



FACULTAD DE INGENIERIA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTANDARIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE BIOPESTICIDAS A BASE
DEBACILLUS SUBTILIS PARA EL CONTROL DE LA MONILIASIS.

Trabajo de titulación presentado en conformidad a los requisitos establecidos
para optar el título de

Ingeniero Agroindustrial y de Alimentos

Profesor Guía

PHD. Viviana del Rocío Yáñez Mendizábal

Autor

Esteban Rodrigo Gallardo Sierra

Año

2015

DECLARACIÓN PROFESOR GUIA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos para su adecuado desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Viviana Yáñez Mendizábal.

Doctora en Ciencias Agrícolas y de Alimentos

C. I. 1710469782

DECLARACIÓN ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes”

Esteban Rodrigo Gallardo Sierra

C. I. 1716063407

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación y Desarrollo de Ingenierías (CIEDI), Facultad de Ingenierías y Ciencias Agropecuarias, Universidad de las Américas, por el aporte económico para el desarrollo de la investigación

A mis Padres Rodrigo Gallardo y Mercedes Sierra por luchar junto a mí día a día para culminar mis metas.

A la Dra. Viviana Yáñez por compartirme sus conocimientos y experiencias para ser un profesional dedicado y metódico.

A cada uno de mis profesores de carrera por guiar en mi crecimiento intelectual

DEDICATORIA

A mis padres Rodrigo y Mercedes por ser mis tutores de la vida, por enseñarme el camino que debo escoger ahora sé que cada palabra de experiencia será aceptada ya que gracias a ustedes me he formado una persona y profesional correcto e intachable.

A mi hermana, Paulina por ser mi amiga incondicional en cada etapa de mi vida. A mis abuelitos, Paquito y Teresita por estar en cada momento y dedicar su tiempo para escucharme. A mi tía, Gladys por estar junto a mi familia. A mi enamorada, Paola Herrera por el apoyo que me ha brindado por estar ahí incondicionalmente. A mi sobrina, Daniela que gracias a ti nuestras vidas cambiaron A mis amigos que han sido parte de mi crecimiento personal con ustedes las cosas son más fáciles.

RESUMEN

El cacao (*Theobroma cacao*) es considerado como uno de los cultivos agrícolas de importancia mayor, a nivel mundial, debido a que es materia principal para elaboración de chocolate. En el Ecuador este rubro, además, es importante porque la producción agrícola se basa en cacao fino de aroma denominado sabor “arriba” de alta demanda internacional y que sitúa al país como el primer exportador de cacao con calidad gourmet.

A pesar de la importancia del cacao, en las pasadas seis décadas la producción nacional se ha visto seriamente afectada por el impacto de enfermedades, especialmente fungosas. Entre estas enfermedades, la Moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* y la Escoba de bruja causada por *Crinipellis pernicioso* merman drásticamente la producción debido a su acción destructiva principalmente localizada en los frutos (mazorcas) de todas las edades a lo largo del ciclo del cultivo. Esta ampliamente documentado que ambas enfermedades se las puede localizar en regiones productoras de la costa y amazonia del Ecuador causando pérdidas productivas y económicas de hasta el 100%.

Por esta razón, diferentes centros de investigaciones nacionales e internacionales vienen trabajando en la búsqueda de métodos eficientes para control principalmente de la Monilla del cacao. Estos métodos involucran el uso de técnicas convencionales como podas fitosanitarias, aplicación de productos preventivos y químicos convencionales y uso de clones resistentes o tolerantes. Sin embargo, estos métodos generalmente no son suficientes para controlar el problema y las pérdidas en la producción. Actualmente, métodos y estrategias de manejo alternativo como control biológico se vienen trabajando como alternativas eficientes para las pérdidas en campo.

Entre los métodos de control biológico de la moniliasis existen varios estudios que demuestran el potencial de agentes microbiológicos como bacterias y

hongos para el control de la moniliasis. Algunos de estos estudios se han realizado hasta etapas de desarrollo de bioproductos a nivel artesanal. Debido a esto es indispensable que se desarrollen programas de investigación sobre procesos de producción y formulación pero a nivel industrial que garanticen la efectividad de formulaciones comerciales.

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue optimizar la producción a nivel de laboratorio y planta piloto de la cepa *Bacillus subtilis* BSC1 que ha demostrado tener efectividad para el control de la moniliasis en varios materiales de cacao nacional y clones cultivados en diferentes regiones cacaoteras del Ecuador. Para cumplir este objetivo primero se caracterizó la producción de esta bacteria mediante la modelización del crecimiento (duración de la fase de latencia, exponencial y estacionaria) en relación al tiempo; así como de las concentraciones de células viables (UFC ml⁻¹) y metabolitos. Posteriormente, se evaluaron diferentes medios de cultivo de bajo costo que proporcionen un crecimiento alto y mantengan la eficacia de biocontrol. Los medios de cultivo fueron formulados utilizando fuentes de nitrógeno y de carbono económicas provenientes de productos comerciales y subproductos agroalimentarios. Finalmente con los datos de optimización de medios se realizó el escalado de producción en un bioreactor de 5 L y se comprobó la efectividad de *B. subtilis* para el control de *Moniliophthora roreri*.

Los resultados obtenidos en erlenmeyers demostraron que se pueden conseguir niveles de biomasa de 10⁹(UFC ml⁻¹) usando dos medios de bajo costo compuestos por harina de soja como fuente de nitrógeno en combinación con melaza como fuente de carbono. La producción de *B. subtilis* BSC1 en un bioreactor de 5 L de capacidad a 30 °C, con agitación de 150 rpm y flujo de aire de 100 L h⁻¹, mantuvo las concentraciones de la bacteria a 10⁹(UFC ml⁻¹). Ensayos *in vitro* con *B. subtilis* BSC1 crecido en el medio optimizado de bajo costo demostraron que ésta mantenía su eficacia de inhibición del crecimiento de *M. roreri* hasta el 0 % comparada con el 90% del control. Estos resultados

preliminares demuestran una base fiable para la producción industrial de *B. subtilis* eficiente en el control de la moniliasis a nivel industrial.

ABSTRACT

One of the agricultural crops of greater importance worldwide is the Cacao (*Theobroma cacao*), because is the main material for making chocolate. This category in Ecuador it is the mainstay of agricultural production that is based on fine aroma cacao that it is called "Arriba"; which it is considered high international demand that places the country as the leading exporter of gourmet quality cacao.

Despite the importance of cacao, it is significant to mention that in the past six decades the national industry has been seriously affected by the impact of diseases, especially the fungal diseases. Among these diseases are include the Moniliasis of cacao caused by *Moniliophthora roreri*; and Witches' Broom Disease caused by *Crinipellis perniciosus*. Both pathogens caused dramatically damaged in crop production, due to their destructive action mainly located in the fruits (pods) of all ages throughout the crop cycle. It is well documented that both diseases can be located in the producing regions, as well as in the coast region and the Amazon region of Ecuador, which are causing production and economic losses of up to 100%.

For this reason, different national and international centers of research are working on finding efficient methods for controlling the Monilia of cacao. These methods are involve using standard techniques as phytosanitary pruning, implement prevention and conventional uses of chemicals, and use of resistant or tolerant clones. However, these methods are generally not enough to control the problem and production losses. Currently there are methods and management strategies, which are an alternative as biological control that is being used as efficient alternatives for field losses.

Among the biological control to get rid of moniliasis there are several studies that have demonstrated the potential of microbiological agents such as bacteria and fungi that have been used to control this disease. Some of these studies

have been conducted to stages of development of bioproducts at the artisanal level. Because of this it is essential that research programs and formulation production processes it develops at industrial level to ensure the effectiveness of commercial formulations, with the main objective to counter the disease generated by *Moniliophthora roreri*.

In this context, the objective of this study was to optimize production in the laboratory and pilot plant of *Bacillus subtilis*BSC1 that has shown effectiveness in controlling the disease in many materials of national cacao and grown clones in different regions of the Ecuador. To reach the goal firstly the production of this bacterium was characterized by modeling the growth (length of lag phase, exponential and stationary) according to time; and colony forming units CFU ml⁻¹ and metabolites. Subsequently, different crop media inexpensive to provide and maintain high growth biocontrol efficacy were evaluated. Crop media were formulated using sources of nitrogen and carbon from economic commercial agrofoods products and by-product. Finally the data media optimization scaling production was performed in a 5 l bioreactor and effectiveness of *B. subtilis* for control of *Moniliophthora roreri* was checked.

The results showed that in Erlenmeyer flasks are available biomass levels 10⁹CFUml⁻¹ using two compounds of low cost soybean meal as nitrogen source, in combination with molasses as a carbon source. Production of *B. subtilis* BSC1 in a bioreactor of 5 L capacity at 30 °C with 150 rpm agitation and air flow of 100 l h⁻¹, concentrations remained bacteria to 10⁹ CFUml⁻¹. In vitro assays *B. subtilis*BSC1 grown in the optimize low cost medium showed that it were living cells, endospores and all free supernatants its effective against growth mycelium inhibition of *M. roreri* to 0% compared to 90% of control. These preliminary results demonstrate a reliable method for the industrial production of *B. subtilis* efficient in controlling thrush industry-wide basis.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.CapítuloI:MARCOTEÓRICO	6
1.1. Cultivo del Cacao	6
1.1.1. Generalidades	6
1.1.2. La agricultura del cacao en el Ecuador.....	7
1.1.3. Demanda y comercialización	8
1.2. Enfermedades del cacao en el Ecuador (moniliasis).....	9
1.2.1. Moniliasis	9
1.3. Medidas de Control.....	12
1.3.1. Medios Químicos	12
1.3.2. Sistemas Culturales	12
1.3.3. Control Genético	14
1.3.4. Control Biológico.....	14
1.4. Control biológico	15
1.4.1. Producción artesanal	16
1.4.2. Microorganismos antagonistas	16
1.4.3. Selección de un antagonista ideal	18
1.4.4. Producción de antagonistas en bioproductos	18
1.4.5.Potencia de control biológico de <i>Bacillus subtilis</i>	19
2.CAPITULOII.METODOLOGIA.....	20
2.1. Caracterizar el crecimiento en medio	20
2.1.1. Microorganismo y patógeno.....	20
2.1.2. Preparación de inóculo	21
2.1.3. Parámetros de crecimiento y producción.....	22
2.2. Optimización de medio de cultivo de bajo costo.....	25
2.2.1. Investigación de productos comerciales	25
2.3. Escalado de producción en bioreactor.....	30
2.3.1.Experimentos en bioreactor	30

2.3.2. Actividad antagónica <i>in vitro</i> de <i>Bacillus subtilis</i> BSC1.....	32
3. CAPITULO III. RESULTADOS.....	34
3.1. Caracterizar el crecimiento	34
3.1.2. Dinámica de crecimiento de <i>B. subtilis</i> BSC1	35
3.1.3. Producción de endosporas y metabolitos	37
3.2. Optimización de medio de cultivo.....	39
3.2.1. Producción de <i>Bacillus subtilis</i> BSC1 en medios de bajo costo.....	39
3.3. Escalado de producción en bioreactor.....	42
3.3.1 Escalado de producción <i>Bacillus subtilis</i> BSC1	42
3.4. Efectividad de <i>Bacillus subtilis</i> Contra <i>M. royeri</i>	44
3.5. Costos de Producción.....	45
4. CAPITULO IV. CONCLUSIONES.....	47
4.1. Caracterización del crecimiento en medio de cultivo.....	47
4.2. Optimización de medio de cultivo de bajo costo.....	47
4.3. Escalado de producción en bioreactor.....	48
5. CAPITULO V. RECOMENDACIONES.....	49
REFERENCIAS.....	51
ANEXOS.....	57

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial el cacao (*Theobroma cacao* L.) es un cultivo de significativa importancia económica, debido a que es la materia prima esencial para la elaboración del chocolate. En el Ecuador, éste es uno de los cinco principales productos agrícolas; y según datos de la *International Cocoa Organization* el país ocupa el primer lugar como exportador mundial de cacao fino y de aroma sabor “arriba” con calidad gourmet (ICCO, 2012). Además, el cacao es un recurso agrícola-alimenticio de importancia porque posee un gran valor histórico ya que evocan épocas de riqueza ancestral, desarrollo social, familiar y gastronómico por lo cual fue nombrado símbolo de identidad nacional.

En la actualidad, la mayor producción de cacao usadas para la chocolatería fina alcanzó 467.9 millones de dólares entre enero y noviembre del 2013 (PanamericanWorld, 2015) compuesta por cacao a granel y fino o de aroma. Para esta producción se reconocen que el 95% de la producción mundial anual es a partir de cacao a granel, y el restante 5% corresponde a cacao fino o de aroma cuyas características distintivas de aroma y sabor son buscadas principalmente por los fabricantes de chocolates de alta calidad (Pro Ecuador, 2013).

A pesar de la importancia, la producción del cacao en nuestro país ha decaído drásticamente en los últimos sesenta años debido a los problemas fitosanitarios. Este cultivo, especialmente de cacao nacional fino y de aroma, se pierde por el impacto de enfermedades fungosas. Entre las enfermedades fungosas la moniliasis (*Moniliophthora roreri*), escoba de bruja (*Crinipellis pernicioso*) y mazorca negra (*Phytophthora cinnamomi*) son las de mayor impacto en las regiones productoras de la costa y amazonia del Ecuador (Evans *et al.*, 2003, pp 476-485); (Hebar, 2007, pp.). En Quevedo el 80 % de las mazorcas enfermas presentaron sintomatología de moniliasis y el 20% restante escoba de bruja y mazorca negra (Sánchez-Mora *et al.*, 2011a).

Debido al alto impacto causado por la moniliasis, múltiples instituciones y empresas nacionales han realizado investigaciones dirigidas a desarrollar estrategias de control del hongo que van desde generación de clones resistentes (INIAP, 2014) técnicas culturales especialmente podas, manejo con pesticidas sintéticos y métodos alternativos como biológico y manejo integrado de enfermedades. En cuanto al control biológico de la moniliasis del cacao varios estudios conducidos por (Melnick *et al.*, 2011. pp 236-245), (Falconí y Yáñez 2007, pp. 14), Peralvo y Saavedra (2005), (Arévalo *et al.*, 2004, pp. 180), Soberanis (2001), (Jiménez *et al.*, 1987, pp. 1-7), han demostrado que el uso de microorganismos especialmente bacterias antagonistas pueden funcionar como agentes efectivos en la reducción de esta enfermedad.

En estudios conducidos por (Falconí y Yáñez 2007, pp 14), las bacterias de las especies *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas cepacia* formuladas en sólido demostraron tener efectividad de 82 y 81 % para disminuir la moniliasis en diferentes materiales de cacao. En similares estudios con los mismos microorganismos (Robles 2008), (Peralvo y Saavedra, 2005) validaron la efectividad de control con resultados de producción de almendras sanas sobre el 70% y 69%, similares estudios realizados por (Durango, 2001, pp. 98) demostraron una reducción del 80% de la enfermedad.

Desde el punto de vista tecnológico agroindustrial y alimentario varias especies del género *Bacillus*, particularmente *B. subtilis* y sus metabolitos son usados como biopesticidas para el control de enfermedades agrícolas, resaltando que más del 50% de bioproductos disponibles en el mercado son formulados a partir de estas bacterias (Fravel, 2005). Adicionalmente *B. subtilis* ha sido utilizado durante varios años para la elaboración de suplementos alimenticios, pro-bióticos y medicinas.

Debido al potencial de esta especie bacteriana y la posibilidad de manipulación *ex situ* se ha desarrollado estudios de producción y formulación artesanales con resultados alentadores (Falconí y Yáñez, 2007; Robles, 2008; Peralvo y

Saavedra, 2005). Sin embargo, se tiene aún que trabajar en aspectos de producción a gran escala, período de vida útil, envases y mantenimiento de la efectividad que permitan incrementar la reducida disponibilidad de formulaciones comerciales. En relación de los productos comerciales los cuales se han desarrollado de manera industrial siguiendo protocolos de optimización y modelización de crecimiento bacteriano, para de esta manera incrementar la concentración en la formulación. La producción de biopreparados es escaso lo que significa que los precios varían dependiendo las casas comerciales uno de estos productos se lo conoce como Serenade®, el cual posee cepas de *B. subtilis* en un medio líquido con una concentración de 1×10^9 UFC g^{-1} de producto formulado.

Las principales ventajas de elaborar bioproductos comerciales en comparación a los productos químicos que son utilizados actualmente es debido a que generan menor riesgo de toxicidad y no tienen residualidad en los alimentos, son amigables con la biología de los cultivos ya que se especifican en control de enfermedades localizadas (Yáñez, 2012)

En este contexto, el objetivo del presente estudio fue optimizar la producción a nivel de laboratorio y planta piloto de la cepa *Bacillus subtilis* BsC1 que ha demostrado tener efectividad para el control de la moniliasis en varios materiales de cacao nacional y clones cultivados en diferentes regiones cacaoteras del Ecuador. Para cumplir este objetivo primero se caracterizó la producción de esta bacteria mediante la modelización del crecimiento en relación al tiempo; así como la producción de células viables, endosporas y metabolitos. Posteriormente, se evaluaron diferentes medios de cultivo de bajo costo que proporcionen un crecimiento alto y mantengan la eficacia de biocontrol. Finalmente en base a los datos de optimización de medios se realizó el escalado de producción en un bioreactor de 5 l y se comprobó la efectividad de *B. subtilis* para el control de *Moniliophthora roreri*.

En el CAPITULO II, Para la metodología se caracterizó y modelizó el crecimiento de *Bacillus subtilis* BSC1 posteriormente se optimizó medios de bajo costo mediante el crecimiento para producción de biomasa y metabolitos se realizó escalado de producción en bioreactor mediante la modelización y concentración del crecimiento bacteriano en medio de bajo costo

En el CAPITULO III, Los resultados se evaluaron mediante los experimentos realizados durante la investigación de la modelización y caracterización de la curva de crecimiento de *Bacillus subtilis* BSC1, la optimización de medios de cultivo de bajo costo para optar por la mejor formulación dependiendo de la concentración de biomasa para lo cual se realizará un diseño experimental de bloques completamente al azar (DCA). Cada experimento se realizará en el laboratorio, contará con 3 repeticiones. La toma de datos se realizará en UFC ml-1. Una vez seleccionado el medio adecuado se llevara a producción en bioreactor.

En el CAPITULO IV, En las conclusiones y recomendaciones, se analizó los resultados del proyecto realizado, también se describieron algunas recomendaciones para estudios a futuro.

OBJETIVOS

Optimizar la producción a nivel de laboratorio y planta piloto, para la estandarización de *Bacillus subtilis* con eficiencia en el control de la moniliasis del cacao fino de aroma y clon CCN-51 causada por *Moniliophthora roreri* en cacao.

Objetivos específicos

1. Caracterizar el crecimiento de *Bacillus subtilis* y sus metabolitos antifúngicos en medio de cultivo líquido la dinámica de crecimiento y producción de unidades formadoras de colonia.
2. Optimizar el medio de cultivo de bajo costo y parámetros físicos de crecimiento para la validación de compuestos comerciales en relación a medios utilizados en laboratorio.
3. Escalar la producción en bioreactor mediante la modelización y concentración del crecimiento bacteriano en medio de bajo costo

1. Capítulo I: MARCO TEÓRICO

1.1. Cultivo del Cacao

1.1.1. Generalidades

Se han realizado varios intentos para caracterizar la biodiversidad del cacao cultivado y silvestre, estudios realizados hasta la década de los 80s se determinaba según la clasificación taxonómica. En las últimas dos décadas se han evaluado el origen del cacao mediante la genética intraespecífica, relaciones filogenéticas y distribución biogeográfica.

Según características botánicas el cacao (*Theobroma cacao*) está dividido en tres grupos genéticos: los Criollos, los Forasteros y Trinitario (Enríquez G, 2004). Los criollos y los trinitarios son considerados como una variedad noble siendo los más aceptados por los productores de chocolate para obtener productos con excelentes cualidades organolépticas (Montavon, 1996).

El grupo de los trinitarios y criollos han sido domesticados y adaptados en diferentes zonas y regiones del mundo, se les ha catalogado como cacaos finos de aroma, mientras tanto los criollos no poseen una producción elevada y son susceptibles a enfermedades (Enríquez, 2004). Los cacaos de tipo trinitario y forastero pertenece a un grupo amplio y no tan identificado, esta variedad de cacao proviene del alto amazonas (Enríquez, 2004).

El cacao Trinitario y forastero posee cualidades organolépticas de un fuerte aroma y un sabor amargo (Anecacao, 2012). Esta variedad es caracterizada por ser rustico y resistente a enfermedades, esto explica porque son los que mejor se adaptan a cualquier clima (Enríquez, 2004).

Los trinitarios están formados por una población híbrida originaria de Trinidad esto quiere decir, que la variedad criollo trinitario tuvo una mezcla con una variedad introducida de la Cuenca de Orinoco de allí las características fenotípicas, genotípicas, morfológicas (Vera, 1993). La variedad de este cacao

posee cualidades aromáticas y de un sabor frutal, las almendras son de tamaño mediano y los cotiledones de color marrón rojizos (Anecacao, 2012).

La planta de cacao tiene un tamaño medio de 5-8m, pero puede crecer hasta 20 metros dependiendo si existe sombra intensa (Enríquez, 2004). El árbol mientras envejece tiende a inclinarse y perder follaje (Quiroz, 1997). Por lo general el árbol de cacao posee un fuste recto que se desarrolla de formas variadas, posee un molinillo a los 80-120cm, de aquí nacen de tres a seis ramas principales que pasan a formar el esqueleto donde posteriormente se obtendrán las mazorcas de cacao (Enríquez, 2004).

1.1.2 La agricultura del cacao en el Ecuador

La agricultura es una de las actividades que aportan significativamente a la economía del Ecuador dentro de esto la producción del cacao ocupa el quinto lugar entre los rubros destacados. Este cultivo se encuentra ligado a lo histórico, económico, político y social del Ecuador. La producción cacaotera ha ocupado tradicionalmente buena parte de la superficie agrícola de la costa en las provincias del Guayas, Ríos y Manabí y de la subregión andina, movilizando a decenas de miles de jornaleros y familias campesinas del Litoral, atrayendo también mano de obra de la región Sierra (Tabla 1) (Anecacao, 2012).

Tabla 1. Superficie de producción y rendimientos del cacao en Ecuador.

Provincia	Superficie Sembrada (ha)	Superficie Cosechada (ha)	Producción (T)	Rendimiento (Tha⁻¹)
Total Nacional	507721	390176	180550	0.5
Guayas	106732	88047	55411	0.6
Los Ríos	107849	82676	40775	0.5
Manabí	97382	64374	14423	0.2
Esmeraldas	59037	48432	17363	0.4
Otros	136722	106645	52579	0,5

Tomado de: ESPAC, 2012/ Proyecto de Reactivación de Café y Cacao Fino de Aroma del MAGAP

En el Ecuador existe la variedad criolla que es conocida como “Nacional”, “sabor arriba”, o “fino y de aroma”, posee un área determinada en América y Ecuador en donde es considerada como autóctona, la cual corresponde al 4 % de la producción del mundo. La denominación “sabor arriba”, viene debido que los productores tenían sus plantaciones ubicadas “arriba” del río principalmente de las provincias de Ríos y Guayas (Enríquez, 2004).

Los datos del último censo agropecuario del Ecuador indican que la superficie sembrada de cacao es de 507721 ha con una superficie cosechada de 390176 ha. La producción de almendra seca es de 180550 T con rendimiento de 0.46 T ha⁻¹ (SINAGAP, 2012).

Siendo Guayas la provincia que mayor producción posee con 55000 toneladas que equivale al 31 % de la producción nacional y con un rendimiento de 0.63 T ha⁻¹. La provincia de Manabí posee la menor productividad 0.22 T ha⁻¹ y la producción de este sector es de alrededor de 14000T al año.

1.2. Enfermedades del cacao en el Ecuador (moniliasis)

Los agricultores han buscado a lo largo del tiempo aumentar la producción del cultivo, de esta manera mezclaron varios tipos de cacao con el fin de obtener un árbol con mayor rendimiento, menos susceptible a enfermedades. Por varios años esta metodología dio resultados, pero empezaron aparecer las enfermedades que disminuyeron la producción del cultivo, muchas de estas enfermedades provienen de los países amazónicos (Porras y Sánchez, 1991, pp. 32).

Las enfermedades del cacao producen pérdidas en la producción y la calidad esto incrementan los costos, se debe a la falta de un manejo integrado de enfermedades y la consecuencia actual es que las enfermedades están presentes de forma endémica en los cacaotales (Enríquez, 2004).

Las enfermedades están relacionadas con las condiciones climáticas, pueden variar dependiendo de la época del año y las regiones. Las enfermedades pueden mermar la producción de mazorcas o matar a las plantas más susceptibles (Suárez, 1993, pp. 90-106).

1.2.1. Moniliasis

1.2.1.1. Taxonomía

La enfermedad fue identificada por primera vez en Ecuador en la provincia de Los Ríos por Rorer en 1914, quien la denominó como *Monilia roreri* de ahí conocida como Moniliasis que es la enfermedad causada por este hongo. A partir de esta denominación se le ha identificado con los nombres de Monilia, Mancha Ceniza, Helada o también Enfermedad de Quevedo.

Evans (1981) reclasificó al hongo como *Moniliophthora roreri*. Las evidencias filogenéticas a nivel morfológico, citológico y molecular le han ubicado a

Moniliophthora roreri dentro de la clase Basidiomycetes *Crinipellis*, con dos cepas descritas por Evans, (2003) conocidas como *Crinipellis roreri*, *roreri* y una nueva cepa *C. rorerigileri*. En recientes investigaciones en análisis filogenéticos han demostrado que *C. perniciosa* y *M. roreri* son hermanas de taxón que estas hongos pertenecen a la familia Marasmiaceae. Estos estudios han demostrado que el linaje incluye los hongos biotróficos *Moniliophthora roreri* y *Moniliophthora perniciosa* y otra especie aún no descrita endofítica (Aime y Phillips, 2005).

1.2.1.2. Hospederos

La Monilia (*Moniliophthora roreri*) solo ataca a los frutos de *Theobroma* y *Herranias*, dos especies pertenecen a la familia de Sterculiaceae (Porras y Sánchez, 1991, pp. 32). Existen estudios realizados que se ha inoculado artificialmente al tallo del árbol de cacao y de esta manera realizat investigaciones *in vitro* e *in situ* (Enríquez, 2004).

1.2.1.3. Desarrollo de síntomas

El ciclo del patógeno varía entre 50 y 60 días desde que el fruto ha sido infectado hasta que se complete la esporulación (Arévalo *et al.*, 2004). Se ha considerado; si el inóculo ha llegado a frutos sanos provenientes de frutos infectados que se quedaron momificados en los arboles (Yáñez, 2004, pp. 8). Las esporas del hongo permanecen activas de 8 a 9 meses posterior a su esporulación y esto se considera como inóculo primario.

Posteriormente las esporas son transportadas por el aire, siendo un móvil para infectar a nuevas mazorcas, de esta manera se inicia un proceso de infección a lo largo del cacaotal (Arévalo *et a.*, 2004, pp. 180). Los frutos más susceptibles a contraer esta enfermedad son las mazorcas tiernas (Bejarano, 1961, pp 54-58).

Las conidias necesitan agua y ambiente para que su germinación e infección se produzca adecuadamente, la inoculación se produce por la vía del exocarpo

y rara vez por los estomas, de esta manera se moviliza intercelularmente infectado así a toda la mazorca (Arévalo *et a.*, 2004, pp. 180).

Dentro de los siguientes 30 días se identifican los primeros síntomas, entre 15 a 20 días se puede observar unas manchas de color marrón, posteriormente se forma una capa blanquecina que rodea gradualmente a la mazorca en los siguientes 3 a 4 días, el fruto se llena de esporas de la *Monilia* tomando una coloración cremosa (Arévalo *et a.*, 2004, pp. 180). Para que la enfermedad aparezca pueden pasar de 6 a 10 semanas, una vez que los tejidos han sido consumidos el fruto se pudre y se momifica, este es un indicativo de que la enfermedad se encuentra presente y que está contaminando a los demás frutos (Enríquez, 2004).

1.2.1.4. Epidemiología

Para que la enfermedad se desarrolle necesita factores como la humedad, temperatura y alimento, las esporas necesitan agua disponible y una humedad relativa del 100%, para que exista un crecimiento vegetativo necesita una temperatura óptima de 24 y 26 °C, para que la enfermedad sea óptima el rango de temperatura oscila entre 22 a 30 °C debajo de esta temperatura la incidencia del hongo es menor. La enfermedad se encuentra favorable en las fases de floración y producción de fruta (Evans, 1981, pp. 44). Se estima que una mazorca infectada puede producir alrededor de 6 a 7 billones de conidias en 20 días de espacios de esporulación de 80 días, por lo tanto se dice que la mayor producción de conidias se produce en el día por el incremento de temperatura y un bajo porcentaje de humedad relativa.

1.2.1.5. Impacto negativo de la Moniliasis

En las provincias de la costa; Guayas, Los Ríos Manabí y Esmeraldas, en la amazonia; Sucumbíos, Orellana y Napo las condiciones climáticas son favorables para el crecimiento de la *Monilia* de esta manera se pierde más del 40 % de la producción, esto significa que son 8000 toneladas de cacao con una pérdida económica alrededor de 2 millones de dólares por año. Existen aéreas

de los países que se ven afectados por el hongo donde la pérdida puede superar el 70% (Croplifela, 2015).

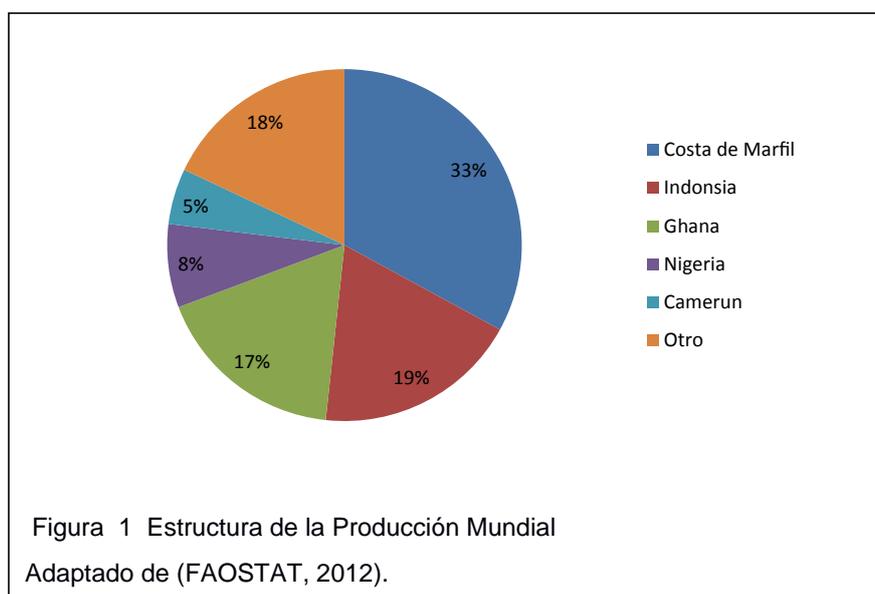
1.3. Medidas de Control

1.3.1. Medios Químicos

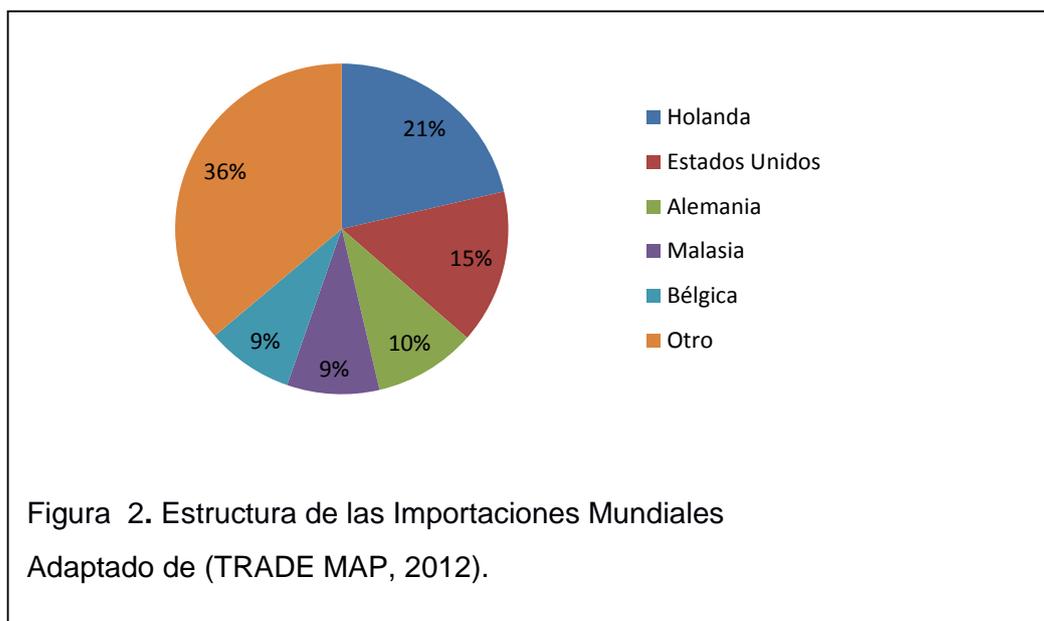
El uso de químicos para el combate de la Moniliasis ha sido poco efectiva y muy costosa, para que exista una eficiencia relativa del uso de plaguicidas se necesita condiciones básicas en las plantaciones; que los cacaotales sean regulares y de buena producción, se necesita que las mazorcas localizadas en las zonas inferiores del tallo tengan una aplicación directa de fungicidas, aportando así a la floración y producción de frutos sanos, de esta manera llevar un registro de manejo de plagas y enfermedades en cada etapa de mayor susceptibilidad. Una vez considerad estos factores se recomienda aplicar 6 veces cada 15 días la fumigación debe ser aplicada directamente al fruto (Porras y Sánchez, 1991, pp. 32).

1.1.3. Demanda y comercialización

En la última década la producción mundial, según FAOSTAT, (2012) (Figura 1) ha tenido una creciente demanda, entre el 2000 y 2012 existe un crecimiento de 48.31% pasando de 3.37 millones de toneladas que se producía en el año 2000 a cinco millones de toneladas en el 2012, esto quiere decir que tuvo una demanda creciente de 3.53% anual.



Alrededor del 59% de la producción mundial de cacao es destinada al mercado internacional (2.98 millones). Los principales compradores son: Holanda, Estados Unidos y Alemania, estos países abarcan un 46% del comercio mundial suministrada por Costa de Marfil (MAGAP, 2013).



En Suramérica los principales Importadores de cacao son: Brasil, Colombia y Perú colectivamente con una importación anual de 20000T esto quiere decir que menos del 1% mundial.

En la Región Andina Perú siembra alrededor de 91000 hectáreas y la producción anual de 62000T esto le ubica en el décimo lugar de los mayores productores de cacao del mundo, por otra parte Colombia posee una extensión sembrada de 138 mil hectáreas y la producción de 50000T (MAGAP, 2013).

En el Ecuador el cacao ha presentado una tendencia al alza de las exportaciones, su incremento fue de 257% desde el 2000-2013. Para el 2000 Ecuador exportó 50000T y para el año 2013, 178000T. De esta manera nuestro país se convirtió en uno de los mayores proveedores de cacao a escala

mundial, siendo Estados Unidos el principal país donde se exporta (MAGAP, 2013).

1.3.2. Sistemas Culturales

Se realiza sistemas de cultivo que favorezcan a la producción, para que de esta manera inhiba la proliferación del hongo, esto quiere decir que se debe favorecer a un clima adecuado para el crecimiento del árbol y desfavorable para la proliferación del patógeno, para esto se realiza un adecuado sistema de drenaje evitando así la acumulación de agua lluvia evitando así el incremento de humedad relativa de la plantación, un adecuado control de malezas favoreciendo a la oxigenación para que el ambiente sea más seco, las podas influyen para evitar que el clima del cacaotal varíe por la acumulación de desechos orgánicos como las hojas y frutos que se desprende, cuando se disminuye la sombra aumenta el ingreso de luz y favorece que el suelo este seco, y aportando a la evacuación de la humedad (Porras y Sánchez, 1991, pp. 32).

1.3.3. Control Genético

Por medio de selección de genotipos resistentes a la Moniliasis se puede reducir la enfermedad e incrementar la producción (Enríquez, 2004). Existen clones recomendados que son resistentes a la enfermedad. A pesar de que se diseñaron plantas de cacao modificadas genéticamente (clones) para buscar resistencia o tolerancia a monilia en el campo han demostrado susceptibilidad se debe evaluar el rendimiento en las regiones del país para de esta manera poder tener zonificado los clones para cada provincia productora de cacao, evaluado así la tolerancia de los clones al clima, resistencia a enfermedades causadas por Moniliasis (Suárez, 1993, pp. 90-106).

1.3.4. Control Biológico

Este manejo consiste en la manipulación ya sea directa o indirecta de los agentes biológicos que se encuentran de manera natural en el ambiente,

realizando un control biológico natural (Yáñez, 2004, pp. 8). Para el control biológico de enfermedades agrícolas se ha potencializado el uso de microorganismos que a lo largo de las investigaciones han adquirido importancia a escala mundial, debido a que se ha identificado grupos de hongos y bacterias que se presentan de forma antagónica a los patógenos vegetales (Falconí y Yáñez-Mendizábal 2007; Falconí 2014).

Los biocontroladores poseen capacidad de autoreplicarse y situarse en diferentes sustratos y ambientes colonizar semillas, espermósferas, filósfera, carpósfera, etc. Mientras que los controles químicos tiene un efecto temporal y se necesita una aplicación periódica para garantizar la eficiencia. En la actualidad se ha estudiado el comportamiento de los microorganismos que actúan como biocontroladores estos pueden colonizar y realizar un control sobre agentes patógenos (Falconí, 1997).

1.4. Control biológico

En la producción de biocontroladores los procesos de formulación están relacionados a los conceptos de biotecnología y microbiología industrial, uno de los objetivos es utilizar microorganismos que han sido comprobados en procesos biotecnológicos artesanales o industriales eficientes en el control de enfermedades, a estos se los estabiliza en formulaciones para obtener productos comerciales, tomando en cuenta que cada microorganismo posee requerimientos fisiológicos y bioquímicos (Yáñez, 2003, pp. 36).

Para evaluar los biocontroladores existen dos tipos básicos de producción; el volumen de producción y grado de manipulación artesanal e industrial, para lo cual se debe tener clara la evaluación de dosis y concentraciones adecuadas de fuentes de carbono, nitrógeno y fosforo así como la de micro y micronutrientes

1.4.1. Producción artesanal

La producción de biopesticidas ha sido evaluada en clones nacionales y en fincas de producción, en varias etapas de producción con resultados que disminuyen la incidencia de Moniliasis del cacao, por lo tanto es necesario la industrialización de este tipo de biocontroladores.

La industrialización de los biocontroladores consiste en pasar de una escala a nivel de laboratorio que se utiliza agitadores hasta la producción en bioreactores de gran capacidad en los cuales se desarrolle un tipo de fermentación no alcohólica. Para la formulación de biocontroladores es necesario determinar las concentraciones adecuadas para cada agente microbiano con lo cual se conserve el principio activo de la formulación artesanal, para obtener un porcentaje adecuado de biomasa, esporas y producción de metabolitos por parte del agente microbiano. Un biocontrolador debe ser económico y eficiente para aplicar este tipo de tecnologías (Yáñez, 2007).

Se ha producido biopreparados con harina de soya y melaza, los resultados señalan que las formulaciones óptimas son de 20g l^{-1} de harina de soya que genera una biomasa de 3×10^9 UFC ml^{-1} similar a un producto fermentado con efecto antagónico de *Monilia fructicola* (Yáñez *et al.*, 2006, pp. 18-24). Esto fue comparado con medios realizados por (Matsumoto *et al.*, 2000. pp 639 - 645), lo cual se determinó que el medio utilizado con harina de soya tuvo mejor resultados que los controladores químicos, de este modo coincide con otros estudios que la harina de soya posee gran contenido de nitrógeno en medios utilizados de forma artesanal.

1.4.2. Microorganismos antagonistas

Los estudios de microorganismos realizados en las últimas décadas han mostrado resultados eficientes en el control de enfermedades de poscosecha

de fruta (Teixidó *et al.* 2011). De los microorganismos estudiados se encuentran bacterias y levaduras las cuales han sido estudiadas con resultados eficaces para el control de enfermedades (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012b). Entre las ventajas de este tipo de control biológico frente a otros sistemas se ha podido demostrar a través de las siguientes características:

- Son amigables al ambiente debido a su baja toxicidad y residualidad, en comparación con otros controladores químicos que son utilizados con frecuencia por los agricultores.
- Permanecen más tiempo en las plantaciones dando así un mejor resultado.
- Producen muy baja incidencia en los ecosistemas de la planta ya que son depredadores de agentes patógenos, sin involucrarse con los microorganismos presentes en las plantas (Griffiths, 1981).
- Pueden ser aplicados con otros sistemas de control, sin interferir su acción.

Limitantes de la utilización de agentes de biocontrol:

- Los elevados costos que generan para determinar la inocuidad de los biocontroladores en la salud humana.
- La carencia de incentivos económicos para la formulación y producción de agentes de biocontrol
- Existen problemas de vida útil debido a que son microorganismos vivos los cuales tienen limitaciones de nutrientes, temperatura y actividad de agua.
- Problemas en formulación

1.4.3. Selección de un antagonista ideal

Para determinar microorganismos para agente de biocontrol, se debe tener en cuenta varios aspectos. Según (Wilson y Wisniewski, 1989, pp. 425-441) los biocontroladores deben poseer:

- La genética debe ser estable.
- Su efectividad debe estar relacionada a bajas concentraciones.
- Los requerimientos de alimento deben ser limitados.
- Resistentes a variaciones de temperatura.
- Una eficacia en varios tipos de patógenos para diversas frutas.
- Eficaces para la reproducción en medios de bajo costo
- Capaces de permanecer largos periodos de tiempo en conservación sin perder su capacidad antagónica.
- La aplicación debe ser amigable con los agricultores
- Alta resistencia a otros métodos de control como el químico

1.4.4. Producción de antagonistas en bioproductos

Existen estudios realizados previamente a la caracterización de crecimiento en medios enriquecidos, pruebas antagónicas contra *M. roreri* en laboratorio y en campo con la conservación de microorganismos (Yáñez, 2003, pp. 36).

Con las investigaciones que se han realizado; tecnológicas y económicas se determinó un sistema de producción en medio solido de bajo costo a nivel artesanal, los que cuentan con parámetros de temperatura de incubación, almacenamiento, esterilidad, determinación de concentraciones de biomasa (Yáñez, 2003, pp. 36).

1.4.5. Potencia de control biológico de *Bacillus subtilis* contra patógenos vegetales

Los estudios demuestran que *Bacillus subtilis* utiliza como acción antagónica la antibiosis a través de lipopéptidos anti fúngicos, competencia por espacio y estímulo de defensas secundarias al huésped (Ongena *et al.*, 2005 pp. 29-38). Investigaciones actuales, muestran que el microorganismo y la producción de lipopéptidos no actúan como antagonistas solamente sino que también como bloqueadores del crecimiento por competencia, se puede decir que son “inmuno estimuladores” por lo que aumenta la resistencia de la (Ongena *et al.*, 2005 pp. 29-38).

En las últimas investigaciones los resultados sobre lipopéptidos han demostraron que pueden incidir en la capacidad de *Bacillus subtilis* frente a los patógenos, como por ejemplo las surfactinas tienen un papel importante en la colonización de las cepas de *Bacillus subtilis* debido a que producen películas interface aire-agua (Chollet-Imbert *et al.*, 2009, pp. 63 - 71), en la formación de biopelículas en las raíces. En estudios realizados se comenzó a discutir que actúan como inductores de defensa en el huésped solas o en sinergismo con otros lipopéptidos (Ongena *et al.*, 2005 pp. 29-38).

2. CAPITULO II. METODOLOGIA

2.1. Caracterizar el crecimiento en medio de cultivo de *Bacillus subtilis* y sus metabolitos

2.1.1. Microorganismo y patógeno

Para este estudio se utilizó el aislado codificado de *Bacillus subtilis* cepaBSC1. Este microorganismo proviene de zonas productoras de cacao de la provincia de los Ríos y fue identificado por (Yáñez *et al.*, 2006, pp. 18-24) como *Bacillus subtilis* cuyas características principales son bacilo gram positivo, aerobio, termófilo, productor de endosporas y colonias rugosas.

En cuanto a sus características como agente de biocontrol, el aislado BSC1 ha demostrado en múltiples ensayos de campo y durante varios ciclos de producción reducir significativamente la moniliasis del cacao causada por *Moniliophthora roreri* en las variedades “nacional Tenguel 25 EET-103” y clon CCN-51 (Robles, 2008; Falconí y Yáñez, 2007; (Yáñez *et al.*, 2006, pp. 18-24); Peralvov Saavedra, 2005; (Yáñez, 2004, pp. 8).

Los aislados patogénicos de *M. roreri* se obtuvieron de muestras de mazorcas contaminadas siguiendo la metodología de aislamiento de patógenos vegetales diseñada por Agrios (2005) (Anexo 3). Se tomó una muestra del patógeno y se lo sembró en cajas con agar papa dextrosa (APD; 4 g^l⁻¹ de almidón de papa soluble, 20 g^l⁻¹ de dextrosa y 20 g^l⁻¹ de agar agar) y jugo V8 (23 g^l⁻¹ de agar, 3 g^l⁻¹ de CaCO₃, 340 ml de jugo V8) dejándolo incubar durante 4 a 5 días de 20 a 28°C. Para la purificación de cada cultivo se repitió el procedimiento y luego se almacenó en el refrigerador a 4°C.

Los aislados antagonista y patógeno fueron conservados en el laboratorio del Centro de Investigaciones, Estudio y Desarrollo de Ingenierías (CIEDI) de la Universidad de las Américas (UDLA) a corto plazo en agar nutritivo extracto de levadura y dextrosa (NYDA; 8 g^L⁻¹ de caldo nutritivo, 5 g^L⁻¹ de extracto de

levadura, 10 gL⁻¹ de dextrosa, 20 gL⁻¹ de agar) y en medio APD, a una temperatura de 4°C; y a largo plazo en un banco de cepas en criobolas (Anexo 2) o en Dimetilsulfóxido DMSO (Fisher Scientific, CPS 67-68-5, Lote 137567) a -80 °C (Yáñez-Mendizábal *et al.*, 2012, p. 281) y en tubos con agar inclinado más aceite de vaselina a -20°C (Anexo 3).

Cada cepa de bacteria se preparó en cajas de Petri medio NYDA durante 48 horas a 30°C. Se preparan cultivos en caldo nutritivo dextrosa comercial (NYDA) en tubos con 10 ml y se incuban durante 48 horas a 30° C y 150 rpm. Para la preparación de criobolas, criocultivos y cultivos en glicerol se tomaron cultivos almacenados en medio NYDA y se inocularon en criobolas congelándolas a -80°C. En el caso de los criocultivos en cada tubo con 10 ml de caldo nutritivo extracto de levadura y dextrosa (NYDB; 8 gL⁻¹ de caldo nutritivo, 5 gL⁻¹ de extracto de levadura, 10 gL⁻¹ de dextrosa) se adicionan 1000 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una concentración de 9% que luego se dispersa en tubos Eppendorf de 2 ml y se congela a -80°C.

Para la conservación de aislados de hongos se realizó la preparación de medios APD en cajas petri como en tubos para proceder hacer incubados durante 4 a 5 días hasta que el patógeno (hongo) esporule. Para criobolas se toman cultivos de cada cepa y se inoculan y se congelan en -80°C. En el caso de criocultivos el procedimiento fue parecido al que se utilizó para bacterias pero se utilizaron cultivos esporulados que provenían de APD inoculados hace 4 o 5 días. Los cultivos con glicerol es necesario que el hongo esporule en tubos con medio APD inclinado y se lo cubre con 3 a 5 ml de glicerina o aceite de vaselina y se almacenan a -80°C.

2.1.2. Preparación de inóculo

Para la preparación del inóculo se utilizó cultivos de *Bacillus subtilis* BSC1 que se mantuvieron rutinariamente en criobolas a -80°C y en medio NYDA a 4 °C. Para esto se preparó medios de cultivos frescos en cajas petri con medio NYDA donde se realizó un triple estriado, seguido de incubación por 24 horas

a 30°C. Una vez realizado este procedimiento, se preparó la suspensión inoculo transfiriendo biomasa fresca de la triple estría a una solución tampón fosfato salina estéril (PBS; 70 ml de KH_2PO_4 0.2M, 30 ml de K_2HPO_4 0.2 M y 300 ml de agua desionizada, v/v/v, pH 6.5).

2.1.3. Parámetros de crecimiento y producción de metabolitos *Bacillus subtilis* BSC1

2.1.2.1. Crecimiento de *B. subtilis* BSC1

La curva de crecimiento de *B. subtilis* BSC1, fue caracterizada mediante estudio de la dinámica poblacional de la bacteria en función del tiempo siguiendo la metodología descrita por Yáñez I *et al.* (2011). Para esto se determinó la variación de las concentraciones de BSC1 en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC ml^{-1}) durante su crecimiento en medio tripticasa soya desde 0 hasta 72 horas el experimento se realizó con un diseño completamente al azar y tres repeticiones donde cada unidad experimental fue representada en erlenmeyers de 250 ml con 100 ml de caldo tripticasa soya (TSB; 17 g l^{-1} de peptona de caseína, 3 g l^{-1} de peptona de harina de soya, 5 g l^{-1} de cloruro de sodio, 2.5 g l^{-1} de hidrógeno fosfato dipotásico, 2.5 g l^{-1} de D Glucosa).

Cada erlenmeyer con 100 ml de medio de cultivo se inoculó con 100 μL del inoculo bacteriano preparado en PBS como se describió anteriormente y se incubaron a 30°C y 150 rpm. Para cuantificar las concentraciones en función del tiempo se tomaron muestras de los cultivos en medio TSB, y se realizaron diluciones seriadas en PBS y plateo en medio NYDA desde las 0 a 24 horas con intervalos de 2 horas y a las 48 y 72 horas (Anexo 4). Los diferentes cultivos en NYDA fueron incubados por 24 horas a 30°C y los datos de las concentraciones en UFC ml^{-1} de cada tiempo provenientes de cada una de las repeticiones fueron anotados. Este experimento se realizó por tres ocasiones.

2.1.3.2. Modelización de crecimiento de *B. subtilis* BSC1 (curva de crecimiento)

Para determinar el modelo del crecimiento de *B. subtilis* BSC1 los datos de las concentraciones de UFC ml⁻¹ de cada tiempo fueron transformados al logaritmo en base diez LogUFC ml⁻¹ y analizados usando la ecuación completa descrita por (Baranyi y Roberts, 1994, p 277-294) que permite determinar los cambios en las concentraciones celulares en Log UFC·ml⁻¹ en relación al tiempo. Los datos experimentales bajo el modelo de (Baranyi y Roberts, 1994, p 277-294) fueron analizados usando el software *ComBase* (Anexo 5).

Mediante el análisis de los datos usando el modelo de (Baranyi y Roberts, 1994, p 277-294) se determinaron los parámetros que la duración de la fase λ-lag (horas), la máxima tasa de desarrollo (μ_{max} h⁻¹) y la máxima densidad de población [log₁₀ (UFC·ml⁻¹)]. Los parámetros estimados se establecieron de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$y(t) = y_0 + \mu_{max}A(t) - \frac{1}{m} \ln \left[e^{m\mu_{max}A(t)} - \frac{1}{e^{m(y_{max}-y_0)}} \right] \quad \text{Ecuación 1}$$

$$A(t) = t + 1/\mu_{max} \ln \left(e^{-\mu_{max}t} + \frac{q_0}{1 + q_0} \right) \quad \text{Ecuación 2}$$

$$\lambda = \ln \left(1 + \frac{1}{q_0} \right) / \mu_{max} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde y(t) es el logaritmo natural de la concentración de células en el tiempo (h), y₀ es el logaritmo natural de la concentración de células en tiempo 0; μ_{max} es la máxima tasa de desarrollo específico (h⁻¹); A(t) es la variable integral que va desde el tiempo 0 al tiempo t; m es el parámetro relacionado con curvatura después de la fase exponencial; y_{max} es el logaritmo natural de la concentración máxima de la célula y q₀ es el estado fisiológico de la célula al tiempo 0.

2.1.3.3. Producción de endosporas y metabolitos

Para determinar de producción de células totales y endosporas se siguió la metodología descrita por (Yáñez *et al.*, 2006, pp. 18-24), mediante la cual se cuantifica la producción de células totales y endosporas en función del tiempo en medio de cultivo líquido. Para los experimentos se cuantificaron, las concentraciones de BSC1 a partir de cultivos bacterianos de 24, 48 y 72 en medio TSB y óptimo para la producción de lipopéptidos (MOLP; Peptona 30 g·l⁻¹; Sacarosa 20 g·l⁻¹; Extracto de levadura 7 g·l⁻¹; KH₂PO₄ 1.9 g·l⁻¹; CuSO₄ 0.0001 mg·l⁻¹; FeCl₃·6H₂O 0.0005 mg·l⁻¹; Na₂MoO₄ 0.004 mg·l⁻¹; KI 0.0002 mg·l⁻¹; MnSO₄·H₂O 3.6 mg·l⁻¹; MgSO₄ 0.45 g·l⁻¹; ZnSO₄·7H₂O 0.14 mg·l⁻¹; H₃BO₃ 0.01 mg·l⁻¹; C₆H₈O₇ 10 mg·l⁻¹; pH 7) (Jacques *et al.*, 1999) incubados a 30 °C y 150 rpm por 24 horas (Anexo 6).

Cada experimento se realizó con tres repeticiones donde cada unidad experimental fue representada por Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de los diferentes medios. Las concentraciones de células totales en UFC ml⁻¹ producidas por BSC1 en UFC ml⁻¹ se determinaron mediante dilución y plateo como se describió anteriormente. Para la determinación de endosporas se tomaron alícuotas de 5 ml cada una de las repeticiones de los diferentes medios y se incubaron a 80 °C por 15 minutos para matar las células vegetativas y las endosporas se cuantificaron por dilución y plateo siguiendo la metodología antes descrita.

Los datos se transformaron a Log₁₀UFC ml⁻¹ y se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron separadas por la prueba de Student Newman Keuls SNK ($P < 0.05$) usando el software SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

Los metabolitos antifúngicos fueron obtenidos a partir de los cultivos de BSC1 de 72 horas de crecimiento en medio MOLP, para lo cual 50 ml de medio de cultivo se centrifugaron a 10000 rpm; 4 °C y 20 minutos; y posteriormente el sobrenadante libre de células se filtró usando a través de filtros *Milipore* de 0.1 µm de diámetro.

2.2. Optimización de medio de cultivo de bajo costo y parámetros físicos de crecimiento para producción de biomasa y metabolitos

2.2.1. Investigación de productos comerciales como fuente de nitrógeno y carbono para la optimización de un medio de bajo costo

Para el diseño y optimización del medio de bajo costo para el crecimiento de *B. subtilis* BSC1, se evaluó y seleccionó diferentes productos comerciales y subproductos de la industria agrícola como fuentes de nitrógeno y carbono. Para esta selección de las fuentes (productos) se consideró que los costos sean bajos, que la producción genere altas concentraciones de biomasa de *B. subtilis* BSC1 en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC ml⁻¹) y que la efectividad antagónica para el control de la moniliasis del cacao se mantenga.

En base a estudios previos realizados por Yáñez-Mendizábal *et al.* (2012a) y (Matsumoto *et al.*, 2000. pp 639 - 645), se seleccionaron dos productos de soja correspondiente a harina de soja comercial tostada y harina de soja comercial molida “El Agricultor Chacrero” como fuentes de nitrógeno (Figura 3A). Estas dos fuentes son consideradas como excelentes sustratos rentables económicamente para la producción de *Bacillus subtilis* y sus metabolitos debido a que poseen proteína, carbohidratos, vitaminas y minerales (Tabla 2).

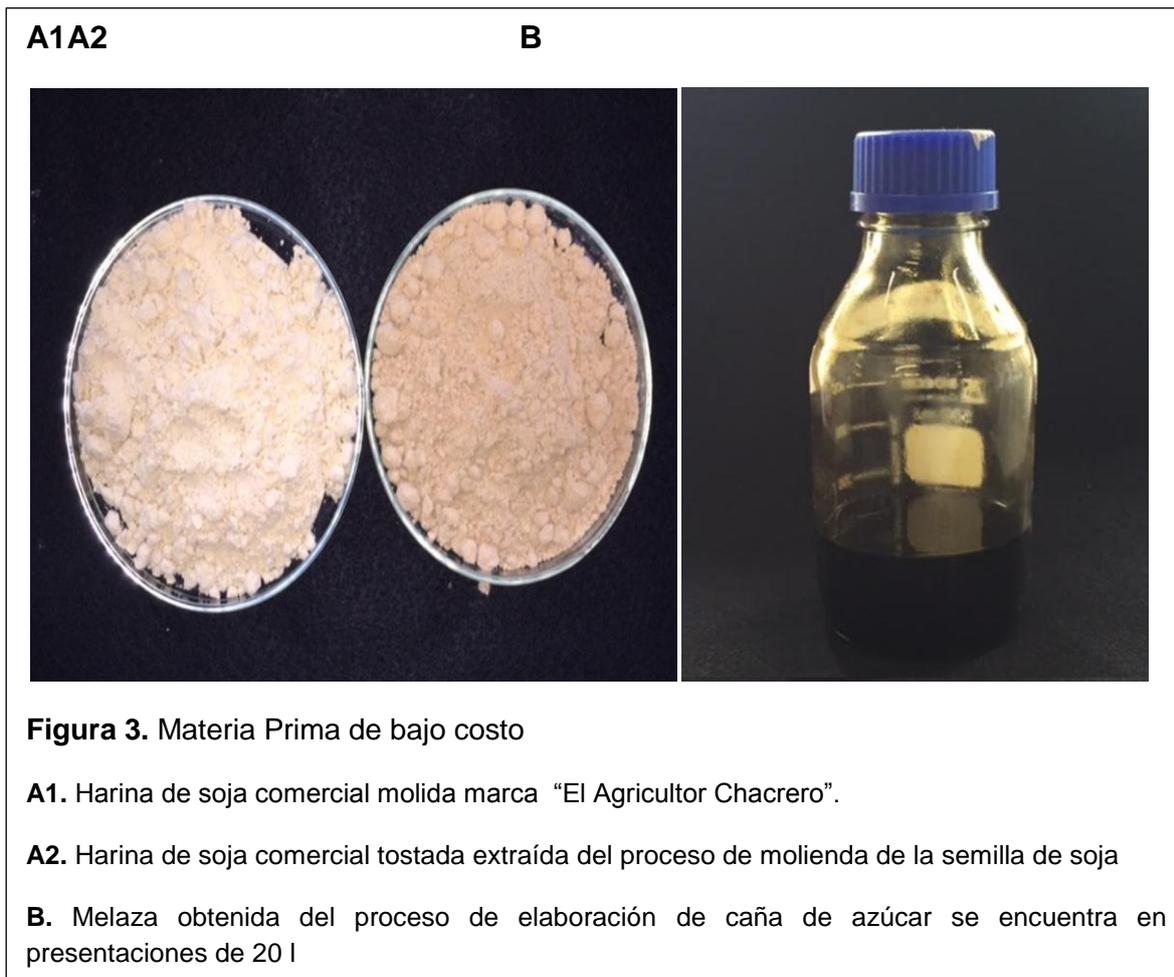


Tabla 2. Contenido Nutricional de la Harina de Soja

Nutrientes	Cantidad Kcal kg⁻¹	Cantidad(g-
Energía	447Kcal/kg	
Proteína	36.80 g	
Grasa Total	23.50 g	
Colesterol	0 mg	
Glúcidos	23.50 g	
Fibra	10.70 g	
Calcio	210 mg	
Hierro	6.90 mg	
Vitamina E	1.50 mg	
Vitamina B12	0µg	
Folato	3 µg	

Otro producto que se utilizó es la melaza de la caña de azúcar, que es un subproducto de la industria azucarera y que se utiliza para producción de alcohol y microorganismos benéficos (Figura 3B) (Costa *et al.*, 2001, pp.1323 - 1328; Kotzamanidis *et al.* 2002). La melaza de la caña fue incluida como fuente de carbono ya que posee un alto contenido de azúcar (aproximadamente 50% sacarosa, glucosa y fructuosa), se ha determinado que es una suspensión coloidal. (Tabla 3).

Tabla 3. Contenido nutricional de la melaza

Nutrientes	Cantidad(%-Mcal kg⁻¹)
Materia seca	78 %
Energía metabolizable (aves)	1.96Mcal/kg
Energía digestible (cerdos)	2.54Mcal/kg
Proteína	2 %
Metionina	0 %
Metionina + cistina	0 %
Lisina	0 %
Calcio	0.6 %
Fósforo disponible	0.07 %
Ácido linoleico	0 %
Grasa	0.1 %
Fibra	0 %
Ceniza	9.8 %

Para el diseño de medios de cultivo los dos tipos de harina de soja (harina comercial y harina molida –tostada) como fuente de nitrógeno y melaza como fuente de carbono, fueron estudiados en base a los resultados previos obtenidos por (Yáñez *et al.*, 2006, pp. 18-24). Los dos tipos de harina se utilizaron en dos ensayos por separado a una concentración de 40gl⁻¹ (Tabla 4). Una vez fijada la concentración de los diferentes tipos de harina la melaza de caña de azúcar se estudió en tres concentraciones de 2gl⁻¹, 4 gl⁻¹ y 6gl⁻¹.

¹(Tabla 4). Como controles utilizaron los medios estandarizados TSB y MOLP (Jaques *et al.* 1999) cuya composición se describió anteriormente.

Tabla 4. Composición de los medios de crecimiento

Ensayo	Fuente de Nitrógeno	g·l ⁻¹	Fuente de Carbono	g·l ⁻¹
1	Harina de Soya Comercial Tostada+ A.(1)	40	Melaza	2
2	Harina de Soya Comercial Tostada +A. (1)	40	Melaza	4
3	Harina de Soya Comercial Tostada +A. (1)	40	Melaza	6
4	Harina de Soya Comercial Molida + A.(2)	40	Melaza	2
5	Harina de Soya Comercial Molida+ A. (2)	40	Melaza	4
6	Harina de Soya Comercial Molida+ A. (2)	40	Melaza	6

Nota: A= Stock de minerales: 1000x. KH₂PO₄ 1.9 g·l⁻¹; CuSO₄ 0.0001 mg·l⁻¹; FeCl₃·6H₂O 0.0005 mg·l⁻¹; Na₂MoO₄ 0.004 mg·l⁻¹; KI 0.0002 mg·l⁻¹; MnSO₄·H₂O 3.6 mg·l⁻¹; MgSO₄ 0.45 g·l⁻¹; ZnSO₄·7H₂O 0.14 mg·l⁻¹; H₃BO₃ 0.01 mg·l⁻¹; C₆H₈O₇ 10 mg·L⁻¹

Una vez que se determinaron los componentes para la optimización del medio de cultivo de bajo costo, todos los ensayos se realizaron en matraces erlenmeyer de vidrio de 250mlde capacidad con 100ml de cada medio experimental. Cada medio de cultivo experimental tuvo tres repeticiones donde la unidad experimental consistió en un erlenmeyer con 100 ml de medio(Figura 4). Se utilizó un diseño completamente al azar.



Los diferentes medios con cada una de sus repeticiones fueron inoculados con *Bacillus subtilis* BSC1 a 2×10^5 UFC ml⁻¹ (por repetición) y se incubaron a 30°C y 150rpm durante 72 horas. Las concentraciones en UFC ml para cada medio se determinaron mediante dilución y plateo en NYDA como se describió anteriormente a las 24, 48 y 72 horas de incubación (Figura 4B).

2.3. Escalado de producción en bioreactor

2.3.1. Experimentos en bioreactor

Para el escalado de la producción de *Bacillus subtilis* BSC1, se utilizó una unidad de fermentación (bioreactor) de 5L y control de crecimiento (*eZ Control-applikon® biotechnology*; Holanda) (Figura 5A-B). En base a los resultados de optimización de medios de bajo costo se preparó 5 l de medio de cultivo optimizado HS140-MOL2 (compuesto por 40g l^{-1} de harina de soja desengrasada tostada 1, 2g l^{-1} de melaza de caña $1.9\text{ g l}^{-1}\text{KH}_2\text{PO}_4$ y 1ml^{-1} del suplemento de sales stock 1000x establecidas para el medio MOLP y descritas Jacques *et al*, 1999). Además se añadió antiespumante a 0.01% (Antifoam204 Sigma®) para evitar la formación de espuma durante el proceso. Una vez preparado el medio se procedió a la calibración de la sonda de pH en base a las especificaciones descritas en el manual del bioreactor, esterilizado a $121\text{ }^\circ\text{C}$ por 15 min, y calibrado de sonda de detección de oxígeno disuelto (O_2) en el medio (Anexo 7).

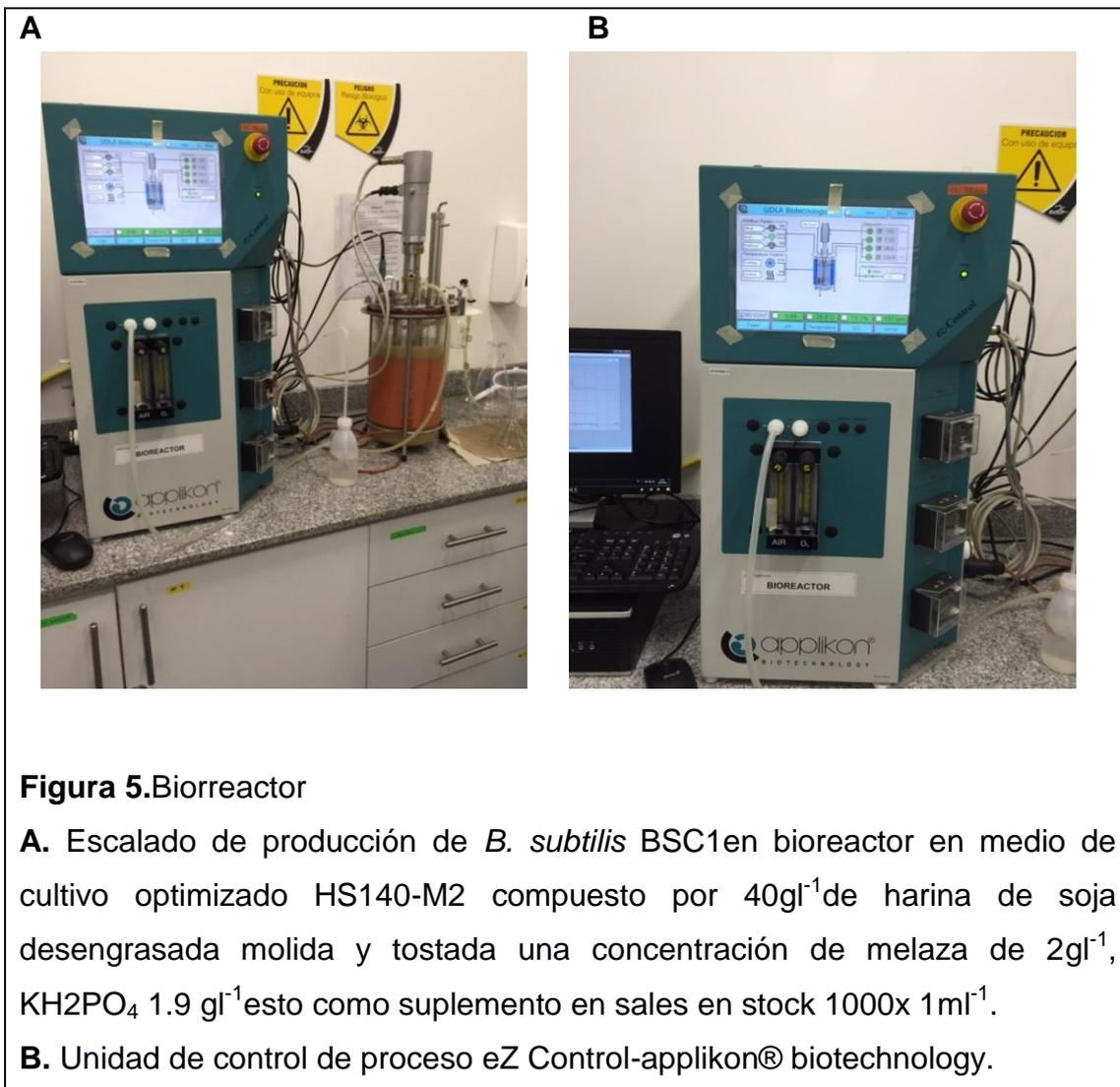


Figura 5.Biorreactor

A. Escalado de producción de *B. subtilis* BSC1 en bioreactor en medio de cultivo optimizado HS140-M2 compuesto por 40g l^{-1} de harina de soja desengrasada molida y tostada una concentración de melaza de 2g l^{-1} , KH_2PO_4 1.9g l^{-1} esto como suplemento en sales en stock $1000\times 1\text{ml}^{-1}$.

B. Unidad de control de proceso eZ Control-applikon® biotechnology.

Posteriormente se inoculó el bioreactor con la bacteria para lo cual se preparó un inóculo en PBS como se describió anteriormente y se ajustó a una concentración inicial de $2\times 10^5\text{UFC ml}^{-1}$. Se calibró el equipo de acuerdo al manual de procedimientos del equipo empezado con la temperatura a 30°C para continuar con las revoluciones 200rpm y 100Lh^{-1} de flujo de aire y se activaron los controles de las sondas de pH y O_2 . Todos los indicadores como temperatura, pH, concentración de O_2 en el medio estuvieron monitoreados durante 24 y 48 horas según la unidad establecida por el equipo (eZ Control Harward V2 applikon® biotechnology).

Para determinar las concentraciones de *Bacillus subtilis* BSC1a lo largo del proceso de crecimiento se monitorearon las concentraciones en UFC ml⁻¹ desde 0 a 40 horas con intervalos de dos horas hasta las primeras 24 horas; y luego a las 30 y 40 horas. Para la determinación de concentraciones de la bacteria en UFC ml se tomaron muestras por cuadruplicado del cultivo en cada tiempo y se utilizó el método de dilución y plateo en medio NYDA descrito anteriormente. El experimento se realizó dos veces. Los resultados de los datos en UFC ml⁻¹ se transformaron en logaritmos en base 10 y la curva de crecimiento fue dibujada, modelizada y validada usando la ecuación de (Baranyi y Roberts, 1994, pp. 277-294) como se describió anteriormente.

2.3.2. Actividad antagónica *in vitro* de *Bacillus subtilis* BSC1 contra *M. royeri*

Los ensayos de efectividad se realizaron usando la metodología descrita por (Yáñez *et al.*, 2006, pp. 18-24), para medir la inhibición de crecimiento micelial *in vitro*. Para medir la actividad antifúngica se utilizaron biomasa, endosporas y sobrenadantes libres de *Bacillus subtilis* BSC1 producidos en el medio optimizado de bajo costo HS140-MOL2 (harina de soja 40 g L⁻¹ melaza 2 g L⁻¹ más sales) por un periodo de 40 horas. Los diferentes tratamientos fueron preparados a partir de un cultivo de BSC1 crecido en bioreactor en las condiciones antes descritas. Las células vegetativas, endosporas y sobrenadantes libres de células se obtuvieron siguiendo la metodología descrita por Yáñez (2012) de caracterización de la bacteria.

Por lo tanto en pruebas de antagonismo *in vitro* fueron realizadas usando pruebas duales en cajas de petri de 9 cm de diámetro con medio APD donde se colocaron rodajas de agar (5mm de diámetro) con micelio activo del hongo en centro y posteriormente se colocaron a 3 cm de distancia del patógeno *M. royeri* los diferentes tipos de tratamientos mediante rodajas de papel filtro de 5 mm de diámetro. Para el control se utilizaron cajas de Petri con medio APD a las cuales se las inoculó con el micelio del hongo y los tratamientos fueron

reemplazados por rodajas de papel filtro anegadas de agua estéril. Cada tratamiento se realizó con cinco repeticiones y con un diseño completamente al azar. Los diferentes tratamientos fueron incubados a 25 °C durante 5 días. Luego de la incubación se midieron por cada tratamiento y el control el diámetro de crecimiento del micelio y con los datos se determinaron los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial *Bacillus subtilis* mediante la

$$\% \text{ inhibición} = \frac{Dc - Dt}{Dc} * 100$$

Ecuación 4

Donde Dc representa al diámetro de crecimiento micelial del control en centímetros y Dt al diámetro de crecimiento micelial del patógeno en presencia del antagonista. Los datos de porcentaje de inhibición se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y las medias fueron separadas por la prueba de Student Newman Keuls SNK ($P < 0.05$) usando el software SAS (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) para la selección de aislados de *Bacillus* spp. De significativa actividad antifúngica.

3. CAPITULO III. RESULTADOS

3.1. Caracterización del crecimiento en medio de cultivo de *Bacillus subtilis* y sus metabolitos anti fúngicos.

3.1.1. Características de *B.subtilis*BSC1 y *Moniliophthora roreri* in vitro

B. subtilis in vitro poseen colonias beta hemolíticas con hemólisis completa de 2 a 4mm de diámetro, posee un aspecto liso mucoso o rugoso, los bordes pueden ser ondulados y se extienden sobre el medio, ocasionalmente suelen dar la apariencia de cultivos mixtos como se muestra en la Figura 6.

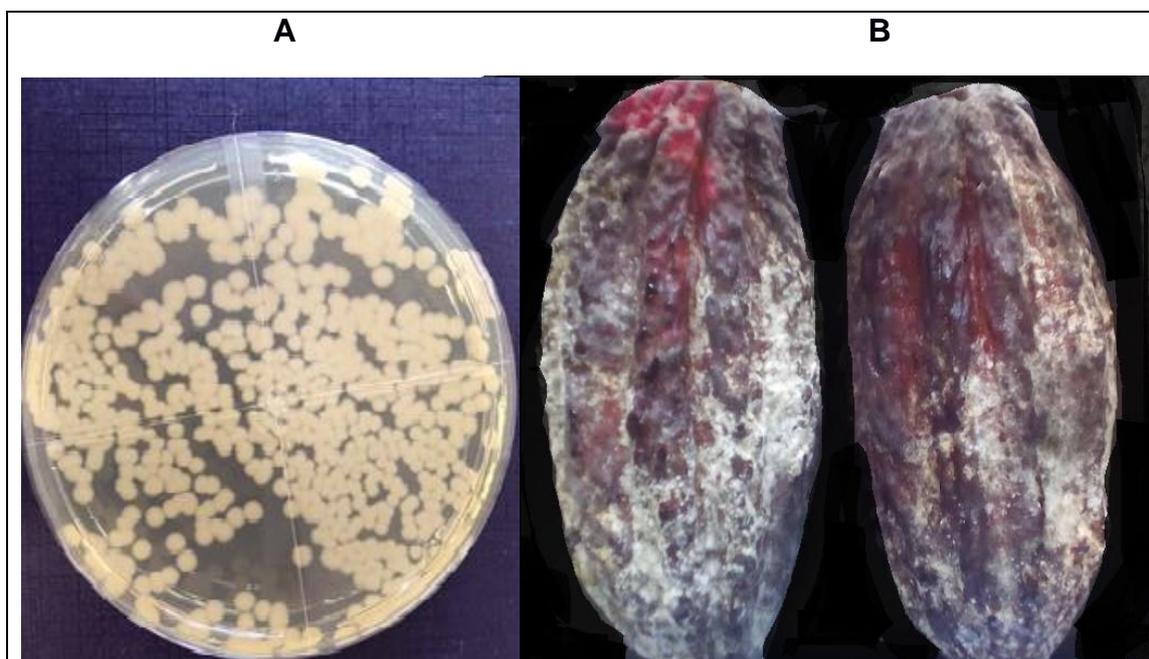


Figura 6. Microorganismos

A. *Bacillus subtilis* en medio agar NYDA.

B. Mazorcas de cacao con micelio activo de *Moniliophthora roreri*.

Moniliophthora roreri se caracteriza por presentar una necrosis que deforma y pudre a las mazorcas. En el fruto se puede visualizar el micelio del hongo de color blanquecino tal como se muestra en la Figura 6. Dependiendo de los días

de incubación del hongo el cacao puede tomar una coloración negra. Otro de los síntomas puede ser el cambio de color dando la apariencia de madurez de los frutos que todavía están inmaduros, en los frutos contagiados por la enfermedad que son menores a 7 semanas se puede observar una deformación de la superficie con forma de giba. En medio de cultivo *in vitro* *M. royeri* tiene una apariencia de micelio blanquecino con esporas de color café.

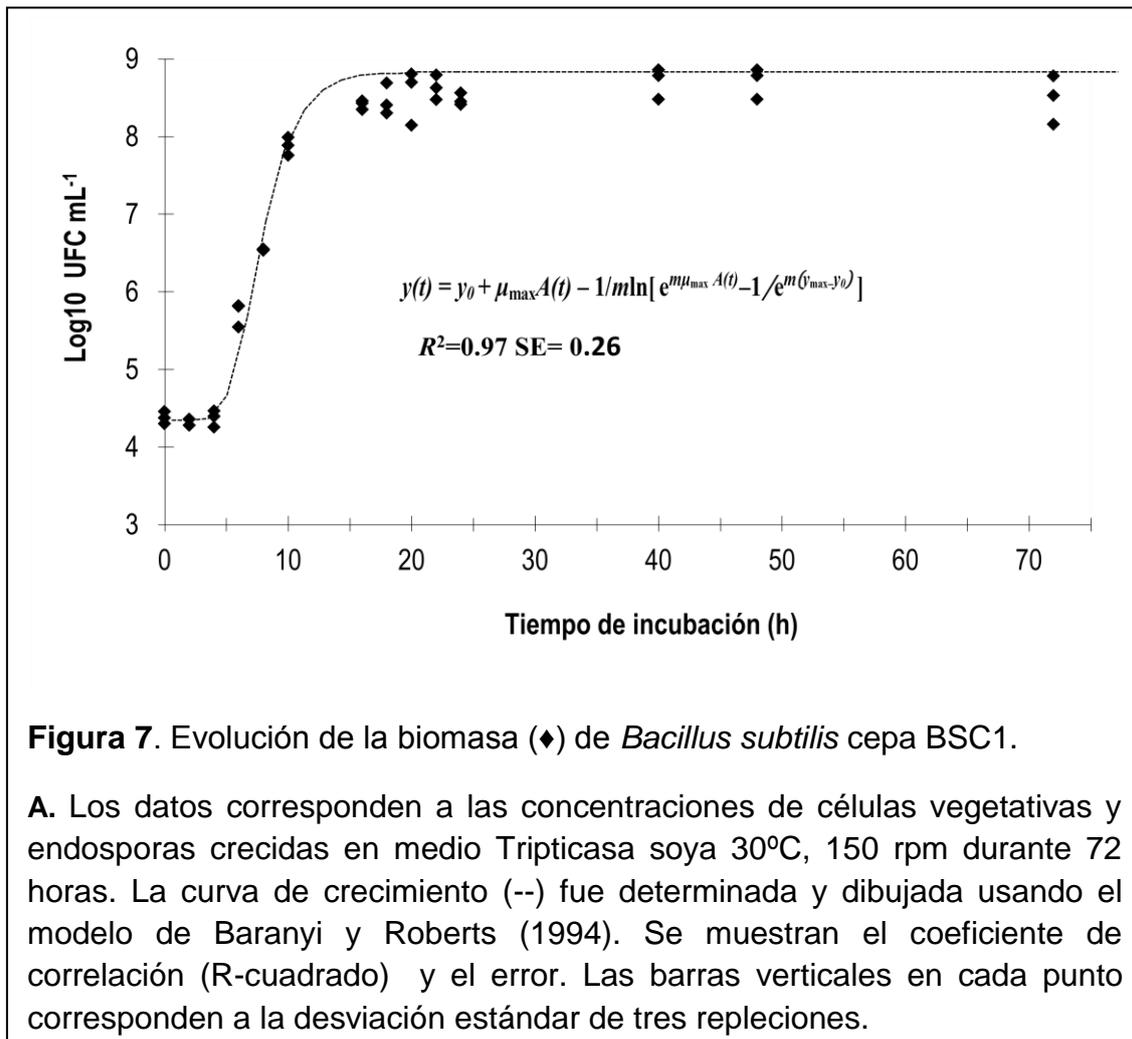
3.1.2. Dinámica de crecimiento de (modelización de crecimiento)

Como se indica en la Tabla 5 y en la Figura 7B. *B. subtilis* BSC1 presenta un crecimiento paulatino desde 4.4 hasta sobre 8 Log UFC ml⁻¹ desde las 0 a las 20 horas. Se observa un crecimiento sigmoidea característico de las bacteria con una fase de latencia hasta aproximadamente la cuarta hora, seguido por la fase exponencial, a partir de la sexta hora la fase estacionaria horas. Para lo cual nos basamos en el análisis de (Baranyi y Roberts, 1994, p 277-294). Los resultados fueron latencia (lag) = 4.58 horas tasa máxima de crecimiento 2.84 Log₁₀ (UFC ml⁻¹) h⁻¹, máxima densidad poblacional 7.97 Log₁₀ (UFC ml⁻¹), R²=0.97 y SE= 0.26 (Anexo 8).

Los datos corresponden al promedio de los conteos para tres repeticiones.

Tabla 5. Crecimiento de *Bacillus subtilis* BSC1 en relación al tiempo en medio de caldo tripticasa soya (TSB) a 30 °C y 150rpm.

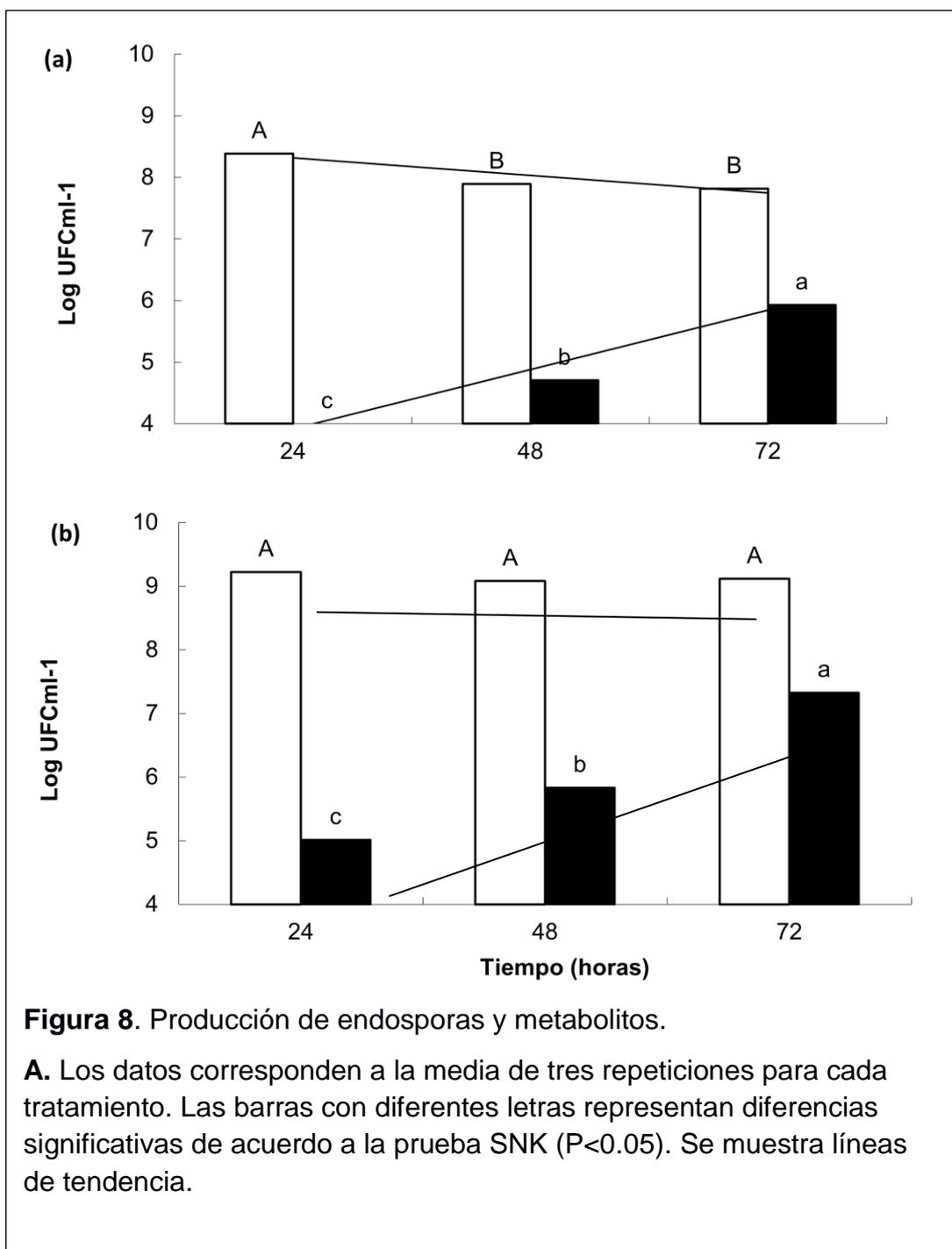
Concentraciones (LogUFCml ⁻¹)	Tiempo (horas)													
	0	2	4	6	8	10	16	18	20	22	24	40	48	72
R1	4.4±0.	4.4±0.	4.3±0.	5.5±0.	6.5±0.	7.9±0.	8.4±0.	8.4±0.	8.8±0.	8.5±0.	8.5±0.	8.5±0.	8.5±0.	8.8±0.
	1	0	1	2	0	1	1	2	4	2	1	2	2	3
R2	4.5±0.	4.3±0.	4.4±0.	5.8±0.	6.6±0.	8.0±0.	8.5±0.	8.3±0.	8.7±0.	8.6±0.	8.4±0.	8.8±0.	8.8±0.	8.2±0.
	1	0	1	2	0	1	1	2	4	2	1	2	2	3
R3	4.3±0.	4.4±0.	4.5±0.	5.8±0.	6.5±0.	7.8±0.	8.3±0.	8.7±0.	8.1±0.	8.8±0.	8.6±0.	8.9±0.	8.9±0.	8.5±0.
	1	0	1	2	0	1	1	2	4	2	1	2	2	3



3.1.3. Producción de endosporas y metabolitos

Para la determinación de producción de células vegetativas y endosporas se siguió la metodología descrita por (Yáñez *et al.*, 2006, pp. 18-24). Se realizó en dos medios de cultivo TSB y MOLP, los resultados obtenidos se indica en la (Figura 8) donde el crecimiento de células vegetativas en medio TSB fue de 8 (Log UFCml⁻¹), las 48 y 72 horas mientras tanto que el crecimiento de esporas tuvo un significativo desde las 48 a 72 horas. En el medio MOLP el crecimiento fue mayor debido a que este medio contiene nutrientes adicionales, las concentraciones de células vegetativas en este medio a las 24, 28 y 72 horas. Se mantuvo en 10⁹ (UFC ml⁻¹) mientras tanto el aumento de endosporas fue significativo desde 5.2 (logUFC ml⁻¹) a las 24 horas, 6 (logUFC ml⁻¹) 48

horas, 7 ($\log\text{UFC ml}^{-1}$) a las 72 horas de tal manera queda demostrado que el medio MOLP es más eficiente para el crecimiento de endosporas y células vegetativas. Los metabolitos que se observaron en los cultivos de 24,48 y 72 horas pertenecen a los lipopéptidos iturinas, surfactinas y fengicinas



3.2. Optimización de medio de cultivo de bajo costo y parámetros físicos de crecimiento para producción de biomasa

3.2.1. Producción de *Bacillus subtilis* BSC1 en medios de bajo costo.

Como se indica en la Tabla 4. y 5. Los resultados de los medios de bajo costo con evaluación de dos tipos de fuentes de nitrógeno (Harina de soja: comercial y molida-tostada) y diferentes concentraciones de fuentes de carbono (melaza), de tal manera los medios de bajo costo no reflejan diferencia con el control MOLP, los medios optimizados con la concentración de 2 g de melaza y 40 g de harina de soja por litro más sales mejoradas han demostrado ser los más eficientes a las 24 y 48 horas, pero los medios con concentraciones de 4 gl^{-1} y 6 gl^{-1} de melaza y 40g de harina de soja por litro demostraron ser eficientes pero con variaciones a las 24 y 48 horas por lo tanto se llegó a optar por la primera concentración, estos datos nos ayudan para posteriormente realizar a nivel de bioreactor e industrial.

Tabla 6. Concentraciones del experimento 1 a 24, 48 y 72 horas mediante dilución y platio.

Experimento 1	
Medios de cultivo	Concentraciones (UFC ml^{-1})
TSB	1.78×10^9
MOLP	2.23×10^9
HS140MOL2	1.75×10^9
HS140MOL4	1.70×10^9
HS140MOL6	1.53×10^9

Tabla 7. Concentraciones del experimento 2 a 24, 48 y 72 horas mediante dilución y plateo.

Experimento 2	
Medios de cultivo	Concentraciones (UFC ml⁻¹)
TSB	1.10X10 ⁹
MOLP	2.53X10 ⁹
HS140MOL2	1.81X10 ⁹
HS140MOL4	1.93X10 ⁹
HS140MOL6	1.61X10 ⁹

Tabla 8. Concentración de *Bacillus subtilis* BSC1 crecido en diferentes medios de cultivo

Medio de cultivo	Concentraciones (Log UFC/ml) – Tiempo (horas)		
	24	48	72
TSB	9.3±0.1	9.2±0.0	9.2±0.1
MOLP	9.4±0.0	9.3±0.2	9.2±0.1
HS140-MOL2	9.2±0.1	9.2±0.1	9.3±0.1
HS1MOL4	9.3±0.1	9.2±0.0	9.2±0.1
HS2MOL6	9.2±0.1	9.1±0.1	9.2±0.1

Nota: Medios de laboratorio y de bajo costo a 30 °C y 150rpm de 24 a 72 horas. Los datos corresponden a la media de tres repeticiones. Se muestra para cada medio la desviación estándar.

HS140-MOL2=Harina de soja y 2 gl⁻¹ de Melaza; HS1MOL4= Harina de soja y 4 gl⁻¹deMelaza; HS1MOL6= Harina de soja y 6gl⁻¹de Melaza; MOLP = Medio óptimo para la producción de lipopéptidos; TSB= Tripticasa soya caldo (ingles).

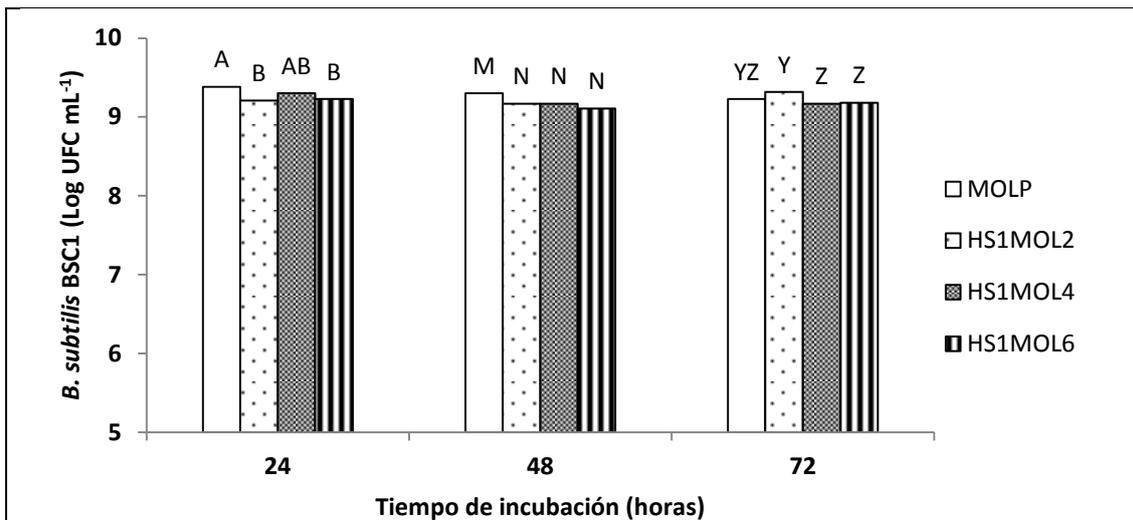


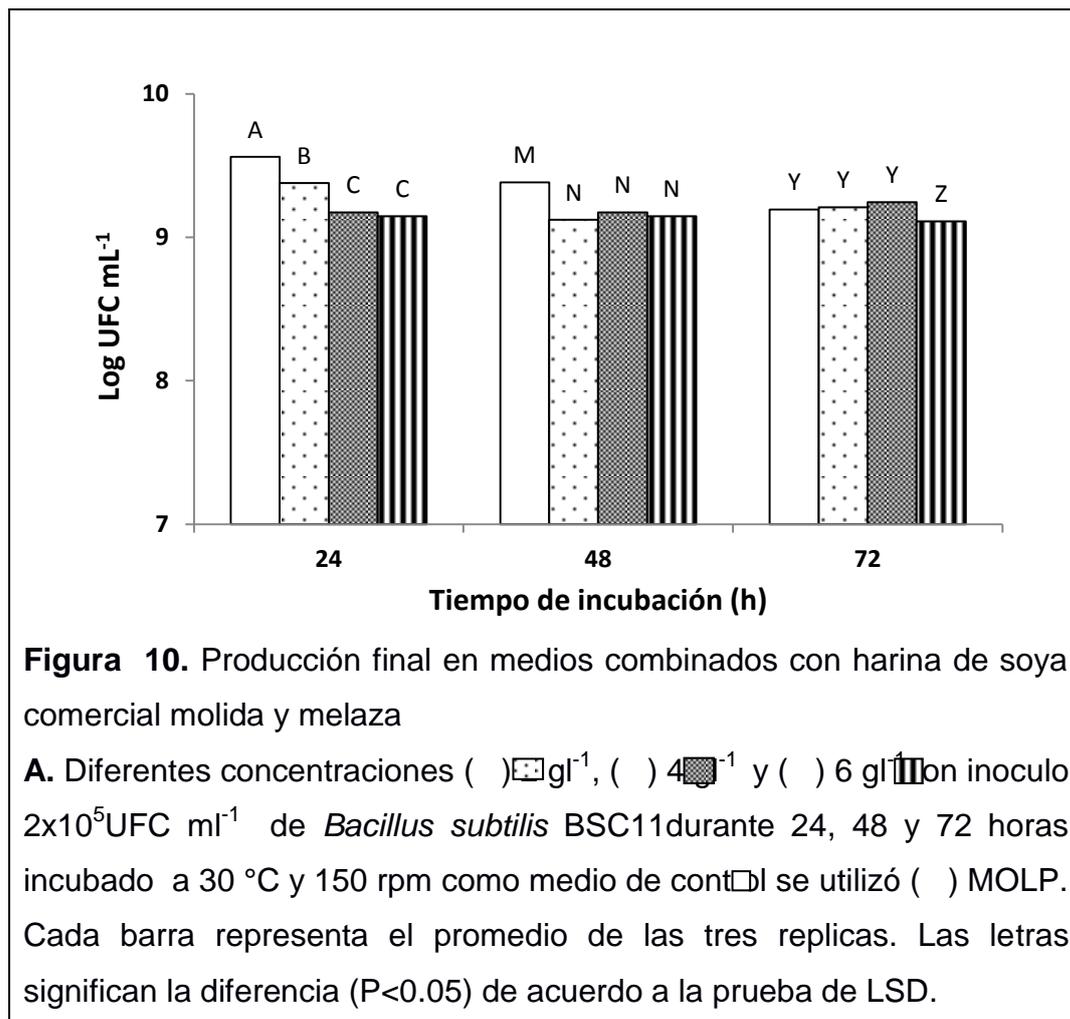
Figura 9. Producción de *B. subtilis* BSC1

A. Medios de cultivo combinados con harina de soja comercial tostada 40 gl^{-1} en diferentes concentraciones de melaza las cuales fueron (\square) 2 gl^{-1} , (\boxtimes) 4 gl^{-1} y (\blacksquare) 6 gl^{-1} durante 24, 48 y 72 horas incubado a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y 150 rpm como medio de control se utilizó (\square) MOLP. Cada barra representa el promedio de las tres repeticiones independientes. Las letras significan la diferencia ($P < 0.05$) de acuerdo a la prueba de LSD.

Tabla 9. Concentración (UFC) de *Bacillus subtilis* BSC1

Medio de Cultivo	Tiempos de incubación (horas)		
	24	48	72
MOLP	9.6 ± 0.1	9.4 ± 0.0	9.2 ± 0.1
HS140-MOL2	9.4 ± 0.1	9.1 ± 0.1	9.2 ± 0.1
HS2MOL4	9.2 ± 0.0	9.2 ± 0.1	9.3 ± 0.0
HS6MOL6	9.1 ± 0.1	9.1 ± 0.1	9.0 ± 0.2

Nota: *Bacillus subtilis* BSC1 crecido en diferentes medios de cultivo en laboratorio a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y 150 rpm de 24 a 72 horas. Los datos corresponden a la media de tres repeticiones.



3.3. Escalado de producción en bioreactor mediante la modelización y concentración del crecimiento bacteriano en medios de bajo costo

3.3.1 Escalado de producción *Bacillus subtilis* BSC1 en bioreactor de cinco litros

La Figura 11 nos indica el método dinámico con el cual se observó el crecimiento de *Bacillus subtilis* BSC1 en medio HS140-MOL2 descrita anteriormente. Los parámetros estuvieron ajustados al crecimiento sigmoidea del modelo de Baranyi. El pH se mantuvo alrededor de 6.1, dentro de las primeras 16 horas, el crecimiento de *Bacillus subtilis* BSC1 fue incrementando progresivamente mientras que el pH tuvo un descenso hasta la finalización del ensayo. Estos niveles son considerados aptos para el crecimiento bacteriano,

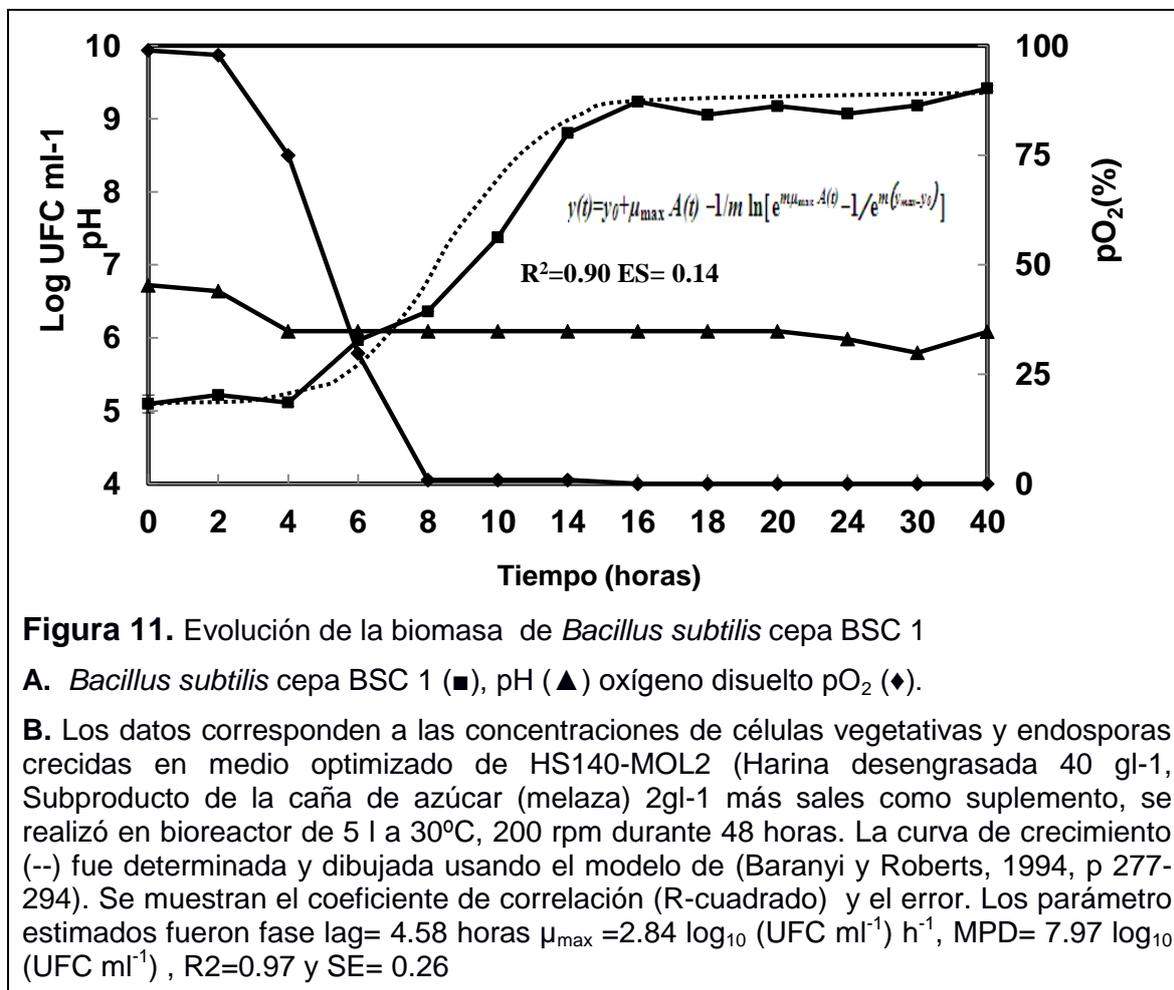
estudios realizados Jaques *et al.* (1999) indican que en un pH de 7 existe mayor producción de biomasa, endosporas y lipopéptidos en la fermentación líquida. A las dos horas la concentración de oxígeno tuvo una caída de 100% a 0%, esto no interfirió en el crecimiento de *Bacillus subtilis* BSC1. La bacteria es considerada como aerobia estricta, lo que significa que puede crecer en escasas o en presencia de oxígeno (Nakano y Zuber, 2002, pp. 1341-1349). A las 30 horas se observó un leve apareamiento de espuma, esto no generó un problema de desbordamiento del medio de cultivo, es importante tomar en cuenta cuando se realiza un experimento que dura 48 horas para incrementar la producción de endosporas y metabolitos anti fúngicos es necesario el uso de antiespumantes, para el experimento se utilizó una concentración al 0.01% de Antifoam204 Sigma®.

Según este experimento lo que se pudo observar una fase de latencia de 4 hora y un inicio de la fase exponencial hasta la hora 16, la población máxima fue de 9.2 (UFC ml⁻¹). En la fase estacionaria se detectó una concentración alrededor de 9.1 (UFC ml⁻¹) con el promedio de la desviación estándar de 0.1 lo que demostró correlación.

Tabla 10. Parámetros para el crecimiento en bioreactor de 5 l con medio optimizado HS140-MOL2 .

Tiempo (horas)	Log UFC	pH	pO ₂
0	5.1±0.1	6.7	99
2	5.2±0.1	6.6	97.9
4	5.1±0.1	6.1	75
6	6.0±0.0	6.1	29.8
8	6.4±0.0	6.1	0.9
10	7.4±0.1	6.1	0.9
14	8.8±0.0	6.1	0.9
16	9.2±0.0	6.1	0
18	9.1±0.0	6.1	0
20	9.2±0.0	6.1	0
24	9.1±0.0	6	0
30	9.2±0.0	5.8	0
40	9.4±0.0	6.1	0.0

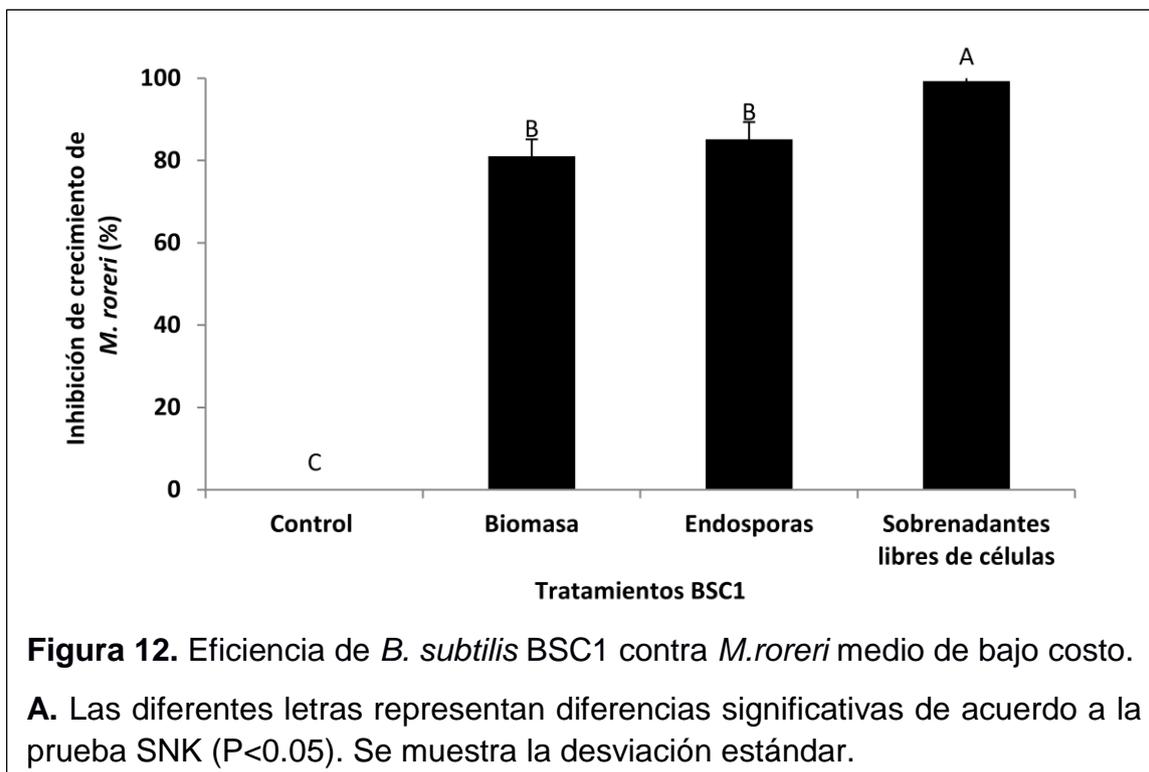
Nota: (Harina de soja desengrasada 44% (40 gl^{-1}); melaza (2 gl^{-1}) y minerales) determinados en tiempo en horas, Log UFC, pH y pO₂ (Oxígeno disuelto en el medio) los resultados corresponden al análisis de regresión lineal.



3.4. Efectividad de *Bacillus subtilis* Contra *M. roreri* crecido en medio de bajo costo

Los ensayos realizados para determinar la efectividad de células y sobrenadantes libres de *Bacillus subtilis* BSC1 se produjeron en medio optimizado HS140-MOL2, dieron resultados contra la podredumbre causada en el fruto de cacao producido por *M. roreri*. La enfermedad se inhibió en un 95% y 87%.

Los indicadores demostraron que la cepa de *Bacillus subtilis* BSC1 que fue generada en medio de cultivo de bajo costo, se mantuvo y colonizo a los frutos contagiados con la enfermedad de la Moniliasis del cacao, al igual que las cepas crecidas en los controles TSB y MOLP los resultados que se obtuvieron demuestran la eficiencia en el control de la enfermedad causada por *M. royeri*.



3.5. Costos de Producción

Para determinar los costos de producción se evaluó con varios medios de cultivo que han sido probados en cultivos de *Bacillus subtilis* (Yáñez-Mendizábal et al., 2011). Los costos de medios de laboratorio son altos para producción en bioreactor y para llevar a escala industrial, por lo cual se determinó el uso de medios de bajo costo como la harina de soja y melaza que se puede adquirir de forma unitaria o al por mayor reduciendo aún más los costos para realizar el experimento, de esta manera se puede elegir cuál es la materia prima adecuada para alcanzar una concentración óptima de crecimiento. Los precios pueden variar dependiendo de la casa comercial la

disponibilidad del medio esto dependerá de la exportación de la soja, La molienda para obtener harina es produce en el país, para lo cual se debe verificar el proveedor correcto con lo cual se identificara que las propiedades nutricionales no afecten a la producción, debido que es una leguminosa que aporta nitrógeno y la melaza que aporta carbono.

Tabla 11. Costos de producción.

Medio	Costo dólares l-1	Concentración ml-1
Harina de soja comercial tostada (40gl ⁻¹); melaza (2gl ⁻¹) y minerales	1.5	1.78x10 ⁹
Harina de soja comercial tostada(40gl ⁻¹); melaza (4gl ⁻¹) y minerales	1.5	1.81x10 ⁹
Harina de soja comercial tostada(40gl ⁻¹); melaza (6gl ⁻¹) y minerales	1.5	1.64x10 ⁹
MOLP; peptona 30g ⁻¹ Sacarosa (20gl ⁻¹), extracto de levadura (7gl ⁻¹) y minerales	40	2.38x10 ⁹
TSBTriptona (17.0 gl ⁻¹) Fitona(peptona de soja) (3.0gl ⁻¹) Cloruro de sodio 5.0 gl ⁻¹ D(+) glucosa(2.5gl ⁻¹)Fosfato dipotásico(2.5gl ⁻¹)	57	1.44x10 ⁹

4 CAPITULO IV. CONCLUSIONES

4.1. Estudio de caracterización del crecimiento y modelización de *Bacillus subtilis* BSC1 y sus metabolitos

- *Bacillus subtilis* BSC1 durante el proceso de crecimiento en medio convencional de laboratorio TSB presentó una curva sigmoidea, donde se identifica una fase de latencia, seguida de una fase de crecimiento exponencial y estacionaria.
- *Bacillus subtilis* BSC1 crecido en medios TSB y MOLP produce células vegetativas, endosporas resistentes al calor y compuestos que tienen una alta actividad antagónica *in vitro* contra *M. royeri*.

4.2. Estudio de optimización de medio de cultivo de bajo costo y parámetros físicos de crecimiento para producción de biomasa y metabolitos

- Mediante un estudio usando diferentes productos comerciales y subproductos económicos provenientes de las industrias agrícolas y alimentarias como fuentes de nitrógeno y carbono se desarrolló un medio de cultivo de bajo costo compuesto por harina de soja tostada a 40 g l^{-1} en combinación con melaza 2 g l^{-1} y suplementado con minerales (HS140-MOL2) que proporcionó una producción alta de *Bacillus subtilis* BSC1 alrededor $2.4 \times 10^9 \text{ UFC ml}^{-1}$ a las 24 horas, $1.4 \times 10^9 \text{ UFC ml}^{-1}$ a las 48 horas y $1.7 \times 10^9 \text{ UFC ml}^{-1}$ a las 72 horas, respectivamente.
- La temperatura y agitación durante la fase de optimización de medios de bajo costo fueron óptimos para obtener producciones altas de la bacteria.
- El medio de bajo costo HS140-MOL2 aportó igual producción de *B. subtilis* BSC1 que medios de cultivo de laboratorio control como MOLP.

Se concluyó que dos productos agroalimentarios baratos (harina de soja desengrasada tostada y melaza) pueden ser usados para diseñar un medio de

bajo costo que permite obtener concentraciones altas de *Bacillus subtilis* BSC1 y proporcionar una base fiable para realizar el escalado de producción a nivel de bioreactor de laboratorio.

4.3. Estudio de escalado de producción en bioreactor

- Se determinó que al aumentar la producción a pequeña escala en el laboratorio en un bioreactor de 5 L de capacidad y usando el medio de bajo costo HS140-MOL2, se obtuvieron concentraciones altas de la *B. subtilis* BSC1 ($>2 \times 10^9$ UFC ml⁻¹) después de 20 h de crecimiento y que se mantuvieron estables hasta el final del proceso luego de 40 horas.
- El análisis de efectividad de la bacteria y sus metabolitos producidos en el medio optimizado de bajo costo HS140-MOL2 mediante pruebas de antagonismo *in vitro* demostró que la mantuvo su potencial para controlar a *M. royeri*.

Se concluyó que el escalado de producción en el medio optimizado de bajo costo HS140-MOL2 (harina de soja desengrasada tostada y melaza) puede ser usado para realizar el escalado de producción a nivel industrial.

5. CAPITULO V. RECOMENDACIONES

- Se recomienda profundizar en el estudio de optimización de los medios de cultivo, evaluar parámetros físicos; temperatura, revoluciones por minuto y químicos como pH y cantidad de oxígeno disuelto en el medio.
- Evaluar nuevas cepas de *Bacillus subtilis* endémicas de cada zona de cultivo de cacao con el fin de tener una formulación con mayor eficiencia en el control.
- Caracterizar nuevas cepas de *B. subtilis* con metabolitos con mayor potencial en el control biológico, para esto se debe aislar la bacteria dependiendo la zona y el nivel de incidencia de la enfermedad.
- Continuar con la investigación realizando ensayos en campo para determinar la eficacia del formulado.
- Llevar a cabo más ensayos industriales con el fin de realizar escalados de producción a mayor volumen

REFERENCIAS

- ANECACAO, ECUADOR. (2012). Boletín Mensual Estadísticas de Exportaciones Recuperado el 12 de julio del 2015, de <http://www.anecacao.com/es/estadisticas/>
- Arévalo, E., Zúñiga, L., Arévalo, C., & Adriazola del Aguila, J. (2004). *CACAO: MANEJO INTEGRADO DEL CULTIVO Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA EN LA AMAZONIA PERUANA*. Chiclayo, Perú: Instituto de Cultivos Tropicales.
- Baranyi, J., & Roberts, T. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. Institute of Food Research Laboratory, UK.
- Bejarano, G. (1961). *Métodos de inoculación artificial y factores favorables para la Infección de Monilla roreri Cif. & Par.* Quito, Ecuador: Tesis Ing. Agr., Universidad Central del Ecuador.
- Chollet-Imbert, M., Gancel, F., Slomianny, C., & Jacques, P. (2009). Differentiated pellicle organization and lipopeptide production in standing culture of *Bacillus subtilis* strains.
- Costa, N., Meurer, E., Bissani, C., & Tedesco, M. (2007). Fraccionamento sequencial de cádmio e chumbo em solos. *Ciência Rural Santa Maria*.
- Durango, W. (2001). Evaluación de fungicidas y biocontroladores en el manejo de enfermedades de la mazorca de cacao. . *Tesis Ing. Agr.* Guayaquil, Guayas, Ecuador: Universidad de Guayaquil.
- Enríquez, G. (2004). *Cacao orgánico, guía para productores ecuatorianos*. Quito, Pichincha, Ecuador: Cámara Ecuatoriana del Libro - Núcleo de Pichincha. Recuperado el 14 de Julio del 2015 de <http://myslide.es/documents/cacao-ecuador1.html>
- Evans, H. (1981). Pod rot of cacao caused by *Moniliophthora* (Monilia) roreri. *Phytophatology*.
- Evans, H., Holmes, K., & Reid, A. (2003). Phylogeny of the frosty pod rot pathogen of cocoa.
- Falconí, C. (2003). *Estrategias biológicas para el control de la moniliasis del cacao*. . (P. A. GTZ, Ed.) Quevedo, Ecuador: INIAP.

- Falconí, C., & Yáñez, V. d. (2007). *Validación de biopesticidas para el control de la moniliasis y manejo sustentable del cacao fino y de aroma en el Ecuador*. (S. N. Tecnología., Ed.) Sangolquí, Ecuador: ESPE.
- Falconí, C., Visser, R., & van Heusden, A. (2013). Phenotypic, molecular, and pathological characterization of *Colletotrichum acutatum* associated with Andean lupine and tamarillo in the Ecuadorian Andes. Recuperado el 12 de julio del 2015, de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdfplus/10.1094/PDIS-02-12-0175-RE>
- Fravel, D.R. (2005) Commercialization and implementation of biocontrol *Annu Rev Phytopathol*. Recuperado el 13 de julio del 2015 de <http://naldc.nal.usda.gov/download/26252/PDF>
- Griffiths, G., & Harwood, J. (1991). The regulation of triacylglycerol biosynthesis in cocoa (*Theobroma cacao*) L. . *Planta Springer - Verlag*, Hebar, P. K. Recuperado el 15 de julio del 2015 de <http://apsjournals.apsnet.org/doi/abs/10.1094/PHYTO>
- Hernández, A., Ruíz, Y., Acebo, Y., Miguélez, Y., & Heydrich, M. (2014). Microbial antagonists to manage black pod rot in *Theobroma cacao* L. Their present status and perspective use in Cuba. *Revista de Protección Vegetal*. Recuperado el 17 de julio del 2015 de <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v29n1/rpv02114.pdf>
- Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., & Thonart, P. (1999). Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. Recuperado el 12 de julio del 2015 de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2267117/>
- .
- Jiménez, J., Galindo, J., & Enríquez, G. (1987). Evaluación del combate biológico y químico de la Moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao en Costa Rica. 10a Conferencia internacional de investigación en cacao, Actas. Santo Domingo, DO.

- Kraussy, U., & Soberanis, W. (2001). Biocontrol of cocoa pod diseases with mycoparasite mixtures. *Biological Control*. Recuperado el 16 de julio del 2015 de http://www.researchgate.net/publication/248592670_Biocontrol_of_Cocoa_Pod_Diseases_with_Mycoparasite_Mixtures
- Matsumoto, M. Oshima, T., Osaka, Y., Sasaki, H., Osawa, K., Yasuda, H., (2000). Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in in-vitro and animal experiments.
- Melnick, R., Suárez, C., Bailey, B., & Backman, P. (2011). Isolation of endophytic endospore-forming bacteria from *Theobroma cacao* as potential biological control agents of cacao diseases. *ELSEIVER - Biological Control*.
- Ongena, M., Jacques, Philippe, Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., & Thonart, P. (2005). Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*. Springer - Verlag.
- Peralvo, D., & Saavedra, L. (2005). Validación de biopreparados en base a bacterias epífitas para el control de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) en el cultivo de cacao fino de aroma. *Tesis Ing. Agr.* Santo Domingo de los Colorados, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería Agropecuaria IASA. Recuperado el 16 de julio del 2015 de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/5599/1/T-ESPE-IASA%20II-002461-A.pdf>.
- Porras, V. H., & Sánchez, J. (1991). *Enfermedades del Cacao* (Vol. 5). Lima, Perú: IICA Procacao.
- Quiroz, J. (1997). *Recolección de genotipos y establecimientos de un banco de germoplasma de cacao nacional en el Ecuador* (Vol. 75). Quevedo, Ecuador: INIAP. Recuperado el 20 de julio del 2015 de [http://www.researchgate.net/publication/277110201_Validacin_de_biopesticidas_en_base_a_bacterias_epifitas_para_el_control_de_lamoniliasis_\(Mniliophthora_Roreri_Cif_y_Par_Evans_ET.A\)_en_el_cultivo_de_cacao_hbrido_CCM_51_en_Santo_Domingo](http://www.researchgate.net/publication/277110201_Validacin_de_biopesticidas_en_base_a_bacterias_epifitas_para_el_control_de_lamoniliasis_(Mniliophthora_Roreri_Cif_y_Par_Evans_ET.A)_en_el_cultivo_de_cacao_hbrido_CCM_51_en_Santo_Domingo)

- Robles, B. (2008). Validación de biopesticidas en base a bacterias epifitas para el control de la moniliasis (*Mniliophthora Roreri* Cif y Par Evans ET.A) en el cultivo de cacao híbrido CCM 51 en Santo Domingo. *Tesis Ing. Agr.* Santo Domingo de los Colorados, Ecuador: Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería Agropecuaria - IASA. Recuperado el 18 de julio del 2015 de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2500/1/T-ESPE-IASA%20II-002061.pdf>
- SINAGAP. (2013). *Sistema de Información Nacional de Agricultura, Ganadería, Acuicultura y Pesca*. Recuperado el 10 de Julio de 2015, de <http://sinagap.agricultura.gob.ec/boletin-cacao/boletin-acao#/1/zoomed>
- Suárez, C. (1993). Enfermedades del Cacao y su Control. En M. Moreira, C. Suárez, J. Vera, & E. E. Pichilingue (Ed.), *Manual del Cultivo de Cacao* Quito, Ecuador.
- Vera, J. (1993). *Manual del Cultivo del Cacao* (Vol. 25). Quevedo, Ecuador: Suarez. Recuperado el 16 de Julio de 2015 de http://www.academia.edu/16270871/Moniliophthora_roreri_Cif_y_Par_Evans_et_al._en_el_cultivo_de_cacao_Moniliophthora_roreri_Cif_y_Par_Evans_et_al._in_the_crop_of_cocoa
- Wilson, C., & Wisniewski, M. (1989). Biological control of Postharvest Diseases of Fruits and Vegetables: An Emerging Technology.
- Yáñez, V. d. (2003). Producción y formulación de biopreparados a base de *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus subtilis* y *Trichoderma* sp. para el control biológico de la Moniliasis del cacao. Sangolquí, Pichincha, Ecuador:
- Yáñez, M. V del R. (2004). Control biológico de *Moniliophthora roreri* en el campo mediante el uso de biopreparados a base de *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus subtilis* en cacao Sangolquí, Pichincha, Ecuador.
- Yáñez-Mendizábal, V. (2007). Control biológico y tecnología de biopesticidas microbianos. En: C. Falconí, y V. Yáñez, editores, Validación de

biopesticidas para el control de la moniliasis y manejo sostenible de cacao fino de aroma en el Ecuador. Quito, Ecuador.

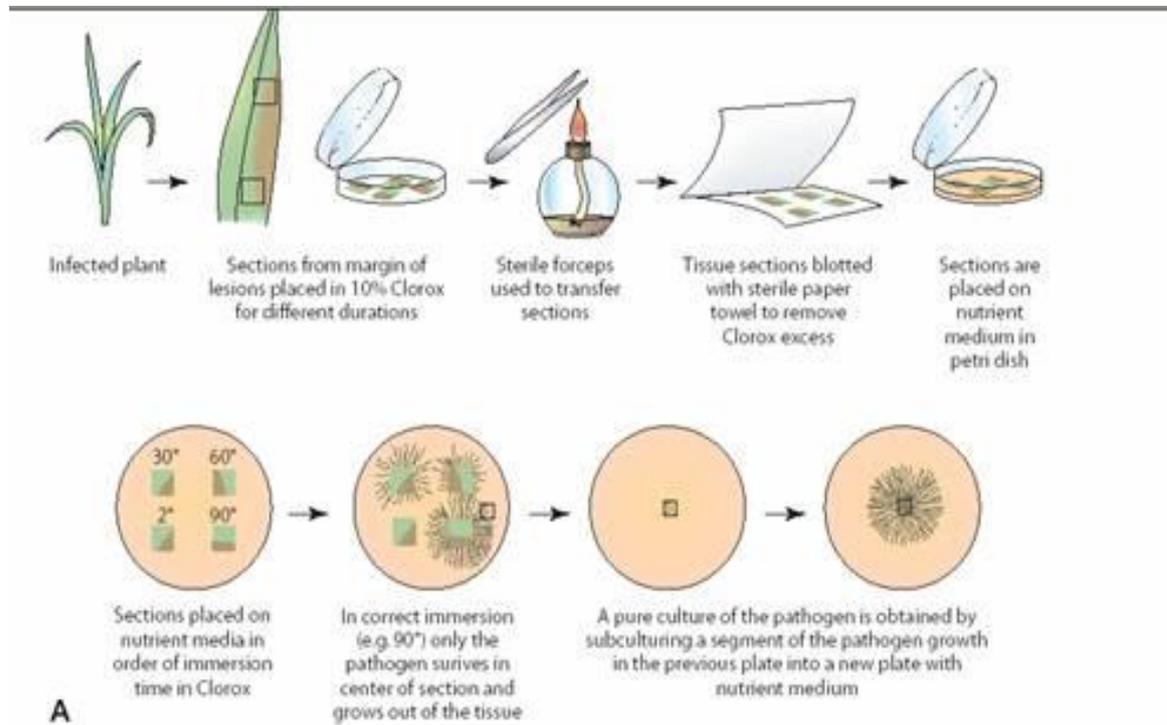
Yáñez, Mendizábal V. d. (2012). Potencial de la cepa CPA - 8 de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de frutas . *Tesis Doctoral*. Lérida, España.

Yáñez VR, Oleas AR, Falconí CE. (2003). Identificación de bacterias epífitas de mazorcas de cacao eficientes para el control de *Moniliophthora roreri*. In: Reporte Técnico-Científico del Proyecto “Estrategias biológicas para el control de la Moniliasis del cacao”. Convenio ESPE – PROMSA, MAG, ORECAO. Sangolquí, Ecuador.

Yáñez VR, Falconí CE, Oleas AR. (2006). Efecto de los biopesticidas para el control de la moniliasis en cacao fino y aroma en la Hda. Limón, Provincia de Los Ríos, Ecuador.

ANEXOS

Anexo 1. Metodología de Agrios (2005) para aislar patógeno



Tomado de Agrios (2005).

Anexo 2. Criobolas de microorganismos a -80 °C



Esteban Gallardo (2015).

> HOW TO USE



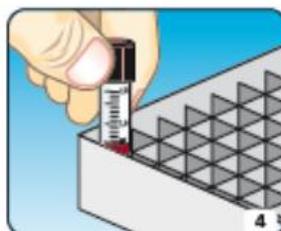
Using a permanent marker, label the code for the organism onto the white panel on the vial. Aseptically inoculate the CRYOBANK™ tube colonies from a fresh, pure culture to a density equivalent to MacFarland 3 or 4 standard.



Replace cap and mix carefully by inverting the tube to completely distribute the organism.



Remove as much of the cryopreservative fluid as possible with a sterile pipette and re-close the tube.

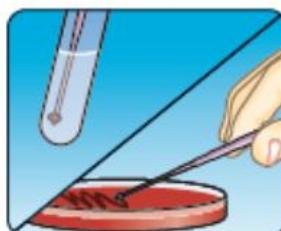


Store the inoculated CRYOBANK™ tube in a suitable freezer between -60°C and -80°C . Details of the tube contents may also be recorded on the grid printed on the lid of the storage box. Space is also available for recording the individual box identification if required.

> RECOVERY



Remove the CRYOBANK™ tube from the freezer. If several tubes are being removed at once, thawing should be prevented by use of a cryoblock. Open the vial and remove bead by inserting a sterile needle through the hole or by using sterile forceps.



The bead may be dropped into an appropriate liquid medium. Alternatively, streak the bead immediately over the surface of an appropriate medium and incubate under suitable conditions. Discard the bead safely in the manner for infected material. Close vial and return it to the freezer as soon as possible.

> ORDERING INFORMATION

CATALOG NO.	DESCRIPTION	PACKAGING
CRYQ/R	Red Beads	64 vials
CRYQ/G	Green Beads	64 vials
CRYQ/Y	Yellow Beads	64 vials
CRYQ/B Blue	Beads	64 vials
CRYQ/M	Color assortment	64 vials
CRYQ/Z	Cryoblock - 18 well	1 block

Copan Diagnostics Inc.
26055 Jefferson Ave.
Murrieta, California 92562 USA
Toll Free: (800)216-4016 (US & Canada)
Phone: (951) 696-6957 Fax: (951)600-1832
E-Mail: info@copanusa.com
www.copanusa.com

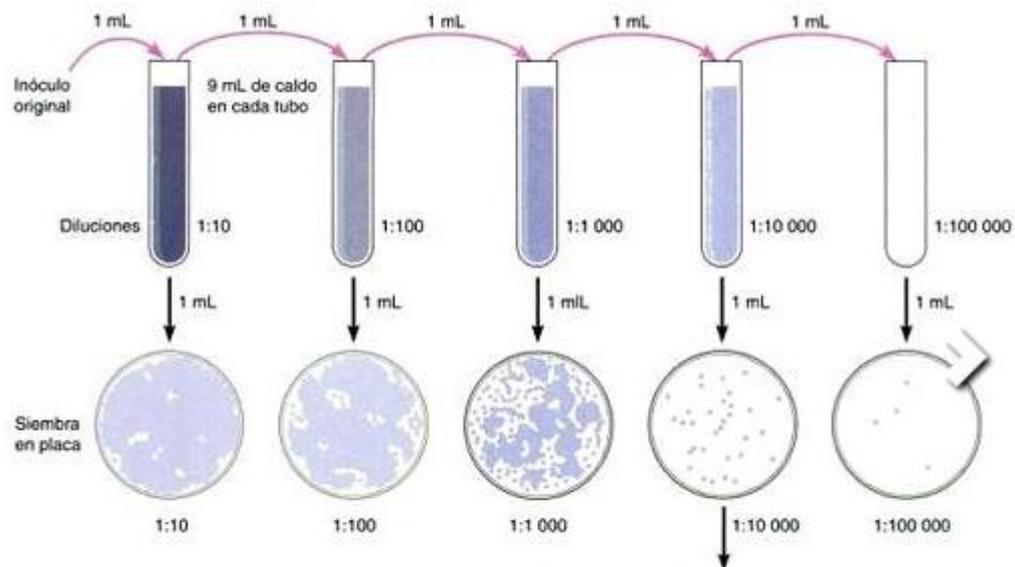
Tomado deCopan Diagnostic Cryo

Anexo 3. Cultivos Inclínados de Patógenos



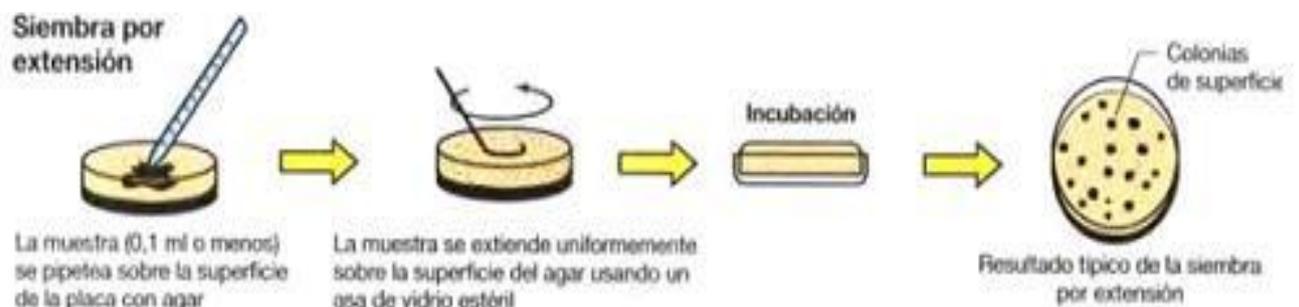
Esteban Gallardo (2015).

Anexo 4. Método de dilución y plateo para cuantificación de bacterias (UFC ml⁻¹)



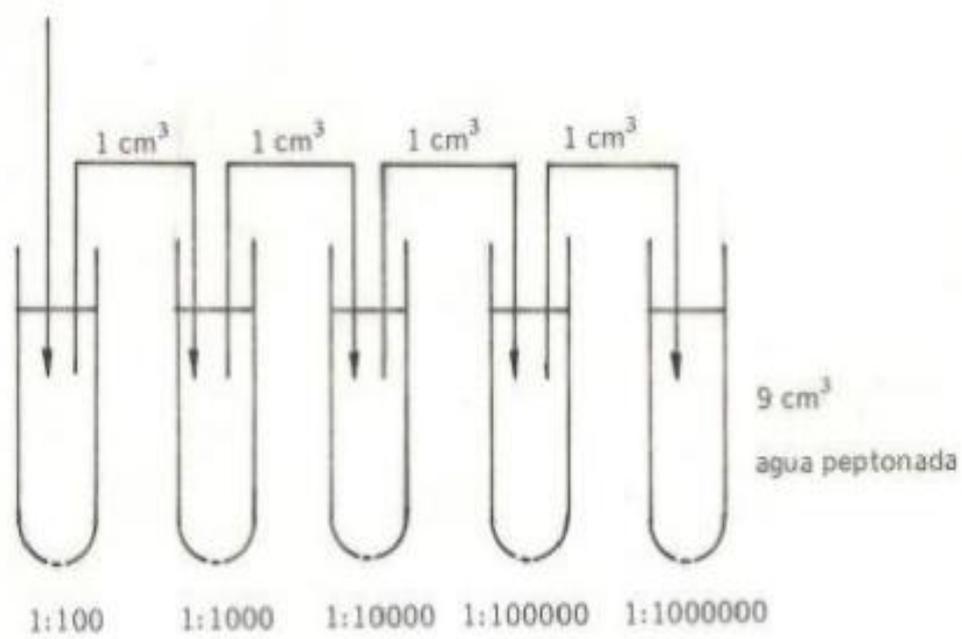
Cálculo: número de colonias en la placa x inversa de la dilución de la muestra = número de bacterias/mL.
 (Por ejemplo, si se observan 32 colonias en la placa correspondiente a la dilución 1/10 000, el recuento es $32 \times 10\ 000 = 320\ 000$ bacterias/mL de muestra.)

Tomado de(Tortora et al. 2007)



Tomado de(Madigan et al. 2003).

2. Dilución



Tomado de NTE INEN 0766 Dilución y plateo

Anexo5. Ecuación de Baranyi y Robert (1999)

The constraints for the inhibition function, $u(x)$, are the same as under (1a). The factor $\alpha(t)$ is called adjustment function. It is monotone increasing for $t \geq 0$ describing the adjustment of the culture to the new environment. The ‘damping’ role of $\alpha(t)$ is similar to that of $u(x)$ (the values of both factors are from the $[0, 1]$ interval), but $\alpha(t)$ will affect the course of growth before the exponential phase.

The so-called initial value problem (3a), (3b) has been analyzed by Baranyi et al. (1993b). Richards’ form of $u(x)$ (see (1c)) was suggested in Baranyi et al. (1993a). With that form of the inhibition function and under the constraint that the actual environment, E_2 , and therefore μ_{\max} , is constant, an explicit solution of (3a), (3b) was given in the latter paper. It is worth recalling this solution, not only because of the unfortunate misprints in the original paper, but also because of its flexibility in the fitting procedure, which will be analyzed later in Section 3.2: Numerical properties.

As already stated, the slope of the curve $\ln x(t)$ will be the specific (*per* cell) growth rate. If E_2 is constant then the logarithm of the solution of the above differential equation, $y(t) = \ln x(t)$, can be expressed as

$$y(t) = y_{\max} - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m(y_{\max} - y_0)} - 1}{e^{m \mu_{\max} A(t)}} \right) \quad (4a)$$

or, after rearrangement:

$$y(t) = y_0 + \mu_{\max} A(t) - \frac{1}{m} \ln \left(1 + \frac{e^{m \mu_{\max} A(t)} - 1}{e^{m(y_{\max} - y_0)}} \right) \quad (4b)$$

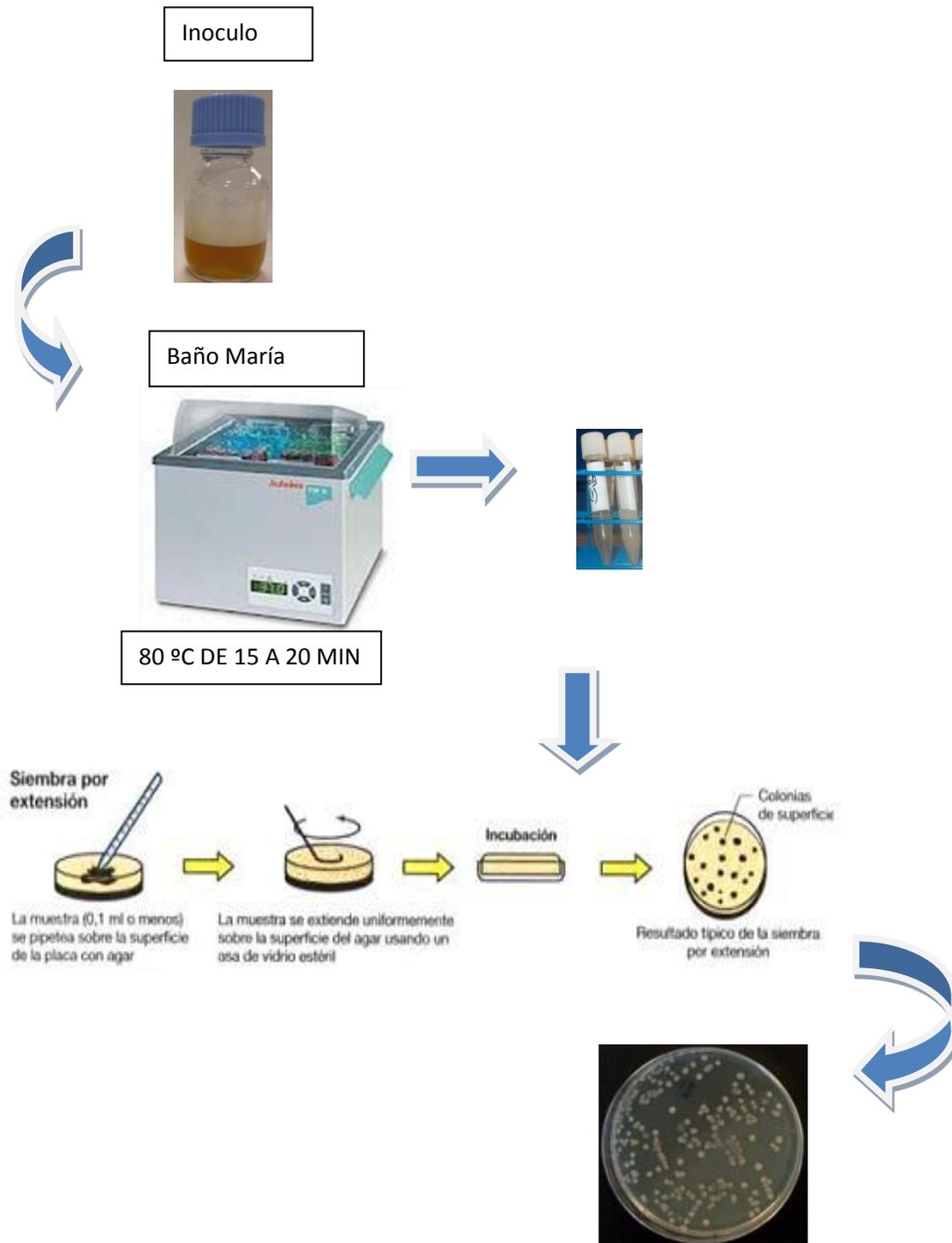
where

$$A(t) = \int_0^t \alpha(s) ds \quad (4c)$$

(s is an integral variable running from 0 to t).

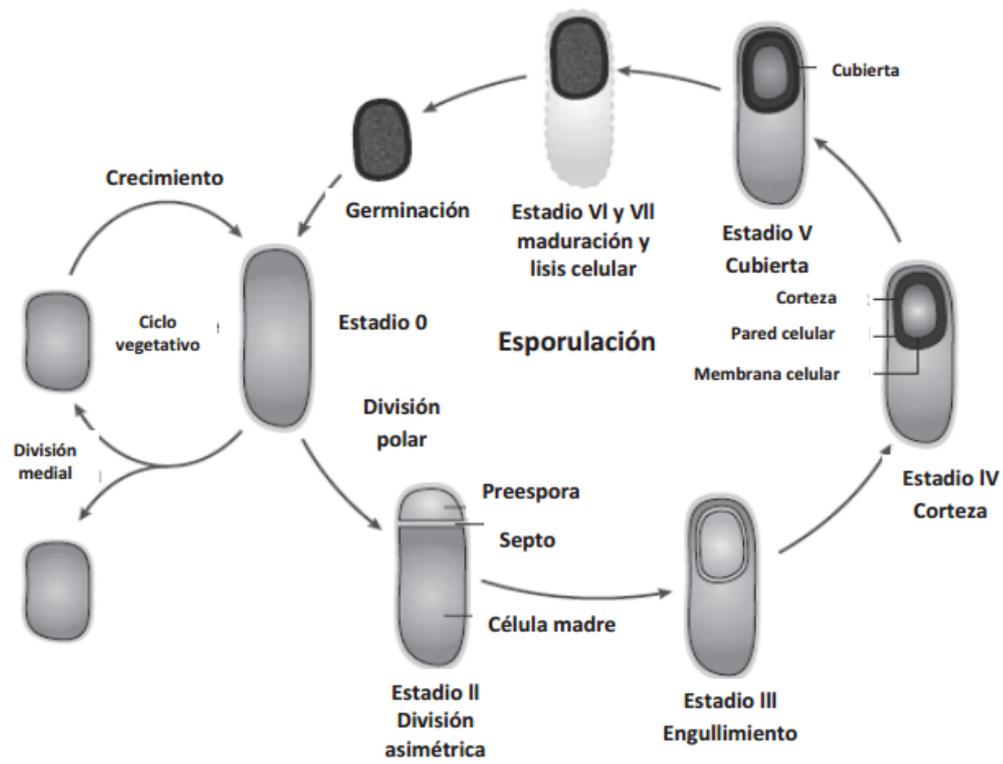
Tomado de Baranyi y Robert (1999)

Anexo 6. Metodología para obtener endosporas laboratorio CIEDI



Esteban Gallardo (2015).

Ciclo de esporulación de *B. subtilis* BSC1



Tomado de Ongena y Jacques (2008)

Anexo 7. Manual de calibración de sondas de bioreactor

3 PROCESS PARAMETERS

The Process Parameter buttons are always shown at the bottom of each screen.



The table shows the parameters that are presented in a list when the Parameter button of a specific control loop is pressed.

CONTROLLER	Level	pH	Temperature	DO	Stirrer*)
Start / stop controller	X	X	X	X	X
Alarm limits		X	X	X	X
Show controller output		X	X	X	X
Calibrate sensor		X	X	X	
Manual control	X	X	X	X	
Dose monitor	X	X		X	
Controller setup		X	X	X	
Set-point		X	X	X	X
Level controller setup	X				
Display actuator activation	X				
Cascade speed limits					X**)

- *) In combination with the AppliFlex and Hyclone Bioreactors, Stirrer Control is disabled.
In combination with the AD/DA module, an (extra) external stirrer controller can be configured (including adjusted lower and upper limits for the stirrer in cascade).
- ***) Only available when the stirrer is included in the DO cascade.

When for a control loop no actuator is configured, only the sensor options (calibration, alarm limits) are available in the parameter menu.

PROCESS PARAMETERS

SOFTWARE REFERENCE MANUAL
w-Control for Autoclavable and Single Use Applications
Software version 1.8X, Document version 1.0

3.3 ALARM LIMITS

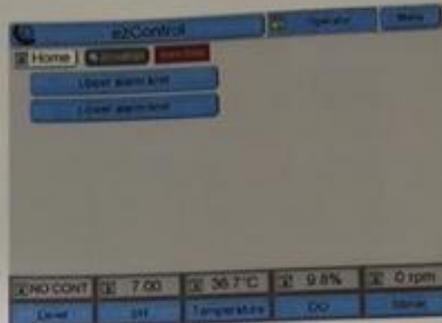
This setting is available for the process parameters:

- pH
- Temperature
- DO
- Stirrer speed

For editing the alarm limits of a process parameter, at least Operator authorisation is required.

Press the button **Upper alarm limit** or **Lower alarm limit** button in order to edit the corresponding value, using the numeric keypad.

The new upper alarm limit must have a value between the Set-point and the upper range value
The new lower alarm limit must have a value between the lower range value and the Set-point.



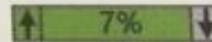
i If you set an alarm limit outside the current view range, the range is automatically enlarged. For example, if the low range value =3 and you set the lower alarm limit to 2, the low range value will automatically be lowered into 1.

3.4 SHOW CONTROLLER OUTPUT

This option can be enabled or disabled for each control loop:

- pH
- Temperature
- DO
- Stirrer speed

In case the option is enabled, the actual controller output is presented at the top of the bar graph (in the Bar Graph screen). The arrow with the green background represents the active actuator.



3.5 CALIBRATE SENSOR

A sensor can only be calibrated when the corresponding controller is switched off. This option is available for the sensors:

- pH
- Temperature
- DO
- Additional Sensor and I/O Hardware (refer to the related manual)

In case of a Foam sensor, the sensitivity can be selected (**High sensitivity** or **Low sensitivity**); see Section 3.10. A Level sensor has no sensitivity selection!

3.5.1 pH CALIBRATION

In the pH Settings screen, press the button **Calibrate pH** to start the Calibration menu.

Numerical data

Slope: This value may be edited by pressing it.
Offset: This value may be edited by pressing it.

Control buttons

Sample correction

Correct an on-line pH value with data from off-line pH measurements in samples. Only the current offset is corrected by entering the off-line measured value.



Off-line measurement of the acidity of a sample of the culture must be carried out under strict conditions:

- pH measurement in the sample must be carried out directly after sampling: any CO_2 or NH_3 that is stripped-off the sample will change the current pH value of the sample.
- off-line pH measurement must be carried out at process temperature: changes in temperature of the sample introduce measuring errors (by causing a shift in the equilibrium between H_2O^+ and its salt form).

Show raw / standard

toggle-button (Show raw / standard values):

Calibration data will be presented as raw or standard values.

1 point calibration

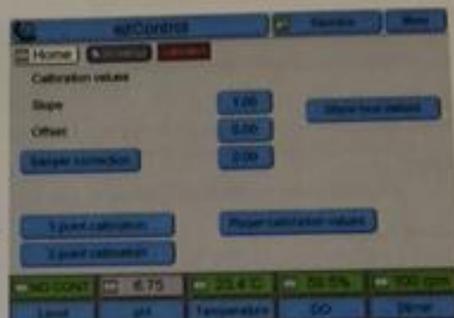
Calibration of offset only.

2 point calibration

Calibration of slope and offset; standard procedure for the pH sensor.

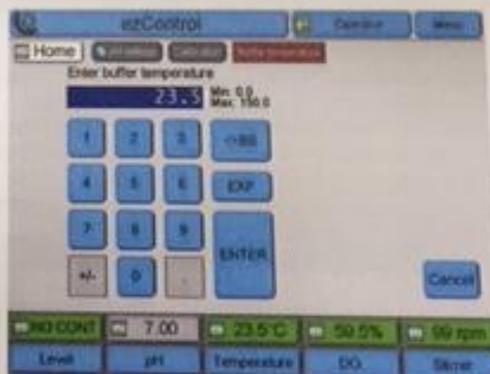
Reset calibration values

Reset to slope = 1.00 and offset = 0.00 (standard values).



Calibration procedure

1. Press the **2-point calibration** button.
 2. Specify the temperature of the buffer solutions via the numeric keypad (the temperature value that is displayed on the Process Value button is measured by the Pt-100 sensor in the bioreactor, not in the buffer solution).
 3. The numeric keypad prompts for the pH value of the first buffer solution. Wait until the shown process value stabilizes. Enter the corresponding pH value (i.e. the first calibration point).
 4. Repeat step 3 for the pH value of the second buffer solution. Again, wait for the shown process value to stabilize and enter the corresponding pH value (i.e. the second calibration point).
 5. The calculated calibration data (slope and offset) are presented in the Calibration screen.
- In case a 1-point calibration is selected, the calibration routine is finished after the first buffer value is entered.



PROCESS PARAMETERS

SOFTWARE REFERENCE MANUAL
ez-Control for Autoclavable and Single Use Applications
Software version 1.0X, Document version 1.0

3.5.2 TEMPERATURE CALIBRATION

In the Temperature Settings screen, press the button **Calibrate temperature** to start the Temperature Calibration screen.

Numerical data**Slope**

This value may be edited by pressing it.

Offset

This value may be edited by pressing it.

Control buttons**1-point calibration**

Basically, the Temperature calibration routine consists of a 1-point calibration or a 2-point calibration.

Since temperature measurements are carried out with a Pt-100 sensor (standardized relationship between temperature and impedance), for applications with autoclavable or Single Use bioreactors a 1-point calibration will be sufficient.

Reset calibration values

The calibrated offset value can be reset by pressing the **Reset calibration values** button.



Since the Pt-100 sensor does not show any decrease in sensitivity during its lifetime, it needs only be calibrated once!

Calibration procedure

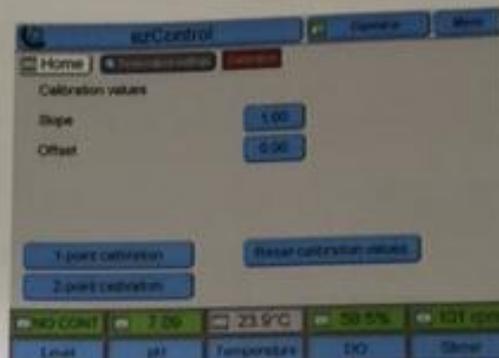
1. Insert the Pt-100 sensor in a solution with a known temperature (e.g. ice-water).
2. Wait until the temperature (as shown on the temperature Process Value button) is stable.
3. Press the button **1-point calibration**.
4. In the numeric keypad, enter the known temperature value in °C (e.g. 0.00 for the ice-water).
5. The offset value of the sensor is now calibrated and presented in the Temperature Calibration screen.

2-point calibration

In case a 2-point calibration is required however, it can be achieved with help of two different solutions with a known temperature (e.g. ice-water and boiling water).

Immerse the Pt-100 sensor in the first liquid and enter the corresponding temperature value in °C. After having processed this first calibration point, the ez-Control will request you to condition the Pt-100 sensor in a liquid with a second temperature and to enter the corresponding value in °C.

The calibration data (slope and offset) are now calculated by connection the two calibration points through a straight line.



3.5.3 DO CALIBRATION

i The DO-calibration is performed after autoclaving the reactor and before inoculation. During the DO-calibration, the bioreactor should be filled with medium. Before calibration is performed, the DO sensor must be polarized for > six hours. During this interval, the medium can be saturated with air or oxygen.

Per default the DO calibration procedure is a 1-point calibration on air / oxygen saturation. The 0-value (all air or oxygen is driven out of the liquid) can be used to check the performance of the DO sensor. See the manual of the respective DO sensor.

For special applications (anaerobic cultivations with set-points near 0% DO), the System Engineer can enable a 2-point calibration.

In the DO Settings screen, press the Calibrate DO button to start the DO Calibration.
 Standard 1-point calibration procedure:

Numerical data

Slope This value may be edited by pressing it.

Offset This value may be edited by pressing it.

Control buttons

Show raw / standard values

The **Show raw values** button toggles the presentation of values on the Slope and Offset buttons between raw values and standard values. Raw values are presented in nA.

Set measurement range

Press the **Set measurement range** button for Measurement range selection; two ranges are available:

- Range for saturation with oxygen
- Range for saturation with air

The active range is presented as a brown button. Press this button to maintain the current measurement range or press the blue button to select the other measurement range. Now control returns to the DO calibration screen.

Temperature compensation

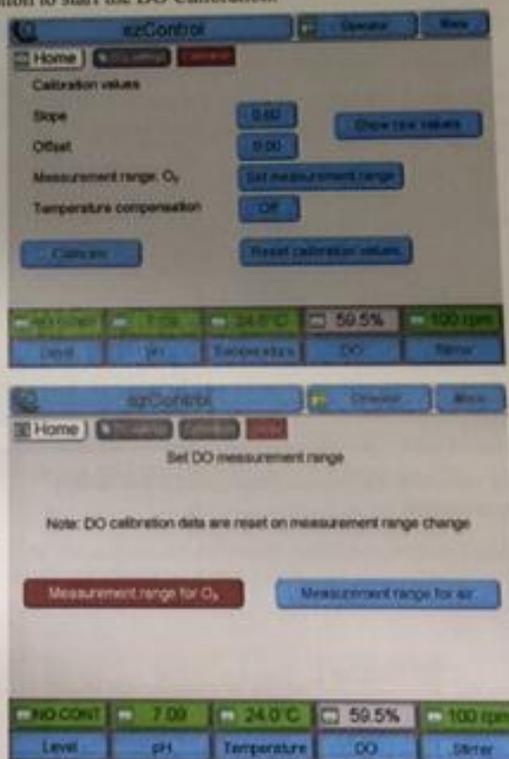
This button toggles between On and Off.

Since DO calibration is usually performed at process Temperature; this compensation is normally switched off.

Reset calibration values

The **Reset calibration values** button will reset the calibration data to default values:

- Slope: 1.00 (standard) = 680.00 nA (raw)
- Offset: 0.00 (standard) = 0.00 nA (raw)



3 ACTUATORS

The Actuator control part of the ez-Control supports the following actuators:

- pH control: acid / base addition or aeration with carbon dioxide
- DO control: aeration with air, nitrogen or oxygen, stirrer speed control
- Temperature control: Thermo Circulator, Cold Water Valve or Heating Blanket
- Level control: Level / Foam pump

This chapter describes the applicable hardware (inside the ez-Control cabinet and outside the bioreactor).

3.1 GAS SUPPLY SECTION

The gas supply section supports (a combination of) a Gas Selection Block and up to four rotameters and/or four mass flow controllers.

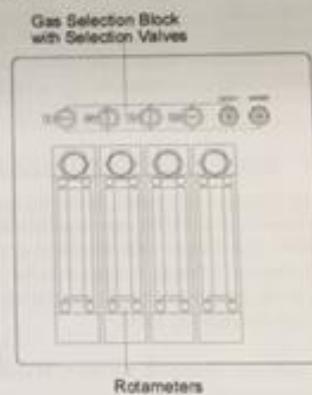
3.1.1 GAS SELECTION BLOCK

The Gas Selection Block module offers easy switching (per gas) by rotating the slot of the gas valve by means of a screwdriver to the position:

- Gas overlay: upward position
- Sparging: downward position

In case no Gas Selection Block is applied, for each individual gas outlet a bulkhead union is mounted in the front. This allows the user to connect external tubing. Spare holes are blinded.

- Z311302020 Gas Selection Block
- Z311302060 Gas Outlet Bulkhead Connector Set

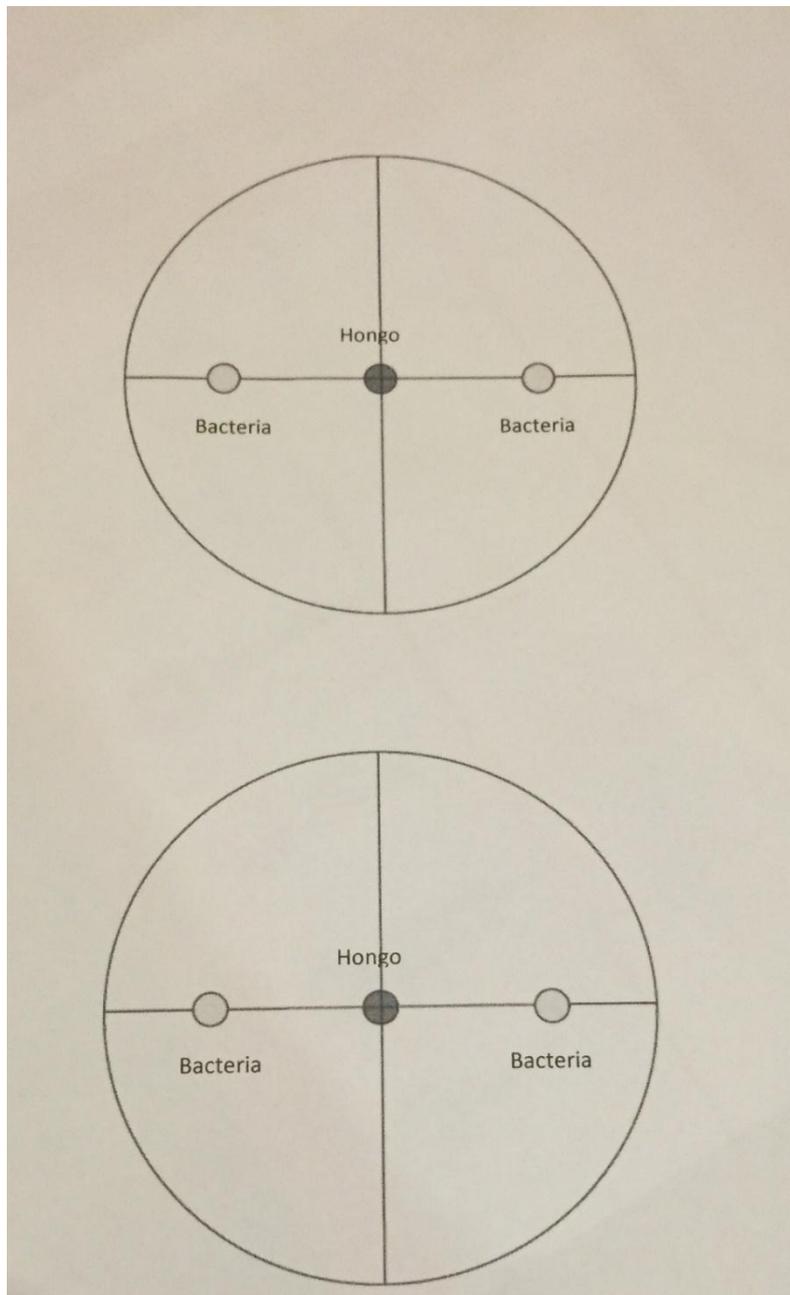


Example

How to connect the gasses output of the ez-Control to an air inlet sparger. All required articles are supplied in the start-up kit.



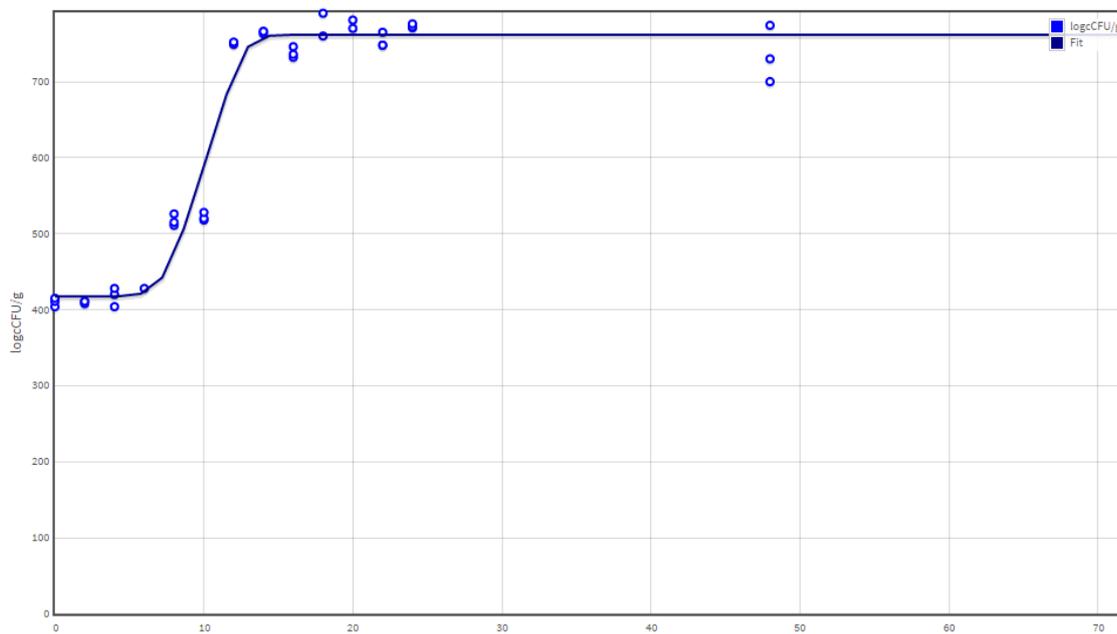
Anexo8.Prueba de Antagonismo



Esteban Gallardo (2015).

Anexo9. Resultados *ComBase*

R-square:	0.96
SE of Fit:	30.943
Initial value	417.294 ± 9.941
Lag/shoulder	7.36 ± 0.456
Maximum Rate	64.791 ± 8.402
Final Value	761.671 ± 6.715



Esteban Gallardo (2015).

Anexo 10. Lista de abreviaturas

ANOVA	Análisis de varianza (inglés)
CIEDI	Centro de Investigación, Estudio y Desarrollo de Ingenierías
ESPE	Universidad de las Fuerzas Armadas
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (inglés)
INIAP	Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias
IRTA	Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (catalán)
JUGO V8	Medio oprimo para crecimiento de hongos compuesto por ocho vegetales; tomate, zanahoria, apio, remolacha, perejil, lechuga, puerro y espinaca.
mM	Mili molar
MOLP	Medio óptimo para la producción de lipopéptidos
NYDA	Agar nutritivo levadura-dextrosa (inglés)
NYDB	Caldo nutritivo levadura-dextrosa (inglés)
PBS	Solución tampón fosfato salino (inglés)
APD	Agar papa dextrosa
Ha	Hectárea
Ref.	Cepa de referencia
Rpm	Revoluciones por minuto
SICA	Servicio de Información y Censo Agropecuario
SNK	Student Newman Keuls
T	Tonelada
TLC	Cromatografía en capa fina (inglés)
TSB	Caldo tripticasa-soya (inglés)
UDLA	Universidad de las Américas
UFC	Unidad formadora de colonia
ml	mililitros