran. *Journal of Fungi*, 10(11). <https://doi.org/10.3390/jof10110764>
- Flores, P., & Capa, M. (2024). Estrategias competitivas para exportación de uva ecuatoriana como fruta no tradicional hacia Corea del Sur. *593 Digital Publisher CEIT*, 9(3), 84–97. <https://doi.org/10.33386/593dp.2024.3.2365>
- Gaitán, R., Mata, G., Pérez, R., & Salmones, D. (2006). *Manual práctico del cultivo de setas: aislamiento, siembra y producción* (L. Sánchez, J. A. Piña, & A. Villada, Eds.; 1era. ed.).
- Gañán, L., Álvarez, E., & Castaño Zapata, J. (2015). Identificación genética de aislamientos de *Colletotrichum* spp. causantes de antracnosis en frutos de aguacate, banano, mango y tomate de árbol. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 39(152), 339–347. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.192>
- Gautam, A. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, Pathogenicity and Management in India. *Journal of Plant Physiology & Pathology*, 02(02), 1. <https://doi.org/10.4172/2329-955X.1000125>
- GBIF. (2023). *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. GBIF. <https://doi.org/https://doi.org/10.15468/39omei>
- González, L., Manrique, M., Montilla, P., Rojas, T., Perelli, A., & Calzolaio, V. (2010). Identificación de flora fúngica en una empresa procesadora de alimentos del estado Carabobo Identification of Fungal Flora in a Food Processing Company in the State of Carabobo. In *Kasmera* (Vol. 38, Number 1).
- González, R., Elizalde, B., Cortés, M., & Orduña, M. (2020). *Las tinciones básicas en el Laboratorio de Microbiología: Un enfoque gráfico*. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://www.zaragoza.unam.mx/wp-content/Portal2015/publicaciones/libros/cbiologicas/libros/Tinciones.pdf>
- González, Y., Ortega, J., Anducho, M. A., & Mercado, Y. (2022). *Bacillus subtilis* y *Trichoderma*: Características generales y su aplicación en la agricultura. *TIP Revista*

- Granados, Raquel., & Villaverde, Carmen. (1997). *Microbiología. Volume 2* (Thomson Editores Spain, Ed.). Paraninfo.
- Gupta, P., Ravi, I., & Sharma, V. (2013). Induction of β -1,3-glucanase and chitinase activity in the defense response of *Eruca sativa* plants against the fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Journal of Plant Interactions*, 8(2), 155–161. <https://doi.org/10.1080/17429145.2012.679705>
- Gutiérrez, M. D. (2017). Figuras de control biológico para el manejo de las principales enfermedades en el cultivo de uva (*Vitis* spp.). *Fitopatología*, 1–9. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.34626.25288>
- Harwood, C. (1989). *Bacillus*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-3502-1>
- Herrera, A., Toledo, E., Aguirre, J. L., Romero, Y., Ramos, J., Palemón, F., & Toribio, J. (2020). Antagonic and plant growth-promoting effects of bacteria isolated from mine tailings at El Fraile, Mexico. *Revista Argentina de Microbiología*, 52(3), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2019.08.003>
- Hur, A., Saoudi, M., Ferhout, H., Mzali, L., Taillandier, P., & Bouajila, J. (2024). *Bacillus megaterium*: Evaluation of Chemical Nature of Metabolites and Their Antioxidant and Agronomics Properties. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(6). <https://doi.org/10.3390/ijms25063235>
- INEC, & ESPAC. (2025). *Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua*. [Cas.ups.edu.ec/sso/login?service=https://portal.ups.edu.ec/c/portal/login&service=https://portal.ups.edu.ec/c/portal/login](https://portal.ups.edu.ec/c/portal/login&service=https://portal.ups.edu.ec/sso/login?service=https://portal.ups.edu.ec/c/portal/login&service=https://portal.ups.edu.ec/c/portal/login)
- Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas. (2018). *Ficha técnica de Especies de uso forestal y agroforestal de la Amazonía colombiana 26 cacao*. https://sinchi.org.co/files/PUBLICACIONES%20DIGITALES/Fichas%20Tecnicas%20agroforestal/Fichas%20Tecnicas%20de%20Especies%20de%20uso%20Forestal%20y%20Agroforestal%20de%20la%20Amazonia%20Colombiana_26%20CACAO.pdf
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2022). *Catálogo de cultivares de cacao en Ecuador*. https://www.researchgate.net/publication/358249119_Catalogo_cultivares_cacao_Ecuador_2021
- Jiménez, R., Valdés, S. E., Olalde, V., Abraham, R., & García, J. L. (2018). Efecto del pH y temperatura sobre el crecimiento y actividad antagónica de *Bacillus subtilis* sobre *Rhizoctonia solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(2), 256–275. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1711-3>
- Kamle, M., Pandey, B., Kumar, P., & Kumar, M. (2013). A Species-Specific PCR Based Assay for Rapid Detection of Mango Anthracnose Pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and Sacc. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, 04(06), 1–5. <https://doi.org/10.4172/2157-7471.1000184>

- Kanazawa, S. (2024). Aplicaciones de los Metabolitos Secundarios Generados por *Bacillus Subtilis* en el Periodo 2002 – 2022. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 8(5), 529–541. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i5.13362
- Koumoutsis, A., Chen, X.-H., Henne, A., Liesegang, H., Hitzeroth, G., Franke, P., Vater, J., & Borriss, R. (2004). Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 186(4), 1084–1096. <https://doi.org/10.1128/JB.186.4.1084-1096.2004>
- Latorre, B. A., Elfar, K., & Ferrada, E. E. (2015). Gray mold caused by *Botrytis cinerea* limits grape production in Chile. *Ciencia e Investigación Agraria*, 42(3), 1–1. <https://doi.org/10.4067/S0718-16202015000300001>
- Leboffe, M., & Pierce, B. (2010). *A Photographic Atlas for the Microbiology Laboratory 4th EDITION*. www.morton-pub.com
- León, B., Alca, J., Rosas, J., Robles, E., Zamudio, P., & García, L. (2024). Endophytic fungi associated with *Vitis vinifera* with antibiosis capacity against *Botrytis cinerea*. *Agronomía Mesoamericana*, 35. <https://doi.org/10.15517/am.2024.56193>
- Li, B., He, X., Guo, S., Li, D., Wang, Y., Meng, X., Dai, P., Hu, T., Cao, K., & Wang, S. (2024). Characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* BA-4 and its biocontrol potential against *Fusarium*-related apple replant disease. *Frontiers in Plant Science*, 15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1370440>
- Liang, M., Feng, A., Wang, C., Zhu, X., Su, J., Xu, Z., Yang, J., Wang, W., Chen, K., Chen, B., Lin, X., Feng, J., & Chen, S. (2024). *Bacillus amyloliquefaciens* LM-1 Affects Multiple Cell Biological Processes in *Magnaporthe oryzae* to Suppress Rice Blast. *Microorganisms*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12061246>
- Luan, P., Yi, Y., Huang, Y., Cui, L., Hou, Z., Zhu, L., Ren, X., Jia, S., & Liu, Y. (2023). Biocontrol potential and action mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* DB2 on *Bipolaris sorokiniana*. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1149363>
- MacFaddin, J. F. (2004). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica* (Editorial Medica Panamericana, Ed.; 3era edición). Lippincott Williams & Wilkins.
- Maget, R., & Peypoux, F. (1994). Iturins, a special class of pore-forming lipopeptides: biological and physicochemical properties. *Toxicology*, 87(1–3), 151–174. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0300-483X(94)90159-7)
- Márquez, J., Martínez, A., Cervantes, E., Ruiz, A., Romero, J., Ortega, M., Parra, F., & de los Santos, S. (2024). Phylogenomic diversity and genome mining of type *Bacillus* species: Searching for genes associated with biological control of phytopathogens. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 42(2), 1–19. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2402-9>
- Martínez, K., Ríos, K., Rubio, S., Reyes, J., & Osorio, E. (2025). Microorganismos edáficos de *Saccharum officinarum* antagonismo de *Bacillus* spp. contra *Colletotrichum* spp. y

- Endocalyx spp. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 12(2), 1–18. <https://doi.org/10.19136/era.a12n2.4093>
- Méndez, J. M., Flores, M. S., & Páramo, L. A. (2018). Aislamiento e identificación de *Bacillus subtilis* y evaluación del antagonismo in vitro frente hongos fitopatógenos. *Nexo Revista Científica*, 30(2), 96–110. <https://doi.org/10.5377/nexo.v30i2.5530>
- Mendoza, E., Cervantes, X., & Zamora, E. (2022). Recorrido histórico de la importancia del cacao para la economía de Ecuador. *Sinergias Educativas*, 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.37954/se.vi.193>
- Meng, L., Mestdagh, H., Ameye, M., Audenaert, K., Höfte, M., & Van Labeke, M. (2020). Phenotypic Variation of *Botrytis cinerea* Isolates Is Influenced by Spectral Light Quality. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01233>
- Miłek, J., & Lamkiewicz, J. (2022). The starch hydrolysis by α -amylase *Bacillus* spp.: an estimation of the optimum temperatures, the activation and deactivation energies. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 147(24), 14459–14466. <https://doi.org/10.1007/s10973-022-11738-1>
- Miljaković, D., Marinković, J., & Balešević, S. (2020). The significance of bacillus spp. In disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops. In *Microorganisms* (Vol. 8, Number 7, pp. 1–19). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8071037>
- Ministerio de Agricultura Ganadería y Pesca. (2025). Participación del Sector Agrícola en el PIB Nacional y VAB Agropecuario Nominal - Anual. In *SIPA-MAG*. https://view.officeapps.live.com/op/view.aspx?src=https%3A%2F%2Fsipa.agricultura.gob.ec%2Fdescargas%2Fbase-estadistica%2Fmodulo_economico%2Fvalor-agregado-bruto-agropecuario.xlsx&wdOrigin=BROWSELINK
- Molina, D., Baez, R., Castañeda, L., Fuentes, L., Bustillos, M., Rodríguez, O., Morales, Y., Munive, A., Quintero, V., & Muñoz, J. (2020). Antagonism assays to identify bacterial strains producing antimicrobial compounds. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 43(2), 374–377.
- Moreira, A. A., Cedeño, Á. V., Canchignia, F., & Garcés, F. R. (2021). *Lasiodiplodiatheobromae*(Pat.) Griffon & Maubl [(syn.) *Botryodiplodia theobromae* Pat] in the cocoa crop: symptoms, biological cycle, and strategies management. *Scientia Agropecuaria*, 12(4), 653–662. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2021.068>
- Ongena, M., & Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16(3), 115–125. <https://doi.org/10.1016/J.TIM.2007.12.009>
- Otero, A., Pérez, Y., Reboledo, G., Lira, V., Padilla, D., Folch, J. L., Sánchez, M. D. R., Ponce, I., & Batista, R. A. (2021). *Physcomitrium patens* infection by *colletotrichum gloeosporioides*: Understanding the fungal–bryophyte interaction by microscopy, phenomics and RNA sequencing. *Journal of Fungi*, 7(8). <https://doi.org/10.3390/jof7080677>

- Parihar, S., & Sharma, D. (2021). A Breif Overview on *Vitis vinifera*. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*, *10*(12), 231–239. <https://doi.org/10.36347/sajp.2021.v10i12.005>
- Pedroza, A. (2015). *Guía Didáctica de Manejo Integrado Fitosanitario* (1era. ed.). <https://www.researchgate.net/publication/282850956>
- Pei, Y., Tao, Q., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Li, Z., Qi, X., Xu, J., Zhang, M., Chen, H., Chang, X., Tang, H., Sui, L., & Gong, G. S. (2019). Phenotypic and genetic characterization of *Botrytis cinerea* population from kiwifruit in Sichuan Province, China. *Plant Disease*, *103*(4), 748–758. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-18-0707-RE>
- Peng, Y., Chang, J., Xiao, Z., Huang, J., Xu, T., Chen, S., Fan, G., Liao, S., Wang, Z., & Luo, H. (2022). Synthesis and Antifungal Activity of Novel Tetrahydrogeranyl Quaternary Ammonium Salts. *Natural Product Communications*, *17*(2), 1–10. <https://doi.org/10.1177/1934578X221078452>
- Pertot, I., Caffi, T., Rossi, V., Mugnai, L., Hoffmann, C., Grando, M. S., Gary, C., Lafond, D., Duso, C., Thiery, D., Mazzoni, V., & Anfora, G. (2017). A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. *Crop Protection*, *97*, 70–84. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.025>
- Pishchik, V., Filippova, P., Mirskaya, G., Khomyakov, Y., Vertebny, V., Dubovitskaya, V., Ostankova, Y., Semenov, A., Chakrabarty, D., Zuev, E., & Chebotar, V. (2021). Epiphytic pggpb bacillus megaterium afi1 and paenibacillus nicotianae afi2 improve wheat growth and antioxidant status under ni stress. *Plants*, *10*(11). <https://doi.org/10.3390/plants10112334>
- Plasencia, A. H., Vilchez, C. R., Ferrer, Y., & Veloz, C. E. (2022). Efecto del cambio climático sobre la distribución potencial del hongo *Moniliophthora roreri* y el cultivo de cacao (*Theobroma cacao*) en Ecuador continental. *REVISTA TERRA LATINOAMERICANA*, *40*. <https://doi.org/10.28940/terra.v40i0.1151>
- Portela, D. D., Chaparro, A., & López, S. A. (2013). La biotecnología de *Bacillus thuringiensis* en la agricultura. *Nova*, *11*(20), 87–96. <https://doi.org/10.22490/24629448.1031>
- QIAGEN. (2016). *DNeasy® Plant Mini Kit*. www.qiagen.com/safety
- R, S., Nakkeeran, S., Saranya, N., Senthilraja, C., Renukadevi, P., Krishnamoorthy, A. S., El Enshasy, H. A., El-Adawi, H., Malathi, V. G., Salmen, S. H., Ansari, M. J., Khan, N., & Sayyed, R. Z. (2021). Mining the Genome of *Bacillus velezensis* VB7 (CP047587) for MAMP Genes and Non-Ribosomal Peptide Synthetase Gene Clusters Conferring Antiviral and Antifungal Activity. *Microorganisms*, *9*(12), 1–18. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122511>
- Realpe, M. E., Hernández, C., & Agudelo, C. I. (2002). *Especies del género Bacillus: morfología macroscópica y microscópica*. <https://doi.org/https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i2.1148>
- Reboledo, G., Del Campo, R., Alvarez, A., Montesano, M., Mara, H., & Ponce de León, I. (2015). *Physcomitrella patens* Activates Defense Responses against the Pathogen

- Colletotrichum gloeosporioides. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(9), 22280–22298. <https://doi.org/10.3390/ijms160922280>
- Resende, M. L. V., Nojosa, G. B. A., Cavalcanti, L. S., Aguilar, M. A. G., Silva, L. H. C. P., Perez, J. O., Andrade, G. C. G., Carvalho, G. A., & Castro, R. M. (2002). Induction of resistance in cocoa against *Crinipellis pernicioso* and *Verticillium dahliae* by acibenzolar-S -methyl (ASM). *Plant Pathology*, 51(5), 621–628. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2002.00754.x>
- Rigotti, S., Gindro, K., Richter, H., & Viret, O. (2002). Characterization of molecular markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) using PCR. *FEMS Microbiology Letters*, 209(2), 169–174. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11127.x>
- Rigotti, S., Viret, O., & Cindro, K. (2006). Two new primers highly specific for the detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. 45, 253–260. https://doi.org/https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1833
- Rodríguez, N. D., Gómez, I., López, G., Chávez, B., & Estrada, P. (2025). Isolation and Biological Control of *Colletotrichum* sp. Causing Anthracnosis in *Theobroma cacao* L. in Chiapas, Mexico. *Journal of Fungi*, 11(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/jof11040312>
- Ruiz, E., Mejía, M., Cristóbal, J., Valencia, A., & Reyes, A. (2014). Actividad antagónica de filtrados de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.)*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5, 1325–1332. <https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v5i7.877>
- Saint-Pierre, G., Henríquez, D., Paredes, L., & Gaete, M. (2022). *Bacillus amyloliquefaciens* as an excellent agent for biofertilizer and biocontrol in agriculture: An overview for its mechanisms. In *Microbiological Research* (Vol. 259). Elsevier GmbH. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127016>
- San Miguel, G. de J., Alemán, M. E., Ramírez, G. B., & Navarro, D. P. (2024). *Bacillus*: Una bacteria versátil, multifuncional y ampliamente aplicada. In *Biología y Sociedad* (Vol. 7, pp. 73–81). <https://doi.org/10.29105/bys7.13-108>
- Sánchez, D., Pérez, J., & David Hinestroza, H. (2016). Efecto de las PGPB sobre el crecimiento *Pennisetum clandestinum* bajo condiciones de estrés salino. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 18(1), 65–72. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n1.50413>
- Santander, A., Rodríguez, E., Toapanta, C., & Suárez, R. (2022). La *Vitis vinifera*, un caso de estudio en el viñedo Chaupi Estancia, provincia de Pichincha. *Siembra*, 9(2), e3731. <https://doi.org/10.29166/siembra.v9i2.3731>
- Schaad, N. W. ., Jones, J. B. ., & Chun, Wesley. (2001). *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society. <https://ia800604.us.archive.org/13/items/LaboratoryGuideForI/laboratory%20guide%20for%20i.pdf>
- Schumacher, J. (2017). How light affects the life of *Botrytis*. In *Fungal Genetics and Biology* (Vol. 106, pp. 26–41). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.06.002>

- Sharma, M., & Kulshrestha, S. (2015). Colletotrichum gloeosporioides: An Anthracnose Causing Pathogen of Fruits and Vegetables. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 12(2), 1233–1246. <https://doi.org/10.13005/bbra/1776>
- Solís, J. L., & Zamarripa, A. (2013). *Jatropha curcas L. Alternativa Bioenergética en México* (Primera edición). <https://www.researchgate.net/publication/294873398>
- Talhinhas, P., & Baroncelli, R. (2021). Colletotrichum species and complexes: geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Diversity*, 110(1), 109–198. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00491-9>
- Tamayo, J., Arroba, E., Pérez, V., & Córdova, A. B. (2024). Producción y comercialización del sector agrícola en el Ecuador. *Revista de Investigación SIGMA*, 11, 191–205. <https://doi.org/https://doi.org/10.24133/zcqpss24>
- Tasaki, S., Nakayama, M., & Shoji, W. (2017). Morphologies of Bacillus subtilis communities responding to environmental variation. *Development, Growth & Differentiation*, 59(5), 369–378. <https://doi.org/10.1111/dgd.12383>
- Terrones, J., Nieto, D., Nava, C., Téliz, D., García, R., Vallejo, M. R., & Sánchez, P. (2019). Botrytis cinerea causante del moho gris en frutos de zarzamora en México. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 37(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-1>
- Thermo Fisher Scientific. (2025). *Thermo Scientific™ Disco de microdasa*. <https://www.fishersci.es/shop/products/remel-microdase-discs/10250483>
- Tigselema, S., Vera, J., Ordoñez, S., Segovia, G., Vásconez, G., & Rosero, J. (2018). Elaboración de chocolate de siete genotipos experimentales de cacao (Theobroma cacao L.) seleccionados en la Finca Experimental La Represa. *Revista Ciencia y Tecnología*, 11(2), 39–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.18779/cyt.v11i2.257>
- Torregrosa, L., Vialet, S., Adivèze, A., Iocco-Corena, P., & Thomas, M. R. (2015). Grapevine (Vitis vinifera L.). *Methods in Molecular Biology*, 1224, 177–194. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1658-0_15
- Torres, M., Guillén, C. A., Luna, M., Ortiz, C. F., De la Cruz, A., Arias, L., & Cappello, S. (2025). Diversidad fúngica asociada a patologías de Theobroma cacao en Tabasco, México. *Biotecnia*, 27, e2219. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v27.2219>
- Tortora, G., Funke, B., & Case, C. (2017). *Introducción a la microbiología 12.a edición* (Editorial Medica Panamericana, Ed.; 12.a edición). Pearson Education.
- Trópicos. (2025). *Theobroma cacao L.* Tropicos. <https://www.tropicos.org/name/30400642>
- Valdés, L. A., Calero, D. L., Gómez, A., Carballo, M. E., Capote, M., González, I., Alvarez, J. M., & Rohde, W. (2017). Caracterización morfológica, cultural y patogénica de aislados de Colletotrichum sp. produciendo antracnosis en mango (Mangifera indica L.). *La Granja*, 26(2), 38–51. <https://doi.org/10.17163/lgr.n26.2017.04>
- Valenzuela, V., Gándara, A., Villarreal, M. F., Villa, E. D., Parra, F. I., Santoyo, G., Gómez, L. J., Cira, L. A., & de los Santos, S. (2024). Regulation, Biosynthesis, and Extraction of

- Bacillus-Derived Lipopeptides and Its Implications in Biological Control of Phytopathogens. *Stresses*, 4(1), 107–132. <https://doi.org/10.3390/stresses4010007>
- Vereshchagin, A., Frolov, N., Egorova, K., Seitkalieva, M., & Ananikov, V. (2021). Quaternary ammonium compounds (Qacs) and ionic liquids (ils) as biocides: From simple antiseptics to tunable antimicrobials. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Number 13). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22136793>
- Villarreal, M. F., Villa, E. D., Cira, L. A., Estrada, M. I., Parra, F. I., & De los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1), 95–130. <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>
- Villarreal, M., Villa, E., Cira, L., Estrada, M., Parra, F., & De los Santos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1706-5>
- Wharton, P., & Diéguez, J. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 61(1), 3–22. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2004.v61.i1.61>
- Zakaria, L. (2021). Diversity of *Colletotrichum* Species Associated with Anthracnose Disease in Tropical Fruit Crops—A Review. *Agriculture*, 11(297), 1–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/agriculture11040297>
- Zalila, I., Ben, A., & Al, R. (2023). *Bacillus amyloliquefaciens*: Harnessing Its Potential for Industrial, Medical, and Agricultural Applications—A Comprehensive Review. In *Microorganisms* (Vol. 11, Number 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092215>
- Zhenxiang, L., Weina, G., & Chang, L. (2018). Isolation, identification and characterization of novel *Bacillus subtilis*. *Journal of Veterinary Medical Science*, 80(3), 427–433. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0572>

Anexo I Convenio específico AGROCALIDAD



Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosario

CONVENIO INDIVIDUAL PARA LA REALIZACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN ENTRE LA AGENCIA DE REGULACIÓN Y CONTROL FITO Y ZOONOSARIO Y SRta. DOMINICA ALEJANDRA CEVALLOS AMAGUA, ESTUDIANTE DE LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA.

Comparecen en la suscripción del presente convenio individual para la realización de trabajo de titulación, por la Agencia de Regulación Fito y Zoonosario una parte, a quien en adelante y para efectos de este convenio se le denominará "La Agencia", y por otra parte la estudiante, Doménica Alejandra Cevallos Amagua, portadora de la cédula de ciudadanía número 1726276332, por sus propios derechos, a quien para efectos de este mismo acuerdo se le denominará "La Tesisista".

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

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

PRIMERA.- ANTECEDENTES.-

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

LEY ORGÁNICA DE EDUCACIÓN SUPERIOR

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

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

Art. 87.- Establece como requisito previo a la obtención del título que: "El/los y las estudiantes deberán secretar servicios a la comunidad mediante programas, proyectos de innovación con la sociedad, etc."/.



Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosario

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

REGLAMENTO INTERNO PARA LA ADMINISTRACIÓN DEL TALENTO HUMANO

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

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

"Art. 83.- Procedimiento para recepción de tesisistas.- Para la realización de la tesis o proyectos finales previos a su titulación, la autoridad de la institución educativa del interesado deberá emitir una solicitud formal a la máxima Autoridad o su delegado de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosario, solicitando autorización para realizar el proyecto de tesis."/>

"Art. 86.- Acuerdo de Confidencialidad para los tesisistas.- Todo tesisista deberá firmar un acuerdo de confidencialidad, la información institucional que se le proporcione se guardará bajo la política de confidencialidad de la institución, la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosario podrá utilizar la información producto de la tesis para las fines que considere pertinentes."

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

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

Con el oficio sin numeración del 22 de junio de 2025, la Directora de la carrera de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana, Dra. María Elena Maldonado, solicitó al Sr. Patricio Almeida, Director Ejecutivo de "La Agencia", autorización para que la estudiante Srta. Doménica Alejandra Cevallos Amagua, realice su proyecto de titulación en "La Agencia".

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

8.- "La Agencia" ha informado con oficio Nro. AGR-AGROCALIDAD/DAN-2025-00028-Of del 22 de agosto de 2025, que la estudiante ha sido aceptada para que realice el tema de investigación.

Dirección: Av. Eloy Alfaro 930 350 Av. Amazonas
Cajapá postal: 17038 Balón Ecuador
Teléfono: +593 1 301 8100
www.agrocalidad.gub.ec



Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosario

SEGUNDA.- OBJETO.-

Con los antecedentes expuestos, "La Agencia" acepta y autoriza que la estudiante, Doménica Alejandra Cevallos Amagua, realice su trabajo de titulación denominado: "Evaluación in vitro de cepas de Bacillus sp., para el control de Colletotrichum gloeosporioides y Botrytis cinerea", en las instalaciones de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosario desde el 28 de agosto de 2025 al 16 de enero de 2026, en la Dirección de Diagnóstico Vegetal de la Coordinación General de Laboratorios.

TERCER.- LUGAR Y HORARIOS.-

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

CUARTA.- REMUNERACIÓN.-

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

QUINTA.- OBLIGACIONES DE LA TESISISTA.-

1. Cumplir y someterse a las normas, disposiciones y horarios que se establezcan y que declara de antemano conocer y aceptar.
2. Prestar sus servicios con diligencia, ética y guardando la debida discreción y confidencialidad en los asuntos, que en razón de sus funciones llegare a su conocimiento. Esta obligación de confidencialidad, subsistirá aun dentro de los dos años subsiguientes a la fecha de vencimiento de este acuerdo de Formación Académica.
3. Cuidar y mantener en debida forma los bienes, equipos, documentos, valores, etc., que le fueron entregados para la ejecución de sus labores y que estuviere a su cuidado, responsabilizándose por aquellos daños, pérdidas o deterioros que provengan del uso normal y los sean imputables.
4. Entregar una copia digital del trabajo final de titulación.

SEXTA.- PLAZO.-

El presente convenio iniciará desde el 28 de agosto de 2025 al 16 de enero de 2026, sin lugar al pago de ninguna clase de indemnización.

SEPTIMA.- NATURALEZA DE LA RELACIÓN.-

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

Dirección: Av. Eloy Alfaro 930 350 Av. Amazonas
Cajapá postal: 17038 Balón Ecuador
Teléfono: +593 1 301 8100
www.agrocalidad.gub.ec



Agencia de Regulación y Control Fito y Zoonosario

El seguro estudiantil por riesgos laborales, será cubierto por Seguro Pichincha, con número de póliza 000007017, el mismo que se encuentra vigente hasta el 27 de mayo de 2026, siempre y cuando la estudiante esté matriculada en el período académico correspondiente. Seguro contratado directamente con la Universidad Politécnica Salesiana.

OCTAVA.- JURISDICCIÓN Y COMPETENCIA.-

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

Para la validez y plena eficacia de este instrumento, los comparecientes lo firman en esta ciudad de Quito, el 28 de agosto de 2025, dos ejemplares de igual tenor. Por parte de la institución firmará el Director General de Administración de Recursos Humanos Subrogante o quien haga sus veces.

NOVENA.- CONFIDENCIALIDAD.-

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

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

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

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

Mgs. Josué Rafael Vialabara Novoa
Director General de Administración de Recursos Humanos (S)
C.I.: 1725073645

Dirección: Av. Eloy Alfaro 930 350 Av. Amazonas
Cajapá postal: 17038 Balón Ecuador
Teléfono: +593 1 301 8100
www.agrocalidad.gub.ec



ACCIÓN	RESPONSABLE	CARGO	FIRMA
Elaborado por:	Ing. Meyra Gabriela Escobedo C.C. 1723822510	Analista de Administración de Talento Humano 2	[Firma]
Revisado por:	Mgs. Johana Mijael Calvas Guara C.C. 1723808045	Analista de Administración de Talento Humano 3	[Firma]
Aprobado por:	Mgs. Joséhuar Iván Villafuerte Novoa C.C. 1725073645	Director General de Administración de Recursos Humanos Subrogante	[Firma]

Comparamos en la suscripción del presente convenio individual para la realización de trabajo de titulación, por la Agencia de Regulación y Control Fito y Zootécnico una parte, a quien en adelante y para efectos de este convenio se le denominará "La Agencia", y por otra parte la estudiante, EMA ISABEL RIVERA PAREDES, portadora de la cédula de ciudadanía número 1724582026, por sus propios derechos, a quien para efectos de este mismo acuerdo se le denominará "La Testista".

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

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

PRIMERA.- ANTECEDENTES.-

Art. 353 de la Constitución de la República del Ecuador establece que: "El sistema de educación superior estará articulado al sistema nacional de educación y al Plan Nacional de Desarrollo; se le establecerá los mecanismos de coordinación del sistema de educación superior con la Función Ejecutiva. Este sistema se regirá por los principios de autonomía rectoral, colegialidad, igualdad de oportunidades, calidad, pertinencia, integralidad, autodeterminación para la producción del pensamiento y conocimiento, en el marco del diálogo de saberes, pensamiento universal y producción científica tecnológica global".

LEY ORGÁNICA DE EDUCACIÓN SUPERIOR

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

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

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

Dirección: Av. Cay Mañá 830-300 y Av. Amazonas
Código postal: 17000 (Quito-Ecuador)
Teléfono: +593 1 251 8900
www.agenciaadg.gov.ec

Dirección: Av. Cay Mañá 830-300 y Av. Amazonas
Código postal: 17000 (Quito-Ecuador)
Teléfono: +593 1 251 8900
www.agenciaadg.gov.ec

Art. 134.- De la formación técnica y tecnológica indica: "La formación técnica y tecnológica tiene como objetivo la formación de profesionales de tercer y cuarto nivel técnico-tecnológico orientado al desarrollo de las habilidades y destrezas relacionadas con la aplicación, coordinación, adaptación e innovación técnico-tecnológica en procesos relacionados con la producción de bienes y servicios".

REGlamento INTERNO PARA LA ADMINISTRACIÓN DEL TALENTO HUMANO

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

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

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

"Art. 84.- Acuerdo de Confidencialidad para los testistas.- Todo testista deberá firmar un acuerdo de confidencialidad, la información institucional que se le proporcione se guiará bajo la política de confidencialidad de la institución; la Agencia de Regulación y Control Fito y Zootécnico podrá utilizar la información productiva de la tesis para los fines que considere pertinentes."

"Art. 85.- Del lugar de testistas.- Los testistas tendrán un lugar al mismo que dure la elaboración de tesis en la Agencia de Regulación y Control Fito y Zootécnico. El lugar será nombrado por el jefe del lugar de trabajo, en el cual se realizará la tesis de grado."

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

Con el oficio sin numeración del 22 de julio de 2025, la directora de la carrera de Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana, Dra. María Elena Maldonado, solicitó al Ing. Patricio Almeida, Director Ejecutivo de "La Agencia", autorizar para que la estudiante Sra. EMA ISABEL RIVERA PAREDES, realice su proyecto de titulación en "La Agencia".

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

8.- "La Agencia" ha informado con oficio Nro. AGIR-AGROCALIDAD/DADH-2025-000228-01 del 22 de agosto de 2025, que la estudiante ha sido aceptada para que realice el tema de investigación.

SEGUNDA.- OBJETO.-

Con los antecedentes expuestos, "La Agencia" acepta y autoriza que la estudiante, EMA ISABEL RIVERA PAREDES, realice su trabajo de titulación denominado: "Evaluación in vitro de espores de *Bacillus spp.* para el control de *Callosporium gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*", en las instalaciones de la Agencia de Regulación y Control Fito y Zootécnico desde el 28 de agosto de 2025 al 16 de enero de 2026, en la Dirección de Diagnóstico Vegetal de la Coordinación General de Laboratorios.

TERCER.- LUGAR Y HORARIOS.-

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

CUARTA.- REMUNERACIÓN.-

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

QUINTA.- OBLIGACIONES DE LA TESTISTA.-

1. Cumplir y someterse a las normas, disposiciones y horarios que se establezcan y que declare de antemano conocer y aceptar.
2. Prestar sus servicios con diligencia, ética y guardando la debida discreción y confidencialidad en los asuntos, que en razón de sus funciones lleguen a su conocimiento. Esta obligación de confidencialidad, subsistirá aun dentro de los dos años subsiguientes a la fecha de vencimiento de este acuerdo de Formación Académica.
3. Cuidar y mantener en debida forma los bienes, equipos, documentos, valores, etc., que le fueren entregados para la ejecución de sus labores y que estuviesen a su cuidado, responsabilizándose por aquellos daños, pérdidas o deterioros que provengan del uso normal y los sean imputables.
4. Entregar una copia digital del trabajo final de titulación.

SEXTA.- PLAZO.-

El presente convenio iniciará desde el 28 de agosto de 2025 al 16 de enero de 2026, sin lugar al pago de ninguna clase de indemnización.

SEPTIMA.- NATURALEZA DE LA RELACIÓN.-

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

Dirección: Av. Cay Mañá 830-300 y Av. Amazonas
Código postal: 17000 (Quito-Ecuador)
Teléfono: +593 1 251 8900
www.agenciaadg.gov.ec

Dirección: Av. Cay Mañá 830-300 y Av. Amazonas
Código postal: 17000 (Quito-Ecuador)
Teléfono: +593 1 251 8900
www.agenciaadg.gov.ec

El seguro estudiantil por riesgos laborales, será cubierto por Seguros Pichincha, con número de póliza 0000007017, el mismo que se encuentra vigente hasta el 27 de mayo de 2026, mientras y cuando el estudiante esté matriculado en el período académico correspondiente. Seguro contratado directamente con la Universidad Politécnica Salesiana.

OCTAVA.- JURISDICCIÓN Y COMPETENCIA.-

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

Para la validez y plena eficacia de este instrumento, los comparecientes lo firman en esta ciudad de Quito, el 28 de agosto de 2025, dos ejemplares de igual tenor. Por parte de la institución firmará el Director General de Administración de Recursos Humanos Subrogante o quien haga sus veces.

NOVENA.- CONFIDENCIALIDAD.-

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

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

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

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

Sra. EMA ISABEL RIVERA PAREDES
La Testista
C.C. 1724582026

ACCIÓN	RESPONSABLE	CARGO	FIRMA
Elaborado por:	Ing. Meyra Gabriela Escobedo C.C. 1723822510	Analista de Administración de Talento Humano 2	[Firma]
Revisado por:	Mgs. Johana Mijael Calvas Guara C.C. 1723808045	Analista de Administración de Talento Humano 3	[Firma]
Aprobado por:	Mgs. Joséhuar Iván Villafuerte Novoa C.C. 1725073645	Director General de Administración de Recursos Humanos Subrogante	[Firma]

Dirección: Av. Cay Mañá 830-300 y Av. Amazonas
Código postal: 17000 (Quito-Ecuador)
Teléfono: +593 1 251 8900
www.agenciaadg.gov.ec

Dirección: Av. Cay Mañá 830-300 y Av. Amazonas
Código postal: 17000 (Quito-Ecuador)
Teléfono: +593 1 251 8900
www.agenciaadg.gov.ec

Mgs. Joséhuar Iván Villafuerte Novoa
Director General de Administración de Recursos Humanos (S)
C.I. 1725073645

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

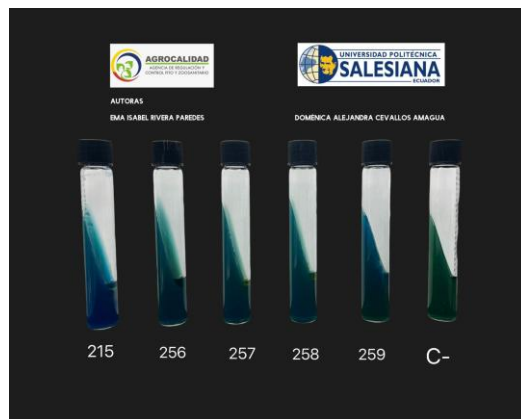
Anexo 2 Características macroscópicas de *Colletotrichum gloeosporioides*



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (A) Anverso, cultivo puro de *C. gloeosporioides*; (B) Reverso, halos circulares alrededor de punto de inoculación & (C) Micelio y masas conidiales.

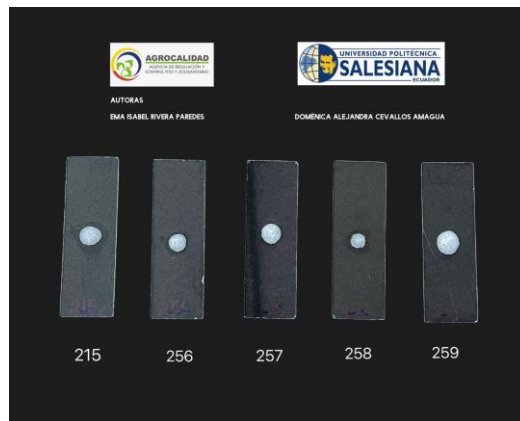
Anexo 3 Resultados fotográficos prueba de citrato



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (215) *B. pumilus*; (256) *B. megaterium* AB4; (257) *B. megaterium* CT11; (258) *B. subtilis*; (259) *B. amyloliquefaciens*; (C-) Tubo sin inocular.

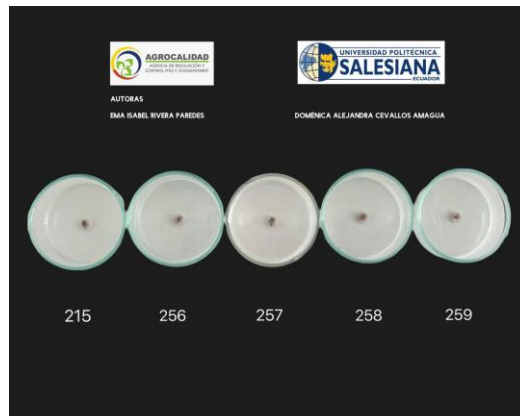
Anexo 4 Resultados fotográficos prueba catalasa



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (215) *B. pumilus*; (256) *B. megaterium* AB4; (257) *B. megaterium* CT11; (258) *B. subtilis*; (259) *B. amyloliquefaciens*.

Anexo 5 Resultados fotográficos prueba oxidasa



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (215) *B. pumilus*; (256) *B. megaterium* AB4; (257) *B. megaterium* CT11; (258) *B. subtilis*; (259) *B. amyloliquefaciens*.

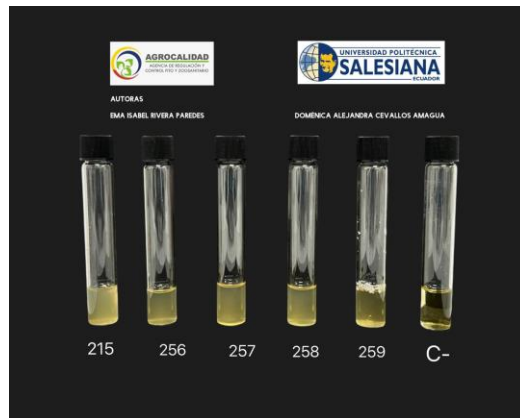
Anexo 6 Resultados fotográficos prueba hidrólisis de caseína



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (215) *B. pumilus*; (256) *B. megaterium* AB4; (257) *B. megaterium* CT11; (258) *B. subtilis*; (259) *B. amyloliquefaciens*; (C-) Placa sin inocular.

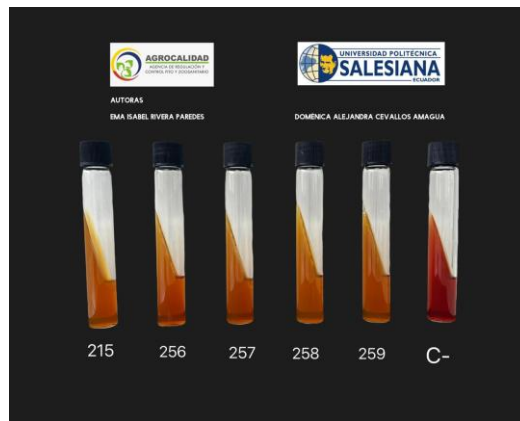
Anexo 7 Resultados fotográficos prueba hidrólisis del almidón



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (215) *B. pumilus*; (256) *B. megaterium* AB4; (257) *B. megaterium* CT11; (258) *B. subtilis*; (259) *B. amyloliquefaciens*; (C-) Tubo sin inocular.

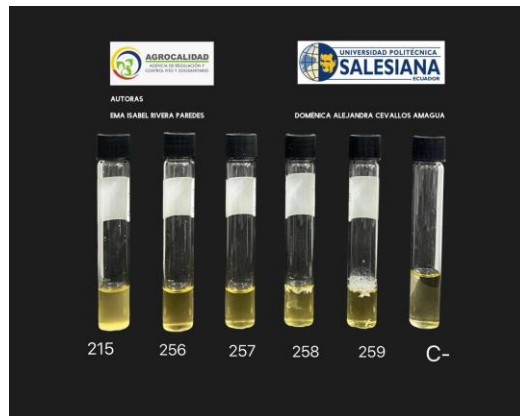
Anexo 8 Resultados fotográficos prueba TSI



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (215) *B. pumilus*; (256) *B. megaterium* AB4; (257) *B. megaterium* CT11; (258) *B. subtilis*; (259) *B. amyloliquefaciens*; (C-) Tubo sin inocular.

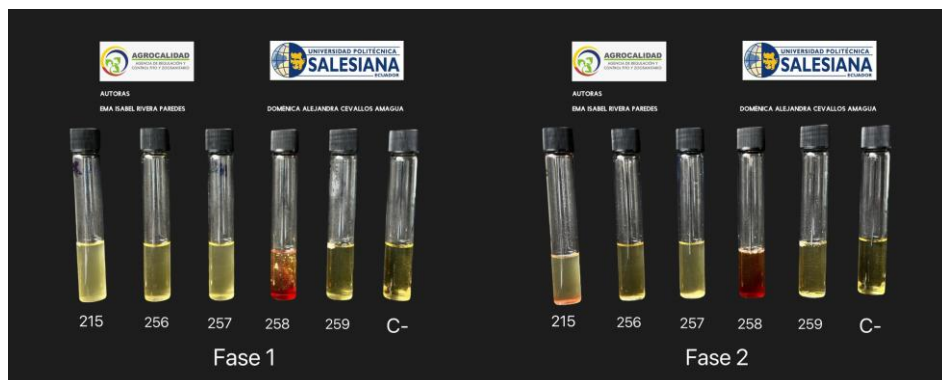
Anexo 9 Resultados fotográficos prueba de crecimiento en NaCl 7 %



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (215) *B. pumilus*; (256) *B. megaterium* AB4; (257) *B. megaterium* CT11; (258) *B. subtilis*; (259) *B. amyloliquefaciens*; (C-) Tubo sin inocular.

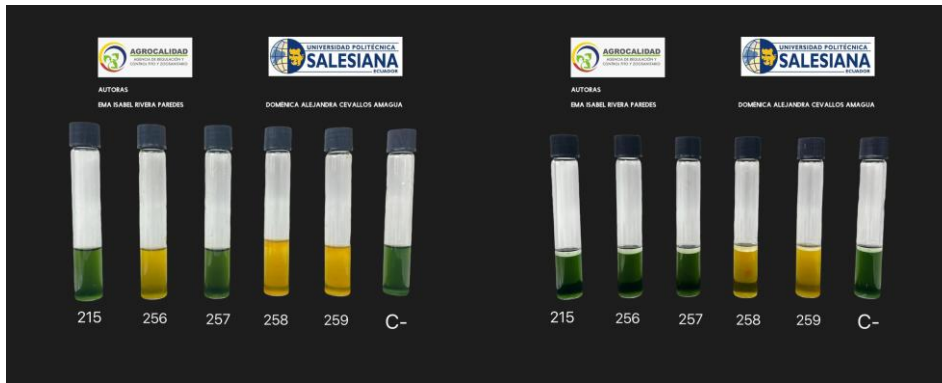
Anexo 10 Resultados fotográficos prueba de reducción de nitratos



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (215) *B. pumilus*; (256) *B. megaterium* AB4; (257) *B. megaterium* CT11; (258) *B. subtilis*; (259) *B. amyloliquefaciens*; (C-) Tubo sin inocular.

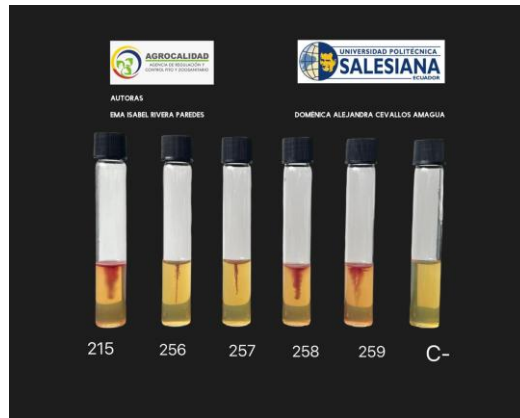
Anexo 11 Resultados fotográficos de prueba óxido fermentativo



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (215) *B. pumilus*; (256) *B. megaterium* AB4; (257) *B. megaterium* CT11; (258) *B. subtilis*; (259) *B. amyloliquefaciens*; (C-) Tubo sin inocular.

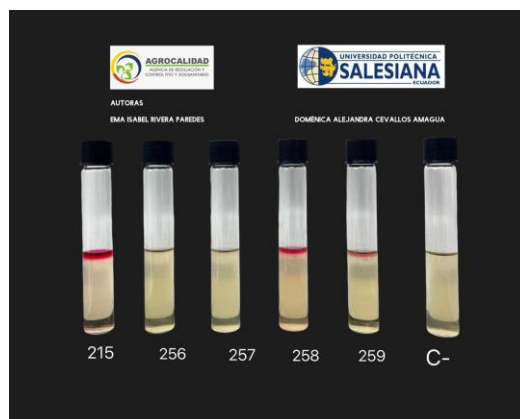
Anexo 12 Resultados fotográficos prueba motilidad



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (215) *B. pumilus*; (256) *B. megaterium* AB4; (257) *B. megaterium* CT11; (258) *B. subtilis*; (259) *B. amyloliquefaciens*; (C-) Tubo sin inocular.

Anexo 13 Resultados fotográficos prueba Voges Proskauer



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (215) *B. pumilus*; (256) *B. megaterium* AB4; (257) *B. megaterium* CT11; (258) *B. subtilis*; (259) *B. amyloliquefaciens*; (C-) Tubo sin inocular.

Anexo 14 Resultados BIOLOG *B. cinerea*

Result	Species ID: Botrytis cinerea Persoon BGA
Comment	
Notice	

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	1.000	0.624	5.814	FF	Botrytis cinerea Persoon BGA
2	0.000	0.000	15.139	FF	Botrytis aclada Fresen.
3	0.000	0.000	15.866	FF	Zygosporium mycophilum (Vuillemin) Saccardo
4	0.000	0.000	16.223	FF	Ulocladium botrytis Preuss BGA

Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

Well Color Values												
Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0+	{ 66 -	-6+	< 168 -	11	28	< 275	< 431	< 464	{ 109	< 276	< 579
B	11	{ 113	< 169	-10	< 428	39	< 358	< 191	< 264	58	-22	< 347
C	7	-7	{ 123	{ 84	< 187	-9	{ 75	< 181	< 525	{ 133	< 246	< 261
D	{ 99	< 397	< 371	< 356	-21	< 406	-14	< 303	< 308	55	< 343	44
E	< 756	{ 111	{ 75	< 172	{ 113	< 499	< 228	42	{ 120	< 250	{ 106	< 600
F	15	< 157	< 459	-14	-10	37	{ 113	-13	28	< 479	{ 74	< 306
G	{ 62	-2	-4	< 179	26+	13	{ 71	< 259	{ 101	< 300	< 150	< 418
H	< 301 -	{ 89	43	< 366	-9	< 154	{ 77	46	1	4	7	19

Well Turbidity Values												
Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0+	< 234 -	-72+	< 1022 -	3	{ 99	< 1533	< 421	< 2278	< 354	< 1378	< 1757
B	< 366	< 1014	< 986	-98	< 1331	{ 38	< 2886	< 488	< 1459	< 162	-136	< 2646
C	< 1627	-222	< 229	< 395	< 725	-117	< 506	< 1090	< 2901	< 1086	< 862	< 1008
D	< 715	< 840	< 2037	< 1400	-114	< 2370	-34	< 1134	< 1208	8	< 1251	< 1016
E	{ 83	< 643	< 675	< 1013	< 962	< 2333	< 894	-96	< 686	< 962	< 144	< 757
F	3	< 267	< 510	-104	-72	-67	< 173	-118	{ 78	< 341	< 182	< 1323
G	< 144	< 1266	-34	< 205	{ 34+	-45	{ 91	< 802	< 142	< 542	< 309	< 808
H	< 936 -	< 902	< 498	< 624	-160	< 566	-3	{ 115	-152	-130	-19	6

Report Date Nov 06 2025 8:36 AM

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Anexo 15 Resultados BIOLOG *C. gloeosporioides*

Result	Species ID: Colletotrichum gloeosporioides Penzig & Saccardo BGA
Comment	
Notice	

Rank	PROB	SIM	DIST	Organism Type	Species
1	0.998	0.653	5.306	FF	Colletotrichum gloeosporioides Penzig & Saccardo BGA
2	0.001	0.001	7.523	FF	Colletotrichum coffeanum Noack
3	0.000	0.000	8.029	FF	Fusarium sporotrichioides var sporotrichioides Sherb. BGB
4	0.000	0.000	8.373	FF	Fusarium avenaceum (Corda:Fries) Saccardo BGC

Key: <x: positive, x: negative, <x-: mismatched positive, x+: mismatched negative, {x: borderline, -x: less than A1 well

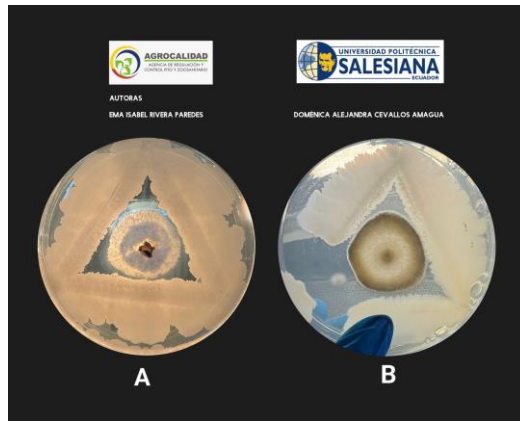
Well Color Values												
Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0+	< 1906 -	26+	< 2274 -	< 1250 -	< 1010	< 1320	< 633	< 1419	< 779	< 1862	< 1547
B	-3	5	< 1436	< 995	< 1469	4	< 811	< 1601	< 1508	< 1637	< 763	< 1441
C	< 1396	7	< 2370	< 1943	< 1427	< 2303	< 2284	< 1836	< 2770	< 2222	< 1170	< 1420
D	< 2038	< 2113	< 1966	< 2165	< 1060	< 1964	< 1164	< 2368	< 1306	< 905	< 1090	< 913
E	< 883	< 1483	18	< 1122	< 1227	< 1081	< 2470	16	< 1095	< 1104	< 1216	< 1638
F	< 2459	< 2525	< 2764	< 1362	< 1317	< 2106	< 2429	< 2796	< 1014	< 2342	< 1432	< 1303
G	< 2664	-4	< 2388	< 2381	< 2648	< 1102	< 1339	< 2471	< 2499	< 2362	< 1778	< 1384
H	< 1376	< 1714	< 2528	< 2426	< 1233	< 1924	< 1805	< 1397	< 1236	15	7	-1

Well Turbidity Values												
Plate	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0+	< 878 -	138+	< 1736 -	< 1309 -	< 1669	< 2541	< 1346	< 2122	< 1741	< 2130	< 2107
B	48	189	< 1840	< 2419	< 2130	150	< 1946	< 1877	< 1926	< 1904	< 2829	< 1829
C	< 726	186	< 1394	< 2765	< 1810	< 2118	< 2194	< 1893	< 939	< 2200	< 2077	< 2018
D	< 1922	< 1746	< 2195	< 2395	< 1853	< 2448	< 1768	< 2187	< 2982	< 821	< 1523	< 2523
E	< 2555	< 2328	267	< 1286	< 1894	< 3195	< 1826	238	< 1584	< 1304	< 1152	< 2250
F	< 1566	< 1277	< 1368	< 842	< 694	< 1678	< 2080	< 1290	< 802	< 1637	< 1027	< 1162
G	< 1216	290	< 1434	< 1298	< 1010	< 1152	< 1029	< 1594	< 1402	< 1816	< 918	< 754
H	< 901	< 1054	< 1550	< 1667	< 1462	< 1320	< 1883	< 781	< 754	101	40	18

Report Date Oct 27 2025 9:47 AM

Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Anexo 16 Mecanismos de inhibición de cepa AEC-00259



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (A) Halo de inhibición y (B) Competencia por espacio.

Anexo 17 Resultado efecto inhibitorio de cepa AEC-00256



Elaborado por: (Las autoras, 2025)

Nota: (A) Crecimiento micelial inusual.