



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE *Bacillus subtilis*  
CTPX S2-1 Y SUS METABOLITOS, PARA EL CONTROL DE ANTRACNOSIS  
EN *Lupinus mutabilis* SWEET.

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos  
establecidos para optar por el título de Ingeniera Agroindustrial y de Alimentos.

Profesora Guía

PhD. Viviana del Rocío Yáñez-Mendizábal.

Autora

Gabriela Rocío Samaniego Viñachi

Año

2016

## **DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA**

"Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con la estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación".

---

Viviana del Rocío Yáñez-Mendizábal.

PhD. en Ciencia y Tecnología Agraria y Alimentaria

C. I. 1710469782

## DECLARACIÓN DEL 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".

---

Gabriela Rocío Samaniego Viñachi

C. I. 1717932410

## AGRADECIMIENTOS

Al SENESCYT y la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, en su programa “Mejora de la cadena productiva del chocho (*Lupinus mutabilis*) en Ecuador”, por el aporte logístico y económico brindado para el desarrollo de este proyecto.

Al Centro de Investigación, Estudios y Desarrollo de Ingenierías (CIEDI) de la Universidad de las Américas y su proyecto “Control Biológico de las enfermedades fungosas del Chocho”.

A CONQUITO y la Asociación de Producción Orgánica Orquídeas ASOPRORQUÍDEAS, por su disponibilidad y el apoyo brindado.

## DEDICATORIA

A Dios por darme la fuerza para continuar con mis actividades día a día.

## RESUMEN

El chocho andino, *Lupinus mutabilis* Sweet, es una leguminosa con gran valor nutricional debido a su alto contenido de proteína. Sin embargo, posee limitaciones durante su cultivo debido al ataque de enfermedades fungosas, especialmente la antracnosis. Esta enfermedad producida por el hongo *Colletotrichum acutatum*, causa pérdidas elevadas a lo largo del cultivo y en poscosecha. Sumado a esto, el uso de agroquímicos sintéticos posee limitaciones de efectividad, además de generar impactos negativos en la salud humana y el ambiente. Actualmente, el mercado local y mundial, tiene una limitada oferta de bioproductos agrícolas, por lo que el desarrollo de programas para su producción y formulación es un factor clave como alternativa en el control de enfermedades.

Estudios preliminares desarrollados con la bacteria *Bacillus subtilis* cepa Ctpx S2-1, aislada de Salcedo, provincia de Cotopaxi, demuestran su potencial para controlar infecciones causadas por *Colletotrichum acutatum*.

El objetivo de este trabajo fue optimizar un medio de cultivo de bajo costo para la producción de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1, efectivo para el control de *Colletotrichum acutatum* en chocho andino. Para ello, se establecieron los parámetros de crecimiento de la bacteria en un medio óptimo para la producción de lipopéptidos (MOLP), seguidamente, se desarrolló un medio de cultivo de bajo costo utilizando subproductos agroindustriales. A continuación, se escaló la producción a nivel de biorreactor. Los resultados demostraron que *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 desarrollada en el medio de bajo costo, tuvo un nivel producción  $\approx 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> similar al obtenido en el medio MOLP. Adicionalmente, se demostró su efectividad *in vitro* e *in vivo*, en la inhibición de *Colletotrichum acutatum*. De esta manera, la investigación brinda una base para el desarrollo de formulaciones y procesos a industriales utilizando un medio de cultivo de bajo costo en la producción de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1, como biocontrolador de *Colletotrichum acutatum* en chocho andino.

## ABSTRACT

Andean lupine *Lupinus mutabilis* Sweet is a legume with high nutritional levels. However, there are limitations in crop production due to fungal diseases, such as anthracnose. Lupine anthracnose, caused by *Colletotrichum acutatum* results in low crop production. At the same time, the use of conventional agricultural chemicals to control this type of diseases has been limited. In consequence, the development of biological products is an attractive way to improve crop production levels. However, there are not supply of these products in local and world market. Therefore, their development is an important factor as an alternative way to control crop diseases.

Previous studies of *Bacillus subtilis* strain S2-1 isolated from Salcedo in the province of Cotopaxi, have shown high levels of inhibition *in vitro* against *Colletotrichum acutatum*.

The objective of this research was to optimize a low-cost culture medium to produce *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 and its metabolites, assuring its effectiveness to control the incidence of *Colletotrichum acutatum* in Andean lupine. To do this, growth parameters were established in an optimum culture medium for lipopeptide production (MOLP). Then, a culture medium was developed using low cost agroindustrial by-products as nutritional sources. Production was developed in a 5 liters bioreactor and results showed that *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 grew in a cheap culture medium, maintained a production of  $10^7$  CFU mL<sup>-1</sup> resembling the production obtained in MOLP. *Bacillus subtilis*' effectiveness was demonstrated *in vitro* and *in vivo* in the inhibition of *Colletotrichum acutatum*. Consequently, the research provides a reliable base for the development of formulations and processes at an industrial level using a low-cost culture medium for the production of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent of *Colletotrichum acutatum* in Andean lupine.

# ÍNDICE

Introducción .....	1
Objetivo General.....	3
Objetivos específicos.....	3
1  CAPÍTULO I: Marco teórico .....	4
1.1  La antracnosis en el cultivo de chocho en Ecuador.....	4
1.1.1  Medidas de control .....	5
1.2  Control biológico microbiano con <i>Bacillus</i> spp.....	7
1.2.1  Características de <i>Bacillus subtilis</i> y sus metabolitos .....	7
1.2.2 <i>Bacillus subtilis</i> para el control de antracnosis .....	8
1.3  Producción de microorganismos para control biológico.....	9
1.3.1  Proceso de producción .....	10
1.3.2  Producción a bajo costo .....	13
1.3.3  Escalados de producción.....	15
2  CAPÍTULO II: Métodos .....	17
2.1  Caracterización del crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> y producción de metabolitos en medio de control .....	17
2.1.1  Mantenimiento de antagonista y patógeno .....	17
2.1.2  Modelización del crecimiento.....	17
2.2  Validación de un medio de bajo costo para la producción de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 .....	18
2.2.1  Producción de células totales y endosporas.....	18
2.2.2  Tinción de células y endosporas bacterianas .....	19
2.2.3  Extracción y caracterización de metabolitos antifúngicos.....	19

2.2.4	Caracterización de lipopéptidos antifúngicos por cromatografía en capa fina (HPTLC) y bioautografía.....	20
2.2.5	Ensayos de efectividad de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 en infecciones latentes e inoculaciones artificiales .....	21
2.2.6	Efectividad de <i>Bacillus subtilis</i> en campo .....	24
2.3	Escalado de producción de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 en biorreactor en el medio de bajo costo.....	25
2.3.1	Calibración del inóculo.....	25
2.3.2	Crecimiento en biorreactor .....	25
3	<b>CAPÍTULO III: Resultados y discusión.....</b>	<b>26</b>
3.1	Características del crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 y producción de metabolitos.....	26
3.1.1	Características del crecimiento en medio MOLP .....	26
3.1.2	Producción de endosporas y células totales.....	28
3.1.3	Pureza de cultivos por tinción de células y endosporas bacterianas.....	30
3.2	Validación de un medio de bajo costo.....	31
3.2.1	Identificación de metabolitos antifúngicos y su efectividad contra <i>Colletotrichum acutatum</i> mediante bioautografía. ....	31
3.2.2	Efectividad para infecciones latentes e inoculaciones artificiales .....	34
3.2.3	Efectividad de <i>Bacillus subtilis</i> en campo .....	41
3.3	Escalado de producción .....	44
3.3.1	Crecimiento en biorreactor .....	44
3.3.2	Costos de producción.....	47

4	CAPÍTULO IV: Conclusiones y Recomendaciones.....	49
4.1	Conclusiones.....	49
4.2	Recomendaciones .....	51
5	Referencias.....	52
6	Anexos .....	60

## Introducción

El cultivo del chocho, es considerado de importancia económica en Ecuador, Perú y Bolivia (Jacobsen y Sherwood, 2002, p. 14.). En Ecuador, la superficie cultivada de chocho asciende a 4200 ha en monocultivo y 1760 ha en asociación con otros cultivos. Esta baja producción tiene rendimientos en cosecha de 3.74 qq ha<sup>-1</sup> de acuerdo a estudios de Suquilanda (2010, p. 135), y se debe principalmente al ataque de plagas y enfermedades, ausencia de semilla de calidad y manejo deficiente del suelo (Moncayo, Barrera, Caicedo, Peralta, y Rivera, 2000, p.7). Dentro de las enfermedades, la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum* spp. (Insuasti, 2001, p. 24), es una de las mayores limitantes en producción tanto en el Ecuador como a nivel mundial, la cual produce pérdidas en rendimiento del grano de hasta el 100% como lo afirman estudios de Murillo y otros (2006, p. 26) y Talhinhos, Baroncelli y Le Floch, (2016, p. 5). Por su parte, en el Ecuador, estudios de Falconí, Visser y van Heusden (2013, p. 819) han identificado a la especie *Colletotrichum acutatum* como la causante de la antracnosis en chocho ecuatoriano.

Actualmente, McDonald (2010, p.15) afirma que la demanda por alimentos orgánicos y con baja o nula residualidad de pesticidas sintéticos ha aumentado significativamente por la tendencia en la población al consumo de productos saludables. Por esto, el control de enfermedades durante la producción agrícola se encamina a minimizar el uso de productos químicos que pueden ser ineficientes y llegan a generar resistencia de los patógenos (Lozano, 2010), provocar toxicidad humana y animal, y repercutir negativamente en el ambiente (Rubio y Fereres, 2005, p. 2). Por lo que deben ser reemplazados con productos biológicos u orgánicos (Krishna y McSpadden, 2006, p. 12-13). En la práctica, el manejo de enfermedades agrícolas, se ha extendido a la necesidad de crear productos biológicos, especialmente de origen microbiano, que sean eficientes, que no provoquen resistencia en los patógenos ni tengan residualidad, adicionalmente, que sean aptos para ser industrializados y aplicados de forma comercial (De Bach, 1964).

Dentro de los productos biológicos comerciales disponibles en el mercado mundial, según Fravel (2005, p. 338), gran parte de éstos son elaborados a base de bacterias del género *Bacillus*. Diversos estudios además han demostrado que diferentes especies de este género, tienen efectividad para controlar enfermedades agrícolas como *Colletotrichum acutatum* en frutas cítricas (Kupper, Gimenes-Fernandes y Goes, 2003, p. 251) y en manzanas (Kim, Lee, y Chae, 2015, p. 1954; Moreira, Nesi y May De Mio, 2004, p. 30) con reducciones de hasta el 80% (Kim, Lee, y Chae, 2015, p. 1954). En el chocho, estudios de conducidos por Yáñez, Falconí, Grijalva, Oliva, y Castañeda (2015, p. 42) demostraron que diferentes aislados nativos de *Bacillus subtilis* provenientes de zonas productoras de chocho y sus metabolitos reducen la antracnosis en un 100% en postcosecha. Estudios adicionales conducidos por Claudio y Falconí (2015, p. 46) han demostrado que varias de estas cepas, tienen capacidad para reducir infecciones causadas por *C. acutatum* en semilleros y en campo.

En base a las evidencias de la efectividad de *Bacillus subtilis* para el control de antracnosis en el chocho andino, el objetivo del presente trabajo fue optimizar la producción de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y sus metabolitos a través de estudio de medios de cultivo de bajo costo y escalado de la producción, con su validación *in vitro* e *in vivo*. Esto se realiza tomando en cuenta la escasa oferta en el país de bioproductos, específicamente a base de *Bacillus subtilis* sumado a las actuales tendencias del mercado de consumo de alimentos.

### **Objetivo General**

Optimizar el proceso de producción de la bacteria *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y sus metabolitos, a nivel de biorreactor, como línea de base de un programa de producción y formulación a nivel industrial de un producto biológico para el control de antracnosis en chocho andino.

### **Objetivos específicos**

Caracterizar el crecimiento de *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 en el medio de control MOLP.

Validar un medio de bajo costo para la producción de *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1.

Escalar la producción de *Bacillus subtilis* Ctpx S2-1 en biorreactor en el medio de bajo costo.

## 1 CAPÍTULO I: Marco teórico

### 1.1 La antracnosis en el cultivo de chocho en Ecuador

Los cultivares de la leguminosa del chocho están distribuidos en América del Sur abarcando los países andinos desde Colombia a Argentina (Tapia, 2000, p. 66). Esta leguminosa destaca por su nivel proteico del 15.57% en grano cocido según informes de USDA (2015), con un contenido de aminoácidos destacable en leucina, arginina y lisina como lo afirman Villacrés, Peralta y Caicedo (1998, p.11), y total de grasa y fibra del 2.92% y 2.80% respectivamente (USDA, 2015). Por estas características, la demanda de chocho ha ido en aumento tanto a nivel nacional como internacional. De esto se conoce que hasta inicios del año 2000, sólo en el Ecuador, existió una demanda insatisfecha del 59% en grano listo para el consumo (grano desamargado y cocido), por lo que se ha proyectado un requerimiento nacional anual de 10 600 toneladas. Adicional, el consumo per cápita que se mantiene en el Ecuador oscila entre 0.2-0.4 kg/mes (Caicedo y Peralta, 1999, p. 2-6) lo que supone un consumo de medio y bajo según los requerimientos de 0.8 kg/mes de chocho de acuerdo a Bayona (1989, p. 15). Para cubrir la demanda se requiere de la oferta de un producto en calidad y cantidad óptimas, que exigirá de asesoramiento técnico, adiestramiento a productores y esencialmente materia prima sana (Jacobsen y Sherwood, 2002, p. 37).

En sistemas de monocultivo y con alta humedad, el chocho *Lupinus* spp. es afectado por hongos, según lo corroboran estudios de Frey y Yabar (1983) y Suquilanda (2010, p. 142). Además concuerdan que entre los patógenos fungosos, destaca el género *Colletotrichum* spp., hongo causante de la antracnosis. Insuasti, (2001, p. 25) describe la antracnosis como una afección a todas las etapas fenológicas del cultivo en el campo y en el almacenamiento de la semilla en poscosecha. En el Ecuador, el agente causal de la antracnosis es la especie *Colletotrichum acutatum*, según investigaciones de Falconí, Visser y van Heusden (2013, p. 819). Los estudios realizados por Falconí y colaboradores (2013, p. 819) y Frey y Yabar (1983), afirman que la infección se propaga en el tallo y continúa hacia las hojas y brotes terminales, provocando la decadencia de

primordios florales y como fin, la pérdida de floración y consecuentemente del grano. Los síntomas en semillas se observan por su volumen minúsculo y coloración oscura, en etapas de emergencia existen lesiones en los cotiledones y parte baja del tallo, que se presenta con coloración naranja-oscura y hace que la planta se seque y se curve (Insuasti, 2001, p. 25; Madariaga, 2008, p. 45). Consecuentemente, varios autores han revelado que las pérdidas por antracnosis en chocho alcanzan tasas que van desde el 50% hasta el 100% (Falconí, Visser y van Heusden, 2013, p. 819; Murillo, Rivera, Peralta, Mazon y Vargas, 2006, p. 26; Talhinhos, Baroncelli y Le Floch, 2016, p. 5).

### **1.1.1 Medidas de control**

Para el control de la enfermedad existen diferentes técnicas divididas en dos grupos: técnicas de manejo tradicional y técnicas de manejo alternativo. Dentro de las técnicas tradicionales se incluye a todo tipo de control químico con productos sintéticos (Peralta *et al.*, 2012, p. 15) mientras que los controles alternativos comprenden técnicas de control físico y técnicas de control biológico. A continuación se explican los tipos de controles mencionados.

#### **1.1.1.1 Control por técnicas de manejo tradicional**

La aplicación de fungicidas químicos ha sido la medida de control más extendida para reducir la antracnosis en chocho. Las recomendaciones de productos químicos según Peralta *et al.*, (2012, p. 15) contienen como ingredientes activos Benomil, Carbendazim, Clorotalonil, Difenconazol y Propineb. Mientras que estudios de Thomas, Sweetingham y Adcock (2008, p. 1075-1076) han demostrado reducciones en la severidad de la enfermedad hasta del 80% en semillas inoculadas con el patógeno mediante el uso de Azoxystrobina, con similar efectividad en el uso de Clorotalonil, Mancozeb y Oxicloruro de cobre.

#### **1.1.1.2 Control por técnicas de manejo alternativo**

- **Calor seco**

La erradicación de la antracnosis en semilla de chocho a niveles nulos, se ha demostrado con el uso de calor seco con el afán de buscar tratamientos

alternativos amigables con el ambiente (Falconí y Yáñez, 2016 y Thomas y Adcock, 2004, p. 537). Según estudios de Thomas y Adcock (2004, p. 538), se aprecian mejores resultados con exposiciones de semilla a 60°C por 7 días y a 65°C por 4 días, sin afección en la viabilidad y con reducciones de la enfermedad significativas  $\approx$  100%. De la misma manera, Falconí y Yáñez (2016) demuestran el uso de calor seco 65°C durante 8 y 12 horas con inhibición de la transmisión de la enfermedad en un 75% y 85% respectivamente, mostrando incluso incrementos en el nivel de emergencia de las semillas.

#### ▪ **Control biológico**

El control biológico se ha caracterizado por el uso de microorganismos con potencial antagónico frente a los causantes de enfermedades en cultivares, se afirma que su uso tiene gran potencial contra enfermedades fúngicas (Droby, Wisniewski, Macarisin y Wilson, 2009, p. 137). La base del control biológico con antagonistas naturales de una enfermedad, es la reducción de la población de los fitopatógenos, afirma De Bach (1964). De estudios de Spadaro y Gullino (2004, p. 186) se conoce que los microorganismos antagonistas para el control de enfermedades fúngicas incluyen hongos filamentosos, hongos tipo levadura, levaduras y bacterias. De éstos, su acción antagónica con el patógeno puede ser en conjunto o individualmente por antibiosis, adherencia al patógeno, competencia por nutrientes, competencia por espacio, inducción de resistencia en el huésped, disminución de patogenicidad o impedimento de la formación de inóculo (Spadaro y Gullino, 2004, p. 186-187; Teixidó, Torres, Viñas, Abadías y Usall, 2011, p. 366).

La producción y formulación de bioproductos para control biológico ha sido muy estudiada en las dos últimas décadas, sin embargo su uso no se ha extendido entre los agricultores y es muy limitado debido entre otros a las regulaciones del mercado, el modo de acción reducido en comparación con tratamientos químicos y costos de producción elevados, lo cual limita la disponibilidad en el mercado de estos productos (Droby *et al.*, 2009, p. 138; Köhl *et al.*, 2011, p. 66; Spadaro y Gullino, 2004, p. 188 ; Teixidó *et al.*, 2011, p. 368).

En granos como el frejol se ha estudiado a cepas de *Bacillus*, *Trichoderma*, *Pseudomonas* y *Rodhococcus* como agentes de biocontrol de los patógenos *Rhizoctonia solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani* y *Colletotrichum* sp. (Corrêa, Moura, Denardin, Soares y Schäfer, 2008, p. 156 ; El-Bendary, Hamed, y Moharam, 2016, p. 173; Toghueoa *et al.*, 2016, p. 8).

## **1.2 Control biológico microbiano con *Bacillus* spp.**

### **1.2.1 Características de *Bacillus subtilis* y sus metabolitos**

*Bacillus subtilis*, se ha descrito por Maruo y Yoshikawa (1989, p. 135) como una rizobacteria de la familia *Bacillaceae* y género *Bacillus*, que habita el suelo y las raíces de las plantas, presenta características de bacteria Gram positiva, catalasa positiva, aerobio estricto, productor de endosporas y biofilm. Estudios de Stein (2005, p. 845) aseguran que *Bacillus subtilis* destaca como productor de moléculas bioactivas con capacidad antifúngica, debido al contenido de sustancias antibióticas. Como lo aseveran estudios de Cheng, Su, Gong, Wang y Yu, (2008, p. 180), los lipopéptidos, son considerados los metabolitos secundarios con mayor potencial biocida de la bacteria. Peypoux, Guimand, Delcambe, Das y Lederec, (1978, p. 3992) han definido a los lipopéptidos producidos por *B. subtilis* como lipoproteínas cíclicas y los han agrupado en las familias fengicinas, iturinas y surfactinas. En el caso de las iturinas y fengicinas se ha demostrado que tienen un potencial alto para inhibir el crecimiento de hongos filamentosos provocando inhibición en la germinación de sus esporas como lo aseguran Vanittanakom, Loeffler, Koch y Jung (1986, p. 888). La surfactinas además actúan como biosurfactantes y en la formación de biofilms.

Desde el punto de vista práctico para implementación de procesos de producción de *Bacillus subtilis*, los lipopéptidos antifúngicos dependen directamente de diversos factores intrínsecos propios de estas bacterias y extrínsecos principalmente relacionados al uso de medios de cultivo para el crecimiento de la bacteria según afirmaciones de Pryor, Gibson, Hay y Gosset, (2007, p. 63-65). Además, para Fawcett, Eichenberger, Losick y Youngman (2000, p. 8063), la síntesis de lipopéptidos está controlada por los genes que intervienen en la

esporulación, por lo que en *Bacillus subtilis*, la producción de lipopéptidos es directamente proporcional a la producción de endosporas y células vegetativas bacterianas. Otro punto favorable dentro de la implementación de procesos de producción de *Bacillus subtilis*, es su producción de endosporas. El conjunto de investigaciones de Rodríguez, Gamboa, Hernández y García (2005, p. 64); Tortora y Funke, (2007, p. 425) y Stainer y Villanueva (1996, p. 509) han descrito que la formación de endosporas en este tipo de bacteria, le confiere el potencial para resistir a condiciones extremas como calentamiento, congelación, desecación, radiación UV, radiación ionizante, agentes oxidantes, sustancias químicas tóxicas y tiempo, durando incluso décadas. Las endosporas, son células en estado de latencia que poseen una membrana impermeable formada por peptidoglucano según lo afirman Stainer y Villanueva (1996, p. 510). Es así que, como lo aseguran Curtis y colaboradores (2008, p. 485), la formación de una endospora por cada célula vegetativa, en etapas de escasez de nutrientes y en situaciones extremas, permite que la bacteria sobreviva, dando cabida a que su resistencia pueda ser aprovechada para procesos de industrialización que frecuentemente destruirían a las células vegetativas.

En adición, el potencial de *Bacillus subtilis* como controlador biológico también proviene por la competencia de espacio entre patógeno - antagonista, y la generación de respuestas de “inmuno estimulación” en la planta huésped (Ongena, Henry y Thonart, 2009, p. 58). Por último, durante su crecimiento el tiempo de llegada a la fase estacionaria es reducido, lo cual conlleva a la producción de metabolitos secundarios antifúngicos con mayor facilidad (Tejera, Heydrich y Rojas, 2012, p. 117).

### 1.2.2 ***Bacillus subtilis* para el control de antracnosis**

El uso de *Bacillus subtilis* para el control de antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* ha sido demostrado en estudios previos en cítricos (Kupper, Gimenes-Fernandes y Goes, 2003, p. 251) y en manzanas (Kim, Lee, y Chae, 2015, p. 1954 y Moreira, Nesi y May De Mio, 2004, p. 30) con reducciones de hasta el 80% en la enfermedad en semillas y plántulas (Kim, Lee y Chae, 2015, p. 1954). En el chocho estudios de Yánez, Falconí, Grijalva, Oliva,

y Castañeda (2015, p. 42) demostraron la efectividad de diferentes cepas del género *Bacillus* para la reducción de la antracnosis causada por diferentes patógenos de poscosecha en semillas, para *C. acutatum* se tuvo reducciones de la enfermedad *in vivo* e *in vitro* del 100%.

Dentro de la especie *Bacillus subtilis*, la cepa CtpxS2-1 ha demostrado un potencial antagonico alto para inhibir el crecimiento de *Colletotrichum acutatum* y otros hongos fitopatógenos de *Lupinus mutabilis* en semillas (Yáñez, Falconí, Grijalva, Oliva y Castañeda, 2015; Oliva, 2015, p. 42). Esta cepa fue aislada del suelo y filósfera de zonas con cultivos de *Lupinus mutabilis* ubicadas en el cantón Salcedo, provincia de Cotopaxi, las cuales mantenían plantas de chocho sanas con bajo o nulo manejo agroquímico (Yáñez, Falconí, Grijalva, Oliva y Castañeda, 2015, p. 42). La cepa CtpxS2-1, su biomasa y sus sobrenadantes libres de células, demuestran capacidad *in vitro* de inhibir a hongos fitopatógenos de *L. mutabilis* que incluyen *Ovularia* y *Fusarium* spp. (Grijalva y colaboradores 2015).

### **1.3 Producción de microorganismos para control biológico**

De acuerdo a Droby y colaboradores (2009, p. 137-145) el uso de microorganismos antagonistas posee un gran potencial para controlar enfermedades por hongos. Tomando en cuenta la efectividad antagonica de un microorganismo frente a un patógeno, la selección del mismo requiere el cumplimiento de aspectos descritos por (Droby *et al.*, 2009; El Ghaouth, Wilson y Wisniewski, 2004 y Wilson y Wisniewski, 1989) en los que se toma en cuenta:

- Conocimiento de los mecanismos de acción antagonica.
- Amplio rango de efectividad tanto para patógenos y cultivos.
- Adaptable en sus requerimientos de nutrientes.
- Genética estable.
- Efectivo en concentraciones bajas.
- Resistente a condiciones adversas de temperaturas y almacenamiento.
- Alta viabilidad y estabilidad luego de almacenamiento como formulación.
- Facilidad de aplicación.

- Seguro para humanos, animales y otros microorganismos.
- No tóxico para el huésped.
- Resistente a agroquímicos usados en campo.
- Compatible con agroquímicos y tratamientos físicos.
- Resistente a procedimientos de procesado comercial.
- Indicado para patentar y registrar para su uso comercial.

Una vez se ha realizado la selección de cepas potenciales de acuerdo a El Ghaouth y colaboradores (2004) y Wilson y Wisnewski (1989), se sigue con pruebas de su efectividad en laboratorio, pruebas de adaptabilidad en campo y/o para la elaboración comercial, optimización de la producción (procesos de producción) y formulación estable para su aplicación, todo esto adicionado a estudios de riesgos ambientales y sanitarios, económicos, registros comerciales y demás (Köhl *et al.*, 2011, p. 67; Teixidó *et al.*, 2011, p. 400).

### 1.3.1 Proceso de producción

Los procesos de producción de agentes para biocontrol, incluyen medios de cultivos los cuales Hernández *et al.* (2003, p. 25) de acuerdo a sus características físicas los clasifica en cultivos líquidos y sólidos, mientras que por su composición nutrimental, Zhang y Greasham (1999, p. 407) los divide en medios de cultivo complejos y medios de cultivo químicamente definidos. La producción de bacterias para biocontrol, es descrita por Tortora y Funke (2007, p. 267) como un proceso de producción realizado generalmente en medios de cultivo sumergidos, en bacterias del género *Bacillus* las producciones de los últimos años se han venido realizando de mejor manera en medios de cultivo líquidos (Helmuth, 2000, p. 15). En este caso, Stanbury y colaboradores (1995, p. 93) sugieren tomar en cuenta los parámetros de calidad biológica de los componentes del medio de cultivo, así como el nivel de nutrientes que éste pueda aportar con el fin de satisfacer los requerimientos del microorganismo.

#### 1.3.1.1 Bacterias en cultivos sumergidos

En escala semi-industrial e industrial, García, Quintero y López-Munguía (1993, p. 562) afirman que la producción de bacterias en cultivos sumergidos se realiza

mediante fermentadores de torre o tanques agitadores. Para Primo (1995, p. 1102), el proceso garantiza buenos rendimientos al inyectar aire estéril desde el fondo para el caso de microorganismos aerobios.

Durante el crecimiento bacteriano en medios líquidos, se distinguen cuatro etapas que representan el comportamiento de microorganismos a través del tiempo, éstas se aprecian en la Figura 1 e incluyen, de acuerdo a Hernández, Alfaro y Arrieta (2003, p. 47-48) y Prieto y Navarro (2011, p. 16), las siguientes fases:

**Fase lag:** adaptación del microorganismo a las condiciones del cultivo.

**Fase logarítmica:** máxima velocidad de crecimiento, mínimo tiempo de generación, consumo de los nutrientes del medio.

**Fase estacionaria:** acumulación y liberación de metabolitos de importancia. No hay aumento de biomasa por agotamiento de nutrientes o por presencia de desechos de la fase exponencial que impiden el crecimiento.

**Fase de declive:** reducción del número de células viables del cultivo.



Figura 1. Etapas del crecimiento de bacterias en medios líquidos.

Tomado de (Prieto y Navarro, 2011, p.16)

### 1.3.1.2 Parámetros de producción

Para un crecimiento adecuado durante la producción se tomará en cuenta las condiciones externas e internas que afecten el crecimiento de *Bacillus subtilis*, como se explica a continuación.

- **Factores extrínsecos - ambientales.**

**Temperatura:** Estudios de Jacques *et al.* (1999) para *Bacillus subtilis* indican un rango de temperatura óptima de crecimiento en medios líquidos de 25 a 37 °C, con óptimas a 30°C según investigaciones de Yáñez *et al.* (2011).

**Oxígeno:** según sus requerimientos de oxígeno, Maruo y Yoshikawa (1989) clasificaron a *Bacillus subtilis* como aerobio estricto, mientras que Nakano y Zuber (2002) aseguran que es capaz de crecer en condiciones de anaerobiosis cuando se encuentra en condiciones de fermentación.

**Humedad:** en ausencia de agua el crecimiento para la mayoría de microorganismos es nulo (Romero, 2007).

- **Factores intrínsecos**

Factores propios del medio de cultivo y biología del microorganismo.

**Potencial de hidrógeno (pH):** para Jacques *et al.* (1999) el crecimiento de *Bacillus subtilis* en medio líquido es óptimo a  $\text{pH} \approx 7$ , Pryor y colaboradores (2007) aseveran que el pH influye directamente en la producción de endosporas y metabolitos antifúngicos de la bacteria.

**Potencial de oxidoreducción (Eh):** para Koneman y Allen (2008, p. 839), en un medio de cultivo, Eh se encuentra relacionado con el pH y la concentración de oxígeno del medio, por lo tanto indica el potencial de transferencia de electrones por oxidación o reducción desde el medio hacia el microorganismo que se desarrolle en él, de esta manera, Adams y Moss (2008, p. 29) afirman que las bacterias aerobias, que obtienen energía por oxidación, presentan mayor requerimiento de oxígeno como aceptor de electrones y demandan mayor Eh, a diferencia de las bacterias anaerobias, cuyo proceso es inverso.

**Requerimientos nutricionales:** un medio de cultivo idóneo para el crecimiento de microorganismos debe proporcionar como elementos base agua, gases, iones, fuentes de carbono y nitrógeno, así como oligoelementos y factores orgánicos de crecimiento (Forbes B., 2007, p. 93 y García, 2004, p. 58)

**Carbono:** los estudios de García (2004, p. 58) y Murray, Rosenthal y Pfaller, (2009, p. 65) consideran al carbono indispensable para la síntesis de componentes celulares, lo cuales pueden ser sintetizados a partir del metabolismo de CO<sub>2</sub> en bacterias autótrofas, o mediante el consumo de compuestos orgánicos en bacterias heterótrofas.

**Nitrógeno:** es utilizado en la síntesis de proteínas, material celular, constituyentes celulares y material genético (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009, p. 66). Las investigaciones de Jacques *et al.* (1999) han demostrado que la producción de sustancias con capacidad biocida en *Bacillus subtilis* mejora mediante el uso de peptonas.

**Oligoelementos:** iones importantes los constituyen K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup> así como componentes enzimáticos Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> (Murray, Rosenthal y Pfaller, 2009, p. 67). En *Bacillus subtilis* la producción de metabolitos y células totales, aumenta en bajas concentraciones de sales disueltas con cationes Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (Tabbene *et al.*, 2009).

**Factores de crecimiento:** son aquellos no sintetizados por el microorganismo, pueden ser aminoácidos, vitaminas y otros (Ingraham, 1998, p. 567).

### 1.3.2 Producción a bajo costo

Hernández, Alfaro y Arrieta (2003, p. 48) y Tortora y Funke (2007, p. 857) coinciden en que la producción de microorganismos a escala industrial se ve limitada por el uso de medios complejos, que satisfacen las necesidades nutricionales del microorganismo, proporcionan una alta productividad, pero su costo es alto a gran escala. Para ilustrar, Makkar y Cameotra (2002, p. 428) y

Miller y Churchill, (1986, p. 127) han aseverado que un medio de cultivo representa hasta un 30% del costo de producción durante procesos de fermentación de bacterias en medios líquidos, además como lo afirman Hofvendahl y Hagerdal (2000, p. 87) el uso de medios complejos como peptonas, extracto de levadura o sales, resulta muy costoso debido a la cantidad de nutrientes que contienen y su tipo de producción. Es por ello, que Fox y Bala (2000, p. 235) aseguran que una producción a bajo costo debería cubrir los requerimientos nutricionales con el fin de que el microorganismo puede mantenerse y desarrollarse a niveles adecuados con resultados que permitan un proceso de producción a nivel industrial a precio bajo. En general, Zhang y Greasham (1999) mencionan a los subproductos agroindustriales como materia prima barata disponible en el mercado y apta para la elaboración de medios de cultivo, siendo fuentes importantes de carbono y nitrógeno. Sin embargo, para Stanbury, Whitaker y Hall (1995), la limitación de este tipo de materia prima se resume en que pueden contener otros materiales ajenos a su composición debido a su origen, así como sustancias tóxicas o metabolitos extraños que perturben el desarrollo de la bacteria.

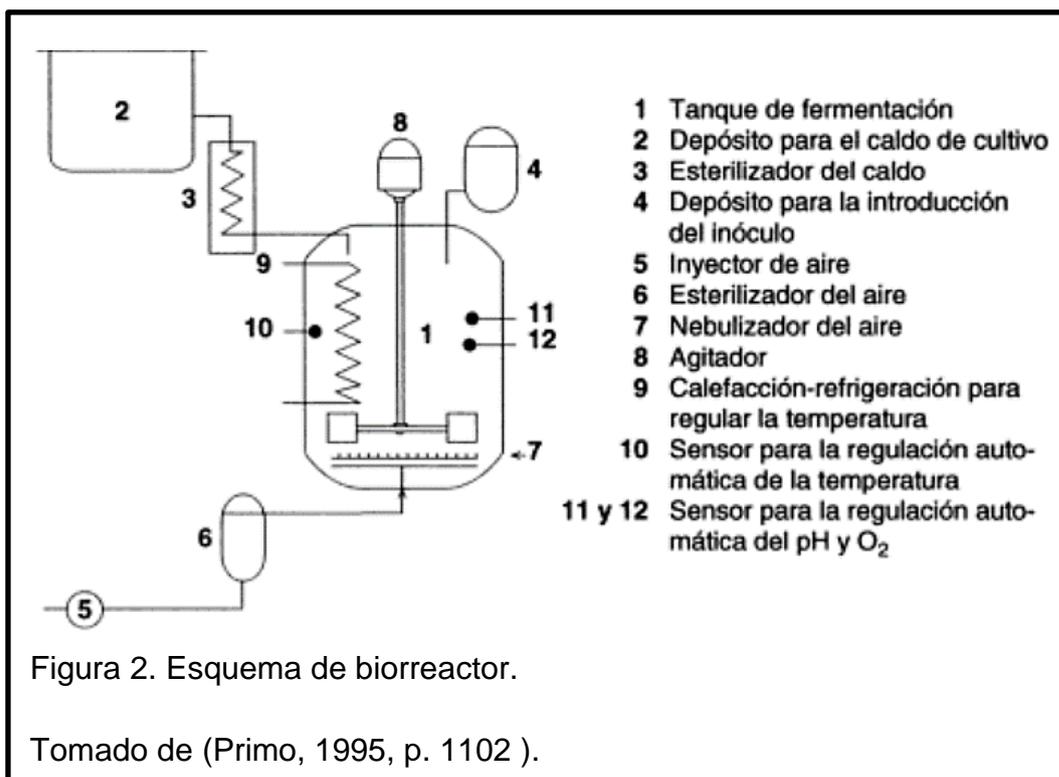
Los subproductos más utilizados incluyen:

- **Fuentes de nitrógeno**
  - **De origen animal:** provenientes de carne roja o carne de pescado seca, previa molienda. Reis, Servulo y De Franca (2004) estudian el aporte de aminoácidos en gran cantidad y de un alto valor biológico que éstas fuentes constituyen.
  - **De origen vegetal:** Ewe, Wan-Abdullah, y Liong (2010) han utilizado como fuentes a subproductos de soya (tortas, harinas), ya que aportan proteína 40% y carbono 35%, vitaminas y minerales.
- **Fuentes de energía**
  - **Melazas:** es un subproducto de la obtención de azúcar de caña. Sus azúcares son altamente fermentables y posee vitamina B y minerales, los

estudios de KiBeom, Sang-Kee y Yun (2013) afirman que la cantidad óptima de melazas en medios de cultivo, logra un rápido crecimiento celular y la producción de metabolitos secundarios.

- **Lactosuero:** al ser un subproducto de la leche, Yáñez *et al.* (2012b) lo describe como una fuente rica en lactosa y por lo tanto alta en carbono, proteínas solubles, minerales, vitaminas, y grasa.

### 1.3.3 Escalados de producción



Un escalado de producción según Hernández, Alfaro y Arrieta (2003, p. 37) inicia con el crecimiento de un cultivo puro en un medio determinado para realizar un *starter* o inóculo. A partir de ello, Hernández *et al.* (2003, p. 47) y Waites y colaboradores (2001, p. 293) coinciden en que el uso de biorreactor (Figura 2) supone el crecimiento a escala piloto para determinar la velocidad de crecimiento del microorganismo, sus niveles de producción de biomasa viable, efectividad y optimización de las condiciones de crecimiento. Posterior, y conociendo la dinámica de crecimiento del microorganismo, los estudios afirman que es

pertinente realizar la producción industrial con las condiciones optimizadas previamente y procurando costos y tiempos de producción mínimos. Una vez que la producción se haya realizado a escala industrial, se comprueba la efectividad del microorganismo respecto al patógeno como lo afirman Hernández *et al.* (2003, p. 39) y Waites y colaboradores (2001, p. 293).

## 2 CAPÍTULO II: Métodos

### 2.1 Caracterización del crecimiento de *Bacillus subtilis* y producción de metabolitos en medio de control

#### 2.1.1 Mantenimiento de antagonista y patógeno

La cepa de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 fue mantenida rutinariamente en medio de NYDA (caldo nutritivo 8 g L<sup>-1</sup>, extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup>, agar 20 g L<sup>-1</sup> y dextrosa 10 g L<sup>-1</sup>) por 24 horas a 30°C y conservada a largo plazo en criocongelación a -80°C en el banco de cepas del Centro de Investigación, Estudios y Desarrollo de Ingenierías (CIEDI) en criobolas de acuerdo a los métodos descritos en el Anexo 1.

Los aislados patogénicos de *Colletotrichum acutatum* fueron obtenidos a partir de muestras vegetales con síntomas de patogenicidad y cultivos esporulados anteriores, se muestreó y sembró en agar papa dextrosa PDA (39 g L<sup>-1</sup>; almidón de papa, agar y dextrosa), con posterior incubación por 5-7 días a 20°C. Los aislados puros fueron conservados en refrigeración a 4°C.

#### 2.1.2 Modelización del crecimiento

La modelización del crecimiento se realizó siguiendo los protocolos diseñados por Yáñez *et al.* (2011). Se cuantificó el crecimiento de cultivos bacterianos de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 de 0 a 48 horas con muestreo cada 2 horas en medio MOLP (Peptona 30 g L<sup>-1</sup>; Sacarosa 20 g L<sup>-1</sup>; Extracto de levadura 7 g L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.9 g L<sup>-1</sup>; CuSO<sub>4</sub> 0.0001 mg L<sup>-1</sup>; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.0005 mg L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.004 mg L<sup>-1</sup>; KI 0.0002 mg L<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 3.6 mg L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 0.45 g L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.14 mg L<sup>-1</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01 mg L<sup>-1</sup>; C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>; pH≈7) (Jacques *et al.*, 1999). Se estimó la producción de UFC mL<sup>-1</sup> mediante dilución y plateo en medio NYDA.

Los datos obtenidos en UFC mL<sup>-1</sup> se transformaron a Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> y la curva se modelizó con el modelo matemático de Baranyi y Roberts (1994), que especifica la variación de concentraciones Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> en función del tiempo, para ello se analizaron los datos en el software de crecimiento predictivo ComBase®.

La ecuación de Baranyi y Roberts (1994) estableció los parámetros de crecimiento de acuerdo a las ecuaciones 1,2 y 3.

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

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

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

Donde  $y(t)$  es el logaritmo natural de la concentración de células en el tiempo  $t(h)$ ;  $y_0$  es el logaritmo natural de la concentración de células en tiempo 0;  $\mu_{max}$  es la tasa máxima de crecimiento específico ( $h^{-1}$ );  $A(t)$  es la variable integral desde el tiempo 0 al tiempo  $t(h)$ ;  $m$  es el parámetro relacionado con la curvatura después de la fase exponencial;  $y_{max}$  es el logaritmo natural de la máxima concentración de células,  $q_0$  es el estado fisiológico de la célula al tiempo 0 y  $\lambda$  es la duración de la fase de latencia.

## 2.2 Validación de un medio de bajo costo para la producción de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1

Se diseñó un medio de cultivo de bajo costo en base a los resultados y estudios obtenidos por Gallardo *et al.* (2015) y Yáñez y colaboradores (2012b). El crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en el medio MOLP fue comparado con el crecimiento en el medio de bajo costo HSC40-ME2 a base de harina de soya 40 g L<sup>-1</sup>, melaza 2 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.9 g L<sup>-1</sup> y sales de MOLP (Jacques *et al.*, 1999) CuSO<sub>4</sub> 0.0001 mg L<sup>-1</sup>; FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 0.0005 mg L<sup>-1</sup>; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0.004 mg L<sup>-1</sup>; KI 0.0002 mg L<sup>-1</sup>; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 3.6 mg L<sup>-1</sup>; MgSO<sub>4</sub> 0.45 g L<sup>-1</sup>; ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.14 mg L<sup>-1</sup>; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.01 mg L<sup>-1</sup>; C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>

### 2.2.1 Producción de células totales y endosporas

La cuantificación de producción de endosporas y células vegetativas se realizó utilizando el método diseñado por Jacques *et al.* (1999) y los protocolos diseñados por Yáñez *et al.* (2011) para cuantificación de bacterias y endosporas producidas en medios líquidos.

Se partió de cultivos bacterianos de 24, 48 y 72 horas en medio MOLP (Jacques *et al.*, 1999) y medio de bajo costo, obtenidos a 30°C y 150 rpm (High Performance Shaking Incubator Labnet International 311DS ®). Se tomaron por duplicado muestras de cada medio. La concentración de células totales se cuantificó mediante dilución y plateo en medio NYDA. Para endosporas, se realizó previamente una eliminación de células vegetativas con baño maría a 80 °C, 15 – 20 minutos y se cuantificó mediante dilución y plateo en medio NYDA. Los resultados obtenidos en UFC mL<sup>-1</sup> se transformaron a Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> para tener uniformidad en la varianza. Los datos fueron analizados en el software de análisis estadístico SAS® *Institute Inc, Cary, NC, USA*, sometidos al análisis de varianza ANOVA con el posterior análisis de variabilidad de datos utilizando la prueba Student Newman Keuls (SNK) con nivel de confianza del 95%.

### **2.2.2 Tinción de células y endosporas bacterianas**

Para comprobar de forma cualitativa la pureza del cultivo y presencia de esporas bacterianas, para cada medio de cultivo se realizó tinción con verde malaquita-fucsina, se siguió la metodología de Wirtz, modificada por Shaefer y Fulton de acuerdo a las especificaciones de McGinnis (2012). Se utilizaron los medios de cultivo luego de realizado el proceso para cuantificación de endosporas como se explicó en el apartado 2.2.1. y se observó en microscopio (Olympus ® CX31) en aumento 100X.

### **2.2.3 Extracción y caracterización de metabolitos antifúngicos**

Se utilizaron cultivos bacterianos obtenidos en medio MOLP y medio de bajo costo de 24, 48 y 72 horas de incubación a 30°C, 150 rpm (High Performance Shaking Incubator Labnet International 311DS ®). El sobrenadante libre de células (SLC) fue separado de la biomasa mediante centrifugación a 5000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804R ® A4-44) 15 minutos a 4°C. La extracción de lipopéptidos se realizó en mezcla del SLC con n-butanol en relación 1:1, en frascos cerrados, con agitación de 200 rpm por 12 horas (Boeco Universal Orbital Shaker PSU-10i ®). El sobrenadante obtenido fue separado de la fracción acuosa y se cuantificó su volumen, se dejó evaporar en agitación (Cabina

extractora de gases BIOBASE® FH 1800) y posteriormente fue resuspendido en metanol absoluto calidad HPLC en proporción 1:10 metanol- sobrenadante. El extracto de lipopéptidos concentrado fue almacenado en tubos Falcon a 4°C.

#### 2.2.4 Caracterización de lipopéptidos antifúngicos por cromatografía en capa fina (HPTLC) y bioautografía.

El análisis se realizó con extractos de lipopéptidos obtenidos en medio MOLP y medio de bajo costo a las 24, 48 y 72 h como se describió en 2.2.3. La presencia de diferentes familias de lipopéptidos antifúngicos se determinó mediante análisis cromatográfico en capa fina (HPTLC), el posterior análisis de actividad antifúngica se realizó con la prueba conjunta HPTLC-bioautografía diseñada por (Hamburguer y Cordell, 1987) y siguiendo el protocolo establecido por (Yáñez *et al.*, 2012a).

Se corrió un TLC en placas (TLC silica gel plates 60 F<sub>254</sub> 20x20 Merck ®) con inoculación de 100 µL de extracto lipopeptídico. Se utilizó un solvente de mezcla cloroformo:metanol:agua (65:25:4 mL v/v/v). Posteriormente se observó bajo luz UV identificando las familias de lipopéptidos y se midió su factor de retención (Rf).

$$Rf = \frac{Ds}{Dd} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Siendo **Ds** la medida de la distancia recorrida del elemento, y **Dd** la medida de la distancia recorrida por el solvente (Vilanova y Sogorb, 2004).

Las placas fueron colocadas en cajas Petri de iguales dimensiones y se añadió PDA inoculado con  $2 \times 10^5$  conidias  $\bullet$  mL<sup>-1</sup> de *Colletotrichum acutatum*. Se incubó a 25°C por 7 días y se verificaron las zonas de inhibición de crecimiento micelial.

## 2.2.5 Ensayos de efectividad de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en infecciones latentes e inoculaciones artificiales

### 2.2.5.1 Viabilidad de semilla

Se evaluó el porcentaje de germinación y emergencia en lotes de semillas de las variedades INIAP 450 Andino, INIAP ECU-2658 e INIAP F3 (ECU-2658 X ECU-4815). Previamente las semillas fueron desinfectadas en solución de hipoclorito 0,05% y fueron sembradas en bandejas de germinación de 50 celdas con sustrato estéril "Rancho Alegre". La lectura de resultados se realizó a las 2 semanas posteriores a la siembra.

### 2.2.5.2 Efectividad en semillero

Para evaluar la efectividad de *Bacillus subtilis* obtenido en medio de bajo costo contra infecciones latentes e inoculaciones artificiales de *Colletotrichum acutatum*, se utilizaron 12 tratamientos con una unidad experimental de 16 semillas por tratamiento (semillero en cajas Petri) y 4 repeticiones. Los 12 tratamientos para semilla desinfectada variedad INIAP ECU-2658 se especifican en la Tabla 1.

Tabla 1. Tratamientos utilizados para evaluar efectividad de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 contra infecciones latentes e inoculaciones artificiales de *Colletotrichum acutatum*.

Tratamiento
<b>CK1</b> Semilla desinfectada INIAP ECU-2658.
<b>CK2</b> Semilla desinfectada + Vitavax ® 1g Kg <sup>-1</sup> de semilla.
<b>CK3</b> Semilla desinfectada + Rhapsody ® 1.5 mL L <sup>-1</sup> .
<b>CK4</b> Semilla desinfectada + sobrenadante filtrado de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 de 72 h, 2X10 <sup>7</sup> UFC mL <sup>-1</sup> .
<b>CK5</b> Semilla desinfectada + cultivo bacteriano de 72 h de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1, 2X10 <sup>7</sup> UFC mL <sup>-1</sup> .

---

<b>CK6</b>	Semilla desinfectada + suspensión filtrada de biomasa en tampón PBS de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1, $2 \times 10^7$ UFC mL <sup>-1</sup> .
<b>T1</b>	Semilla desinfectada INIAP ECU-2658 + inóculo de <i>Colletotrichum acutatum</i> $2 \times 10^5$ conidias mL <sup>-1</sup> .
<b>T2</b>	Semilla desinfectada + Vitavax ® 1g Kg <sup>-1</sup> de semilla + inóculo de <i>Colletotrichum acutatum</i> $2 \times 10^5$ conidias mL <sup>-1</sup> .
<b>T3</b>	Semilla desinfectada + Rhapsody ® 1.5 mL L <sup>-1</sup> + inóculo de <i>Colletotrichum acutatum</i> $2 \times 10^5$ conidias mL <sup>-1</sup> .
<b>T4</b>	Semilla desinfectada + sobrenadante filtrado de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1 de 72 h, $2 \times 10^7$ UFC mL <sup>-1</sup> + inóculo de <i>Colletotrichum acutatum</i> $2 \times 10^5$ conidias mL <sup>-1</sup> .
<b>T5</b>	Semilla desinfectada + cultivo bacteriano de 72 h de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1, $2 \times 10^7$ UFC mL <sup>-1</sup> + inóculo de <i>Colletotrichum acutatum</i> $2 \times 10^5$ conidias mL <sup>-1</sup> .
<b>T6</b>	Semilla desinfectada + suspensión filtrada de biomasa en tampón PBS de <i>Bacillus subtilis</i> CtpxS2-1, $2 \times 10^7$ UFC mL <sup>-1</sup> + inóculo de <i>Colletotrichum acutatum</i> $2 \times 10^5$ conidias mL <sup>-1</sup> .

---

El patógeno fue obtenido de cultivos puros de *C. acutatum* mantenidos en PDA durante 7-10 días a 20°C. Se preparó una suspensión del mismo en concentración  $2 \times 10^5$  conidias mL<sup>-1</sup> verificada por conteo en cámara Thoma y se trató con ella a la semilla desinfectada durante 4 minutos a 200 rpm. Para el antagonista, se utilizó el medio de cultivo completo a partir del cual se obtuvieron el sobrenadante y la biomasa por centrifugación a 5 000 rpm por 15 minutos, 4°C. Las concentraciones de la bacteria fueron estimadas por medio de dilución y plateo.

La lectura de resultados se realizó a las 2 semanas de iniciado el proceso y se evaluó el porcentaje de germinación (%G) e incidencia (%I) (Agrios, 2005).

$$\%G = \frac{\# \text{ semillas germinadas}}{\# \text{ total de semillas}} * 100 \quad (\text{Ecuación 5})$$

$$\%I = \frac{\# \text{ semillas enfermas}}{\# \text{ total de semillas}} * 100 \quad (\text{Ecuación 6})$$

Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza ANOVA con el posterior análisis de variabilidad de datos utilizando la prueba LSD (Mínima Diferencia Significativa) con nivel de confianza del 95%.

### 2.2.5.3 Efectividad en bandejas de germinación

Para evaluar la efectividad de *Bacillus subtilis* obtenido en medio de bajo costo contra infecciones latentes e inoculaciones artificiales de *Colletotrichum acutatum*, se utilizaron los 12 tratamientos especificados en el apartado 2.2.5.2 con una unidad experimental de 98 semillas por tratamiento en bandeja de germinación y 2 repeticiones por tratamiento. Para la siembra se utilizó sustrato estéril “Rancho Alegre” y se mantuvo en el invernadero de la asociación ASOPRORQUÍDEAS a condiciones controladas de 12 horas luz, humedad 60%. La lectura de resultados se realizó a las 5 semanas luego de la siembra, se evaluó el porcentaje de emergencia (%E), porcentaje de severidad (%S) e incidencia (%I), número de hojas aéreas promedio (#H) y tamaño raíz (Tr) (Agrios, 2005).

Tabla 2. Escala visual de severidad de la enfermedad (#S) y su equivalente en porcentaje del área foliar infectada (%eAFI).

Escala S#	0	1	2	3	4	5
% eAFI	0	10	25	40	70	100

*Nota:* La severidad se evaluó en 10 plantas por repetición.

*Nota 2:* Tabla de severidad adaptada de (Agrios, 2005).

$$\%S = \frac{\sum \%eAFI \text{ para cada planta}}{\# \text{ observaciones}} * 100 \quad (\text{Ecuación 7})$$

$$\%I = \frac{\# \text{ plantas enfermas}}{\# \text{ total de plantas germinadas}} * 100 \quad (\text{Ecuación 8})$$

$$\%E = \frac{\# \text{ plantas germinadas}}{\# \text{ total de plantas}} * 100 \quad (\text{Ecuación 9})$$

$$\#H = \frac{\sum \# \text{ de hojas de cada planta}}{\# \text{ de plantas observadas}} \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$Tr = \frac{\sum \text{ tamaño de raíz de cada planta (cm)}}{\# \text{ de plantas observadas}} \quad (\text{Ecuación 11})$$

(Agrios, 2005)

El número de hojas y tamaño raíz (cm) fueron evaluados en una muestra de 10 plantas por repetición. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de varianza ANOVA con el posterior análisis de variabilidad de datos utilizando la prueba LSD (Mínima Diferencia Significativa) con nivel de confianza del 95%.

### 2.2.6 Efectividad de *Bacillus subtilis* en campo

La evaluación en campo fue realizada en la provincia de Imbabura, ciudad de Otavalo, parroquia Monserrat. Se utilizaron lotes de semillas de la variedad INIAP ECU-2658 distribuidas en 3 bloques, 3 tratamientos y 3 repeticiones con una unidad experimental de 30 plantas

Los tratamientos evaluaron la efectividad para infecciones latentes en semilla de chocho sin desinfectar utilizando *Bacillus subtilis* S2-1 obtenido en medio de bajo costo, en concentración de inoculación  $10^6$ , comparado con Rhapsody® (*Bacillus subtilis* QST-173, Bayer CropScience C.A. Canadá) y un testigo sin aplicación de tratamiento. Las plantas fueron inoculadas con los bioproductos cada 15 días en volumen de 20 mL planta<sup>-1</sup>. Se evaluó severidad e incidencia de enfermedades latentes a las 6 semanas de siembra. La severidad fue evaluada en 6 plantas por repetición. Los datos obtenidos fueron sometidos al análisis de

varianza ANOVA con el posterior análisis de variabilidad de datos utilizando la prueba LSD (Mínima Diferencia Significativa) con nivel de confianza del 95%.

### **2.3 Escalado de producción de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en biorreactor en el medio de bajo costo**

#### **2.3.1 Calibración del inóculo**

El inóculo fue obtenido de cultivos frescos de *Bacillus subtilis* en triple estría obtenidos en medio sólido NYDA a las 24 horas de crecimiento, 30°C. La biomasa fue resuspendida en solución tampón PBS pH≈6,5 y homogenizada (Fisher Scientific® AnaLog Vortex Mixer 20V 02215365) por 60 segundos. Se estimó concentración mediante dilución y plateo en medio NYDA y se cuantificó Densidad Óptica a 700 nm.

#### **2.3.2 Crecimiento en biorreactor**

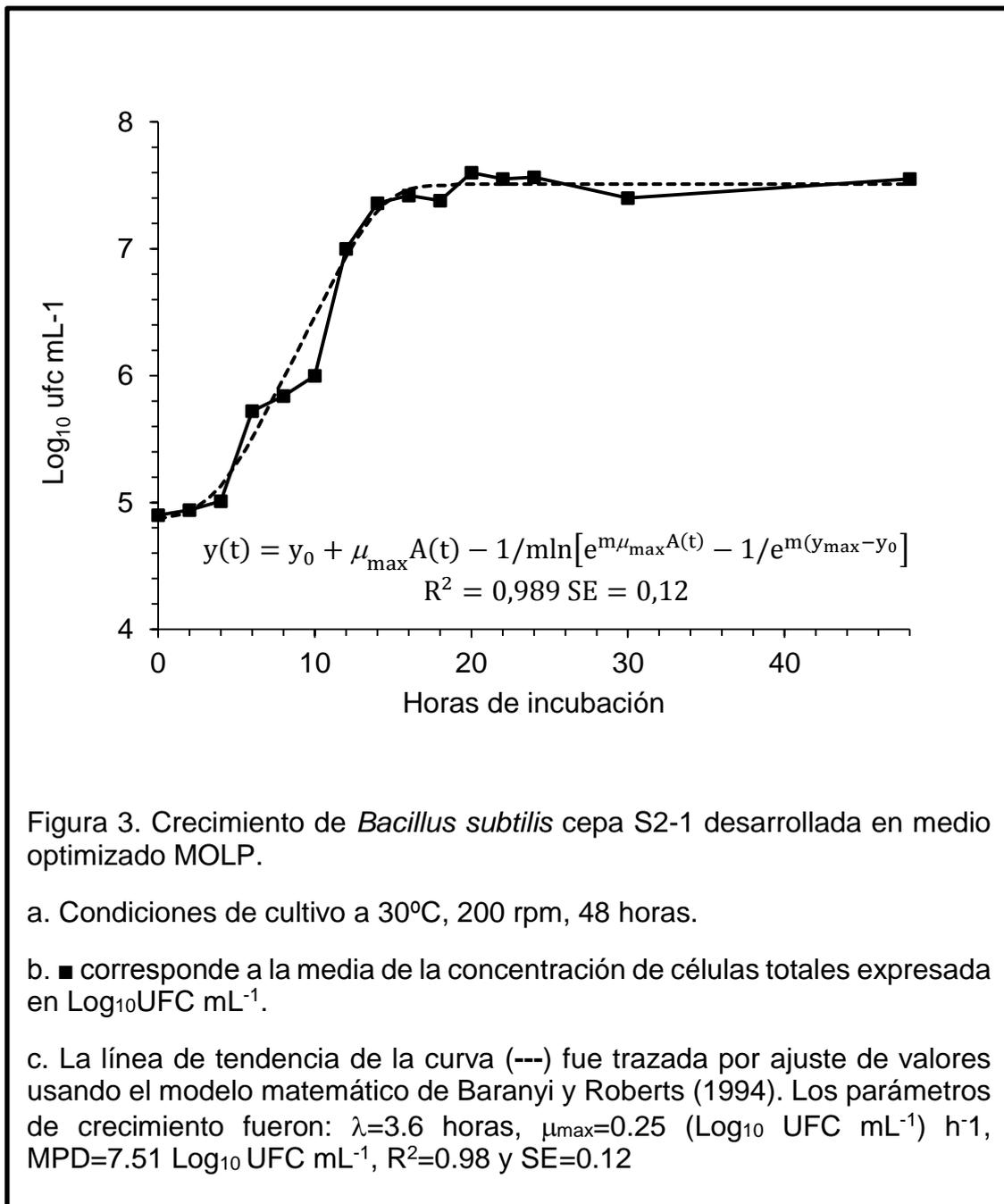
El escalado de producción en biorreactor fue realizado en una unidad de 5 L (Applikon® eZ control) con el medio de bajo costo HSC40-ME2 siguiendo los protocolos de Yáñez *et al.* (2012b). Se siguieron las indicaciones de calibrado de acuerdo al manual (Anexo 10) y se autoclavó el medio a 121°C, 15 minutos. Posteriormente se inoculó a concentración  $10^5$  con el resuspendido de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 del apartado 2.3.1, se añadió antiespumante (Sigma® Antifoam 204) al 0.01% para evitar pérdidas por formación de espuma. Se estimó la concentración de células con muestreo cada 2 horas durante 24 horas, mediante dilución y plateo en medio NYDA. La ecuación de (Baranyi y Roberts, 1994) se utilizó para la modelización de la curva de crecimiento a través del análisis en el software ComBase®.

### 3 CAPÍTULO III: Resultados y discusión

#### 3.1 Características del crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y producción de metabolitos

##### 3.1.1 Características del crecimiento en medio MOLP

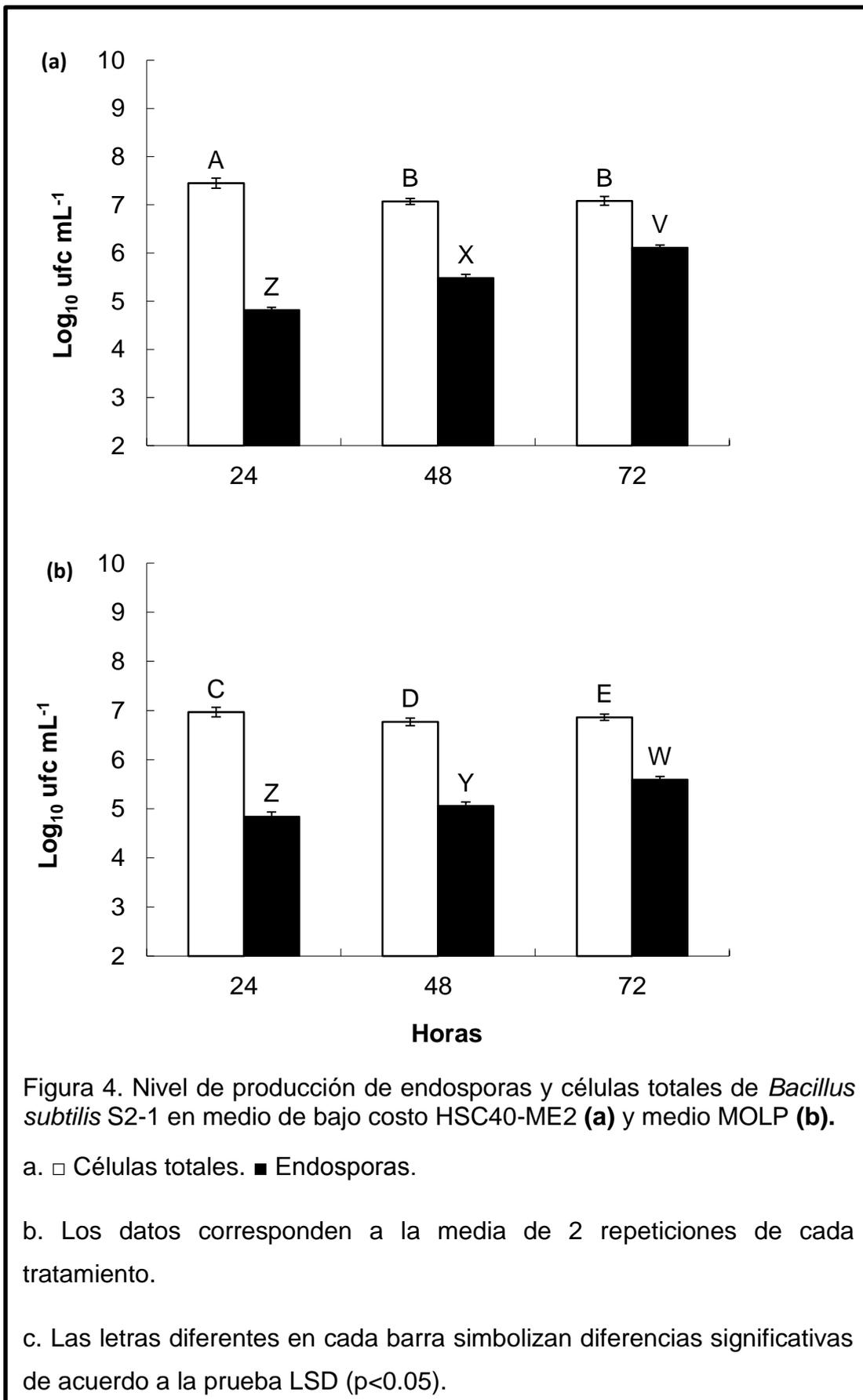
En la Figura 3 se presenta el crecimiento de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 en medio MOLP. La concentración de células de la cepa aumentó de 4.87 a 5.72 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> durante las primeras 6 horas. El máximo desarrollo se alcanzó a partir de las 20 horas con 7.55 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>. Del análisis de los datos del crecimiento de microorganismo en relación al tiempo mediante el modelo matemático de Baranyi y Roberts (1994), se observó un crecimiento sigmoideo, característico de las bacterias de la especie *Bacillus subtilis*. Los parámetros de crecimiento sigmoideo presentaron una duración de la fase de latencia ( $\lambda$ ) de 3.6 horas, tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) 0.25 (Log<sub>10</sub>UFC mL<sup>-1</sup>)h<sup>-1</sup>, máxima concentración de células (MPD) 7.51 Log<sub>10</sub>UFC mL<sup>-1</sup>, coeficiente de relación (R<sup>2</sup>) 0.98 y desviación estándar (SE) 0.12. Reportes previos en otra cepa de *Bacillus subtilis* desarrollados por Yáñez, *et al.* (2011) en medio de cultivo TSB, corroboran una dinámica de crecimiento de la especie con curvatura sigmoidea, fase de latencia hasta las 5 horas y un crecimiento máximo hasta las 18 horas con posterior fase estacionaria hasta las 80 horas.



### 3.1.2 Producción de endosporas y células totales

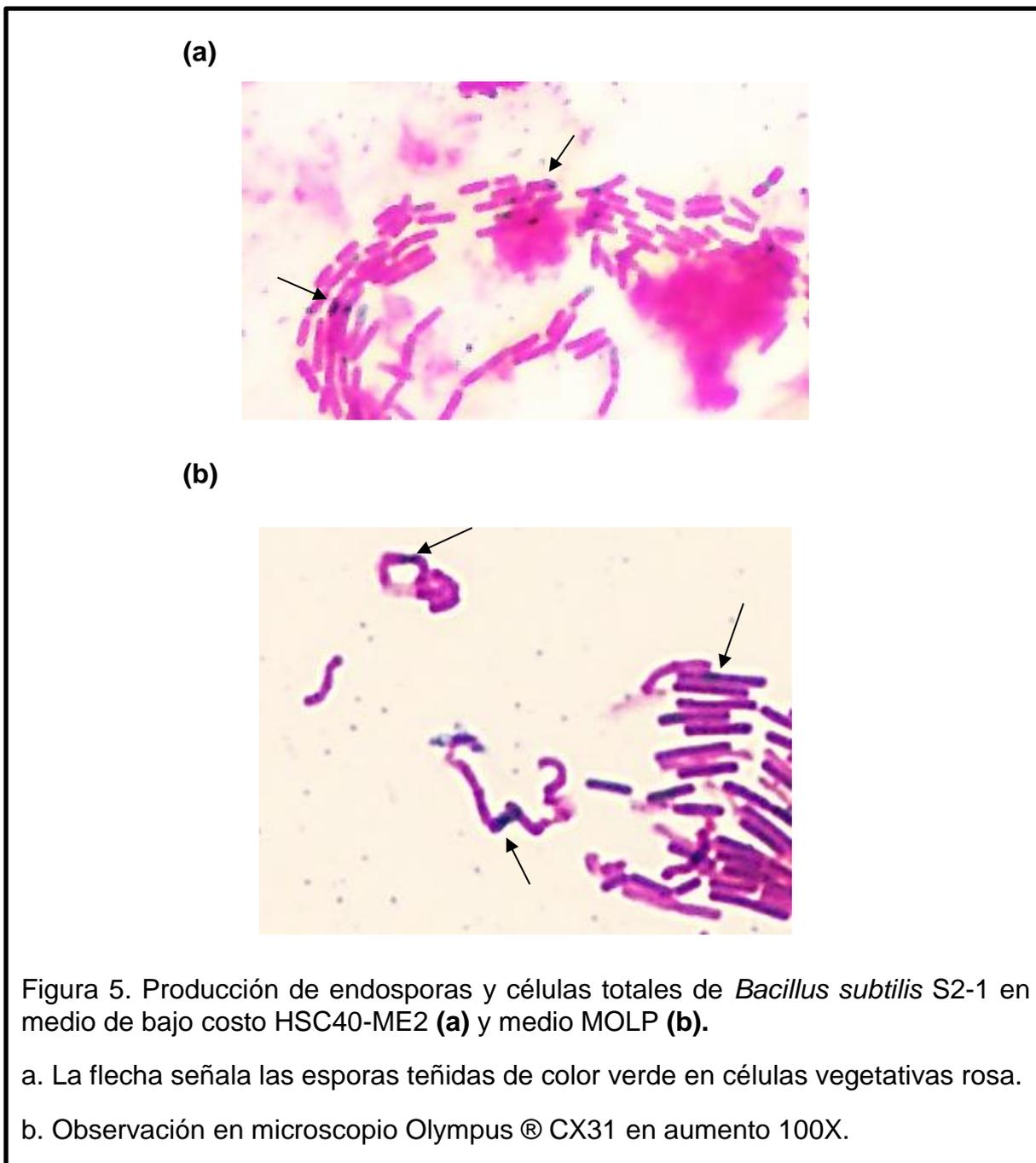
La cuantificación de producción de endosporas y células totales demostró que para ambos medios de cultivo, *Bacillus subtilis* S2-1 tuvo una producción de CT que se mantuvo a las 24, 48 y 72 horas con una concentración  $\approx 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Del otro lado, la producción de endosporas aumentó progresivamente en función del tiempo. Estadísticamente la prueba SNK revela una diferencia significativa tanto en la concentración de esporas como en la concentración de células totales al comparar ambos medios de cultivo Figura 4, exceptuando el valor de las medias de endosporas a las 24 horas en donde no existe diferencia significativa entre MOLP y HSC40-ME2.

Al contrastar los valores obtenidos, el medio HSC40-ME2 tuvo una producción ligeramente superior de células totales con una media de 7.08 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> a las 48 y 72 horas, en comparación con el medio MOLP con concentración media 6,90 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> a las 24, 48 y 72 horas, a pesar que ambos medios de cultivo fueron inoculados a una misma concentración. De la misma manera, la producción de endosporas en el medio MOLP es inferior respecto a la que se tiene en el medio de bajo costo, con valores a las 72 horas de 5.60 y 6.12 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> respectivamente. La tendencia de concentración en células totales permite inferir, que la misma se mantiene con el tiempo, mientras que en endosporas, la producción aumenta en función del tiempo. Estudios de Rahman *et al.* (2006) corroboran que la producción de endosporas aumenta a partir de las 48 horas como mecanismo de defensa en ausencia o decremento de la disponibilidad de nutrientes.



### 3.1.3 Pureza de cultivos por tinción de células y endosporas bacterianas.

Para ambos medios de cultivo, se observan las estructuras características de *Bacillus spp.* Figura 5. La presencia de esporas confirman la identificación y pureza del género y su coloración verde se debe al uso de colorante de contraste verde de malaquita, que penetra en la espora por calor (Forbes, 2007).

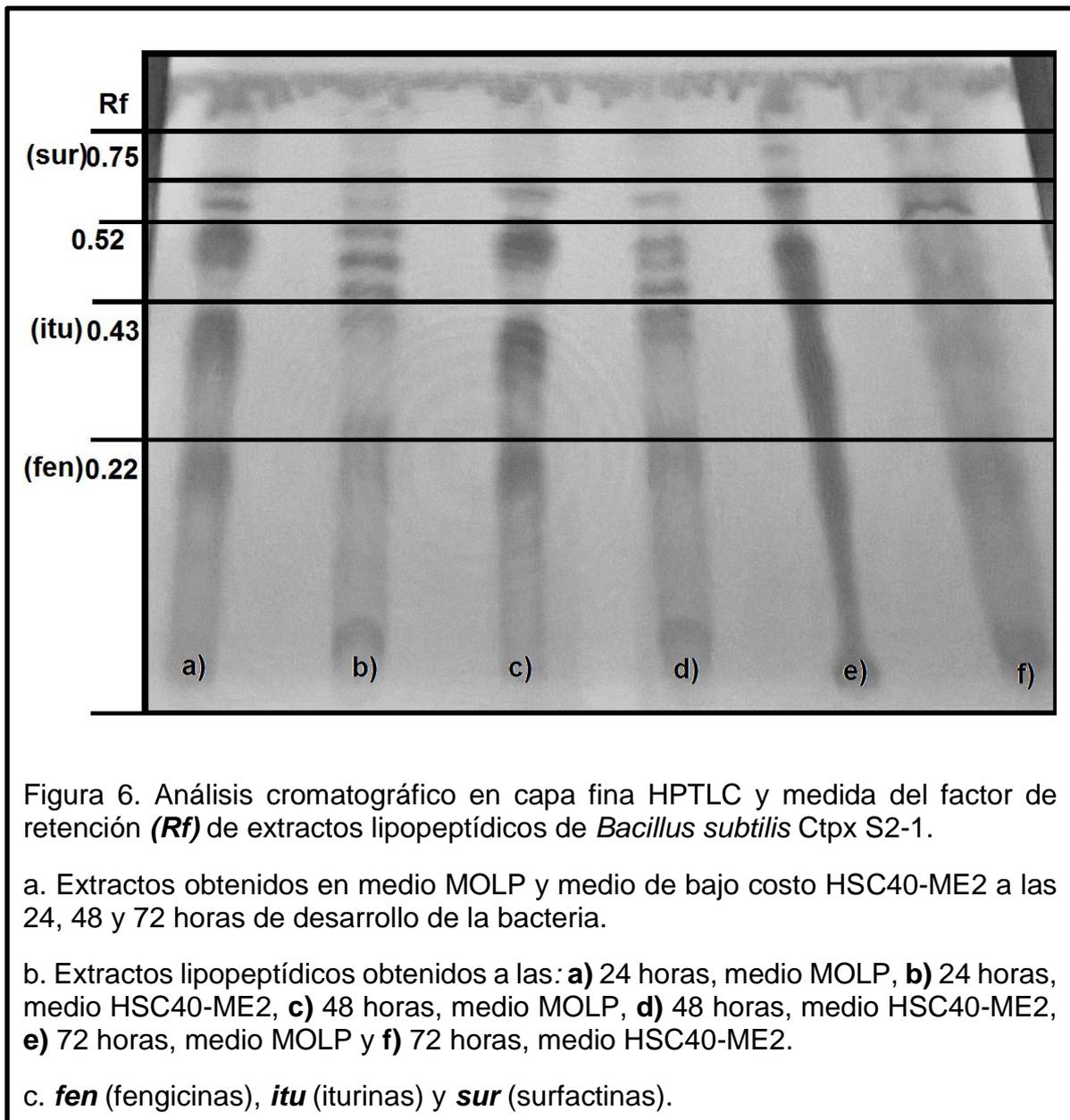


## 3.2 Validación de un medio de bajo costo

### Efectividad *in vitro* de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum acutatum*

#### 3.2.1 Identificación de metabolitos antifúngicos y su efectividad contra *Colletotrichum acutatum* mediante bioautografía.

Los extractos lipopeptídicos obtenidos a las 24, 48 y 72 horas de desarrollo de la bacteria en medio optimizado para producción de lipopéptidos MOLP (Jacques *et al.*, 1999) y en medio de bajo costo HSC40-ME2, demuestran la presencia de diferentes familias de lipopéptidos antifúngicos, éstas se determinaron mediante análisis cromatográfico en capa fina (HPTLC) el cual demostró la presencia de familias de lipopéptidos cíclicos: fengicinas, iturinas y surfactinas Figura 6. Posteriormente la prueba conjunta de HPTLC-bioautografía Figura 7, reveló que las fracciones correspondientes a fengicinas mostraron una alta inhibición de crecimiento miceliar del patógeno a diferencia de iturinas y surfactinas, con inhibición nula. La inhibición del crecimiento en la fracción de fengicinas, aumentó de manera progresiva en función al tiempo de incubación de la bacteria, con un máximo a las 72 horas con factor de retención (Rf) ~0.20. Los resultados demuestran que la actividad antifúngica debida a las fengicinas producidas por la bacteria en el medio de bajo costo fue igual que aquella producida en el medio optimizado. Estas evidencias soportan que la actividad antifúngica del agente de biocontrol *Bacillus subtilis* está basada en la producción de lipopéptidos como fengicinas como lo demuestran estudios previos de Yáñez y colaboradores (2012a) y brinda una base fiable para el desarrollo de procesos de producción a nivel industrial usando medios de bajo costo.



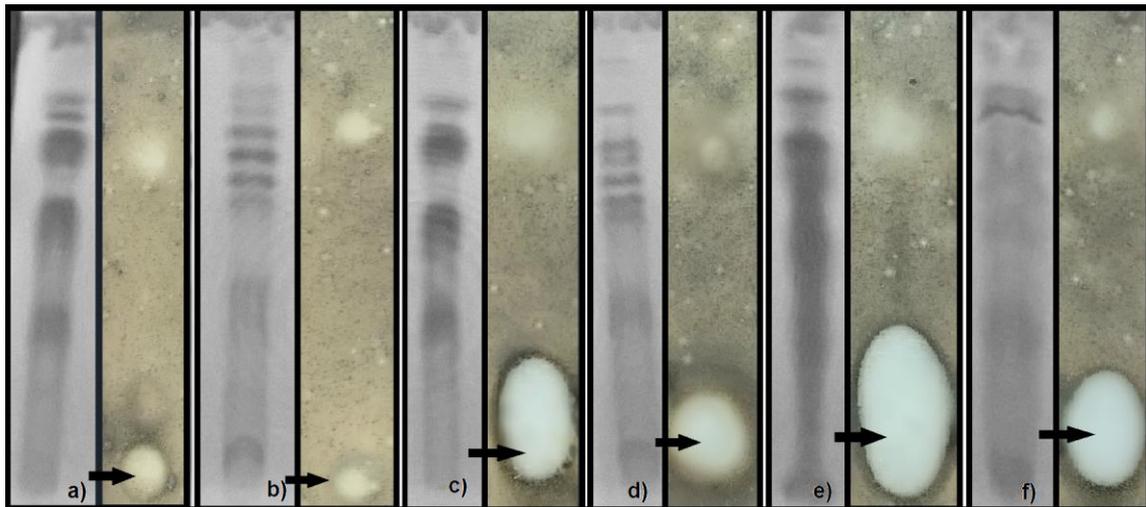


Figura 7. Prueba conjunta HPTLC-bioautografía de extractos lipopeptídicos de *Bacillus subtilis* S2-1 contra *Colletotrichum acutatum*.

a. Extractos producidos en medio MOLP y medio de bajo costo HSC40-ME2.

b. Las flechas señalan las zonas de inhibición.

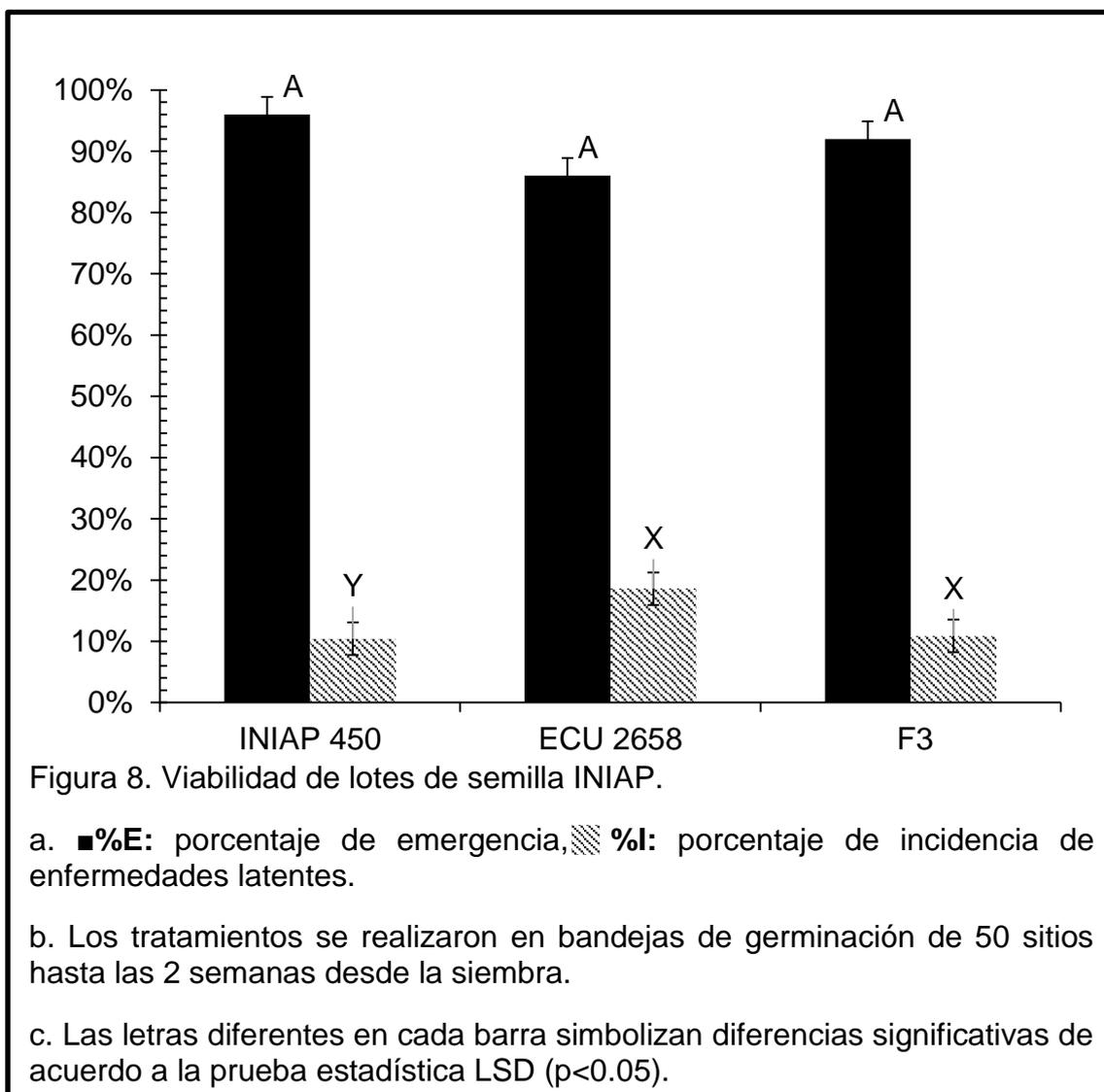
c. Extractos lipopeptídicos obtenidos en: **a)** 24 horas, medio MOLP, **b)** 24 horas, medio HSC40-ME2, **c)** 48 horas, medio MOLP, **d)** 48 horas, medio HSC40-ME2, **e)** 72 horas, medio MOLP y **f)** 72 horas, medio HSC40-ME2.

## Efectividad *in vivo* de *Bacillus subtilis* contra *Colletotrichum acutatum*

### 3.2.2 Efectividad para infecciones latentes e inoculaciones artificiales

#### 3.2.2.1 Viabilidad de la semilla

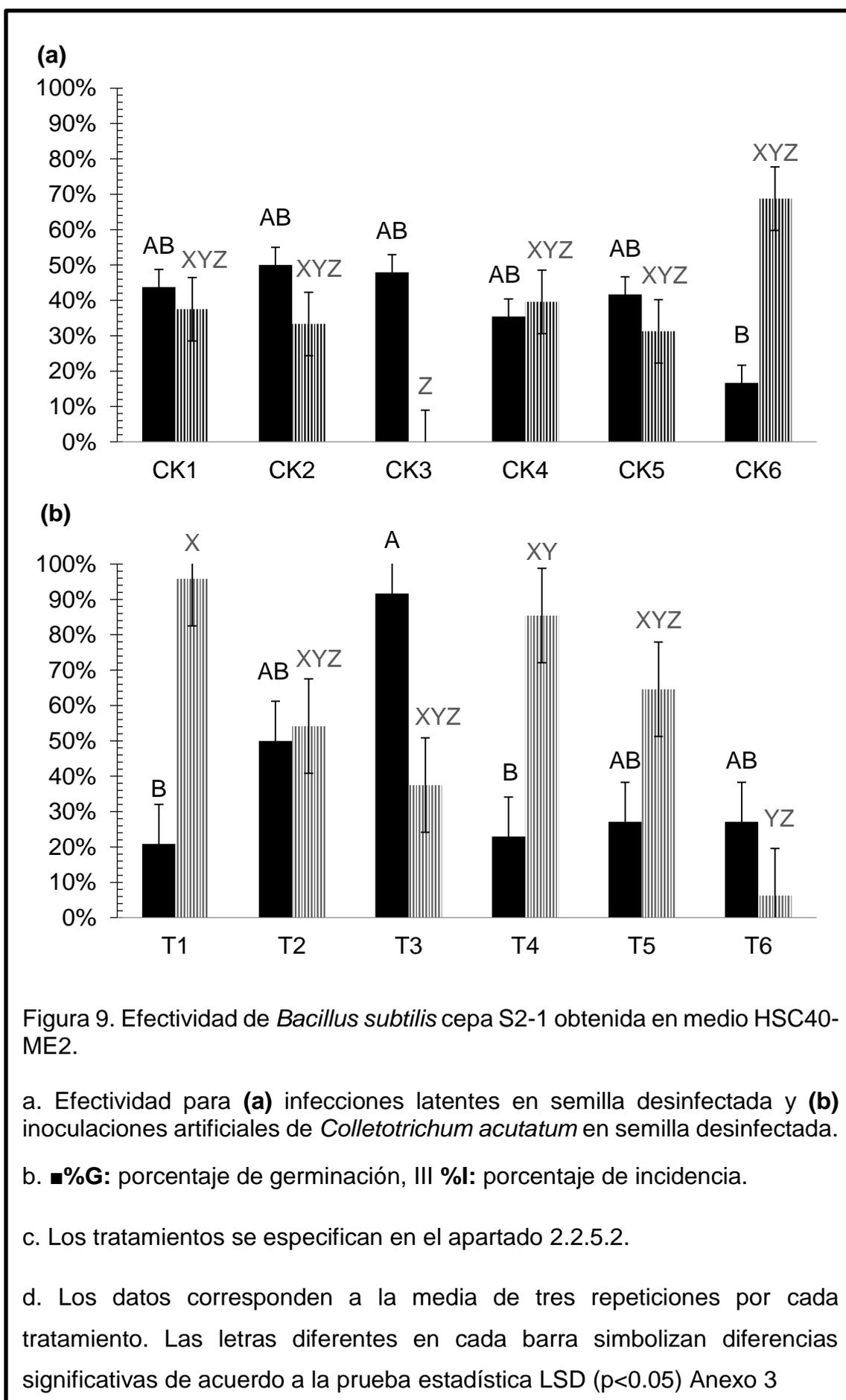
Todos los lotes de semillas utilizados en laboratorio, demostraron una viabilidad apta, con niveles de emergencia  $\approx 90\%$  e incidencia de enfermedades latentes menor  $\approx 19\%$  Figura 8. Se seleccionó la variedad INIAP ECU-2658-2 por sus niveles de germinación, tolerancia a la antracnosis comprobada, variedad de semilla de uso más frecuente entre los agricultores Ecuatorianos (INIAP, 2016) y disponibilidad de la misma.

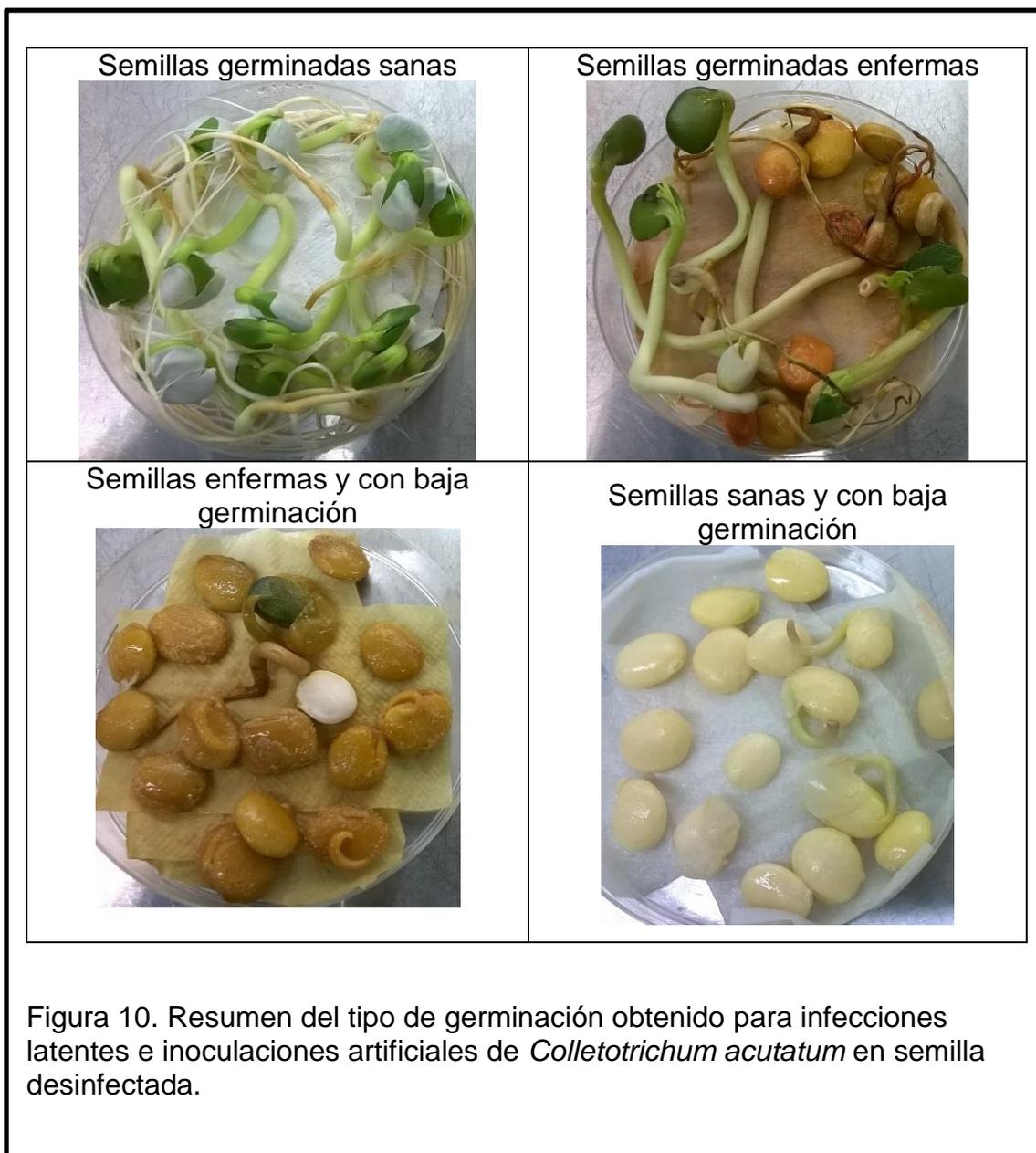


### 3.2.2.2 Efectividad en semillero

La efectividad para infecciones latentes (Figura 9a) presentó similitud estadística en germinación para los 5 tratamientos que abarcan a semilla desinfectada (CK1), semilla desinfectada con tratamiento químico Vitavax® (CK2), semilla desinfectada con tratamiento biológico Rhapsody® (CK3), semilla desinfectada con tratamiento de  $2 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> de *Bacillus subtilis* S2-1 obtenido en medio de bajo costo como sobrenadante filtrado (CK4), y como cultivo bacteriano completo (CK5). La suspensión de biomasa (CK6) presentó diferencia significativa en la germinación con niveles menores a los otros tratamientos, que fue de  $\approx 17\%$ . Para enfermedades latentes, los tratamientos presentaron similitudes estadísticas de efectividad para control de la incidencia  $\approx 50\%$ , el tratamiento CK3 tuvo una incidencia del 0% y por lo tanto efectividad superior para el control de la enfermedad. En inoculaciones artificiales, los mejores resultados de control de incidencia de la enfermedad fueron los obtenidos con tratamiento T6 (Semilla inoculada con *Colletotrichum acutatum*  $2 \times 10^5$  conidias mL<sup>-1</sup> + suspensión filtrada de biomasa en tampón PBS de *Bacillus subtilis* S2-1,  $2 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>) con niveles de control de la enfermedad de  $\approx 95\%$ , seguido de los tratamientos con Vitavax (T2), Rhapsody® (T3), y cultivo bacteriano completo (T5) con similitud estadística para el control de enfermedad mayor al  $\approx 50\%$ .

A pesar de haber utilizado semilla con viabilidad previamente comprobada, los niveles de germinación se redujeron en un 40%. Esto indica que al estar las semillas en cajas selladas, la ausencia de oxígeno o los altos niveles de humedad, pudieron afectar sus niveles de germinación. Sin embargo, los niveles de incidencia de enfermedades latentes y con inoculación artificial, fueron estadísticamente similares en la mayor parte de los tratamientos.

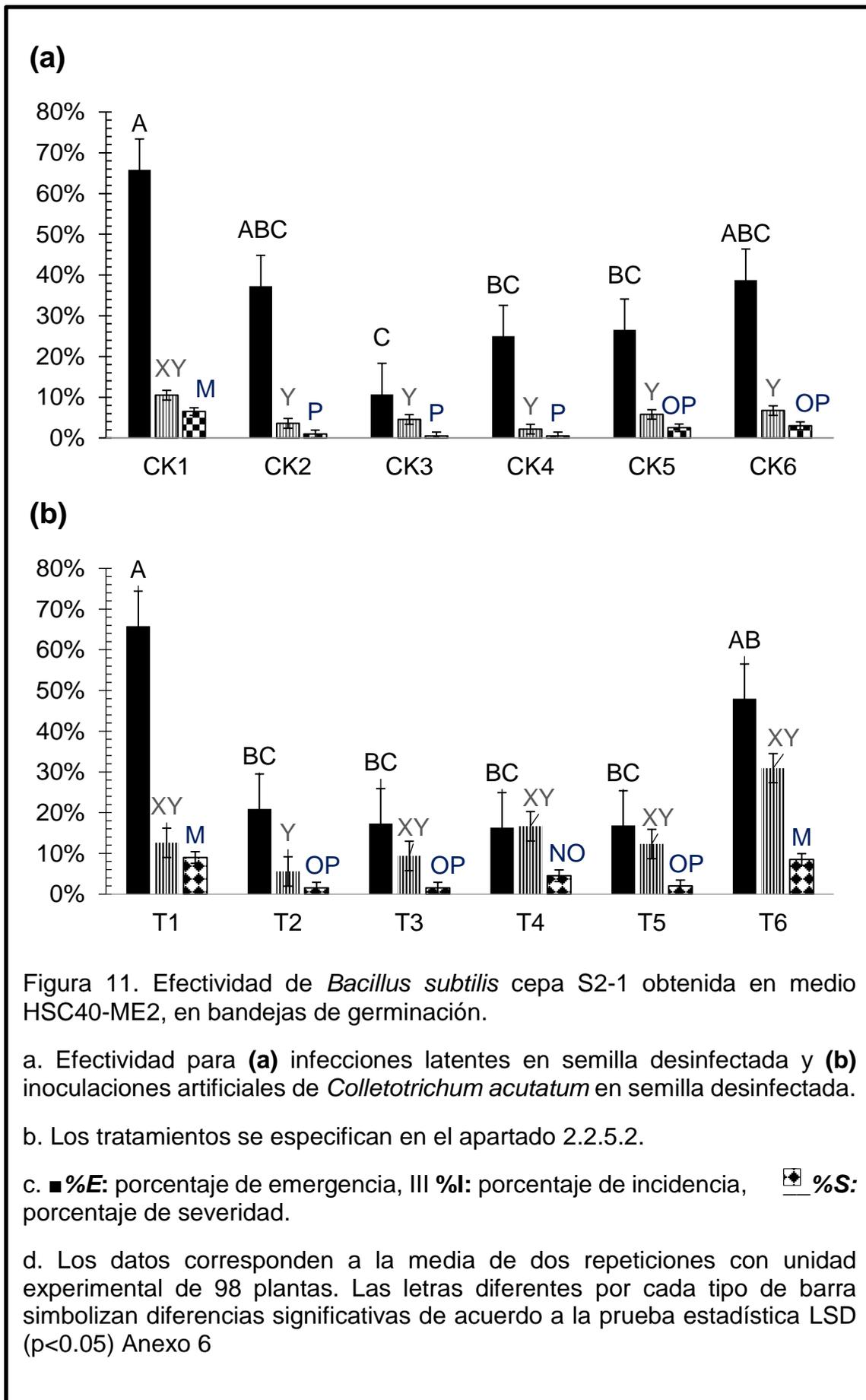


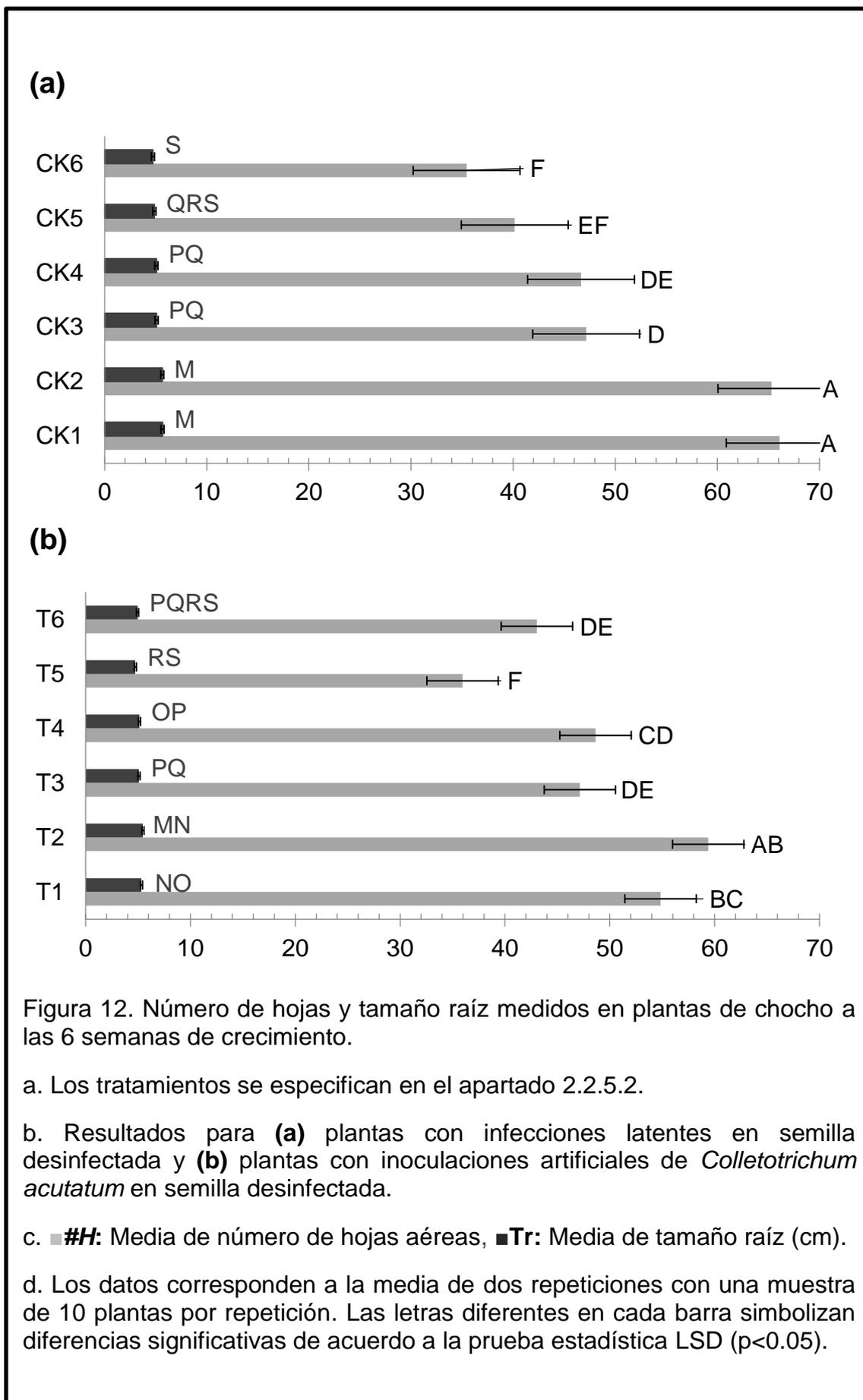


### 3.2.2.3 Efectividad en bandejas de germinación

Las pruebas de efectividad de *Bacillus subtilis* CTPX S2-1 para infecciones latentes e infecciones artificiales en bandejas de germinación (Figura 11), fueron realizadas a condiciones controladas en invernadero con 12 horas luz. Para todos los tratamientos se obtuvo similitud estadística en el control de la incidencia de la enfermedad. Se tuvo un control  $\approx 95\%$  en enfermedades latentes, que disminuyó al  $\approx 85\%$  para los tratamientos con inoculaciones artificiales. La emergencia fue de hasta el 65% en los controles con y sin inoculación, y se redujo hasta el 16% en el resto de tratamientos. Los menores niveles de emergencia se obtuvieron en los tratamientos con inoculación artificial. Esto puede señalar que a pesar de tener una severidad e incidencia reducidas en ambos casos, la enfermedad afecta a la semilla reduciendo su capacidad de emergencia. En la mayor parte de los tratamientos en los que hubo baja emergencia, se constató la existencia de semillas muertas en sus primeras etapas de germinación. Estudios conducidos por Claudio y Falconí (2015) y Grijalva, Yáñez y Falconí (2015), realizados en semilla de chocho con aplicación de cepas de *Bacillus subtilis* obtenido en medio de laboratorio MOLP y medio líquido NYDA respectivamente, demostraron que la germinación y emergencia de plántulas no se vio afectada por la aplicación de la bacteria, sin embargo cabe destacar que los medios de cultivo fueron elaborados con componentes de origen comercial. La baja viabilidad puede deberse a la presencia de metabolitos desconocidos provenientes de los componentes utilizados en la elaboración del medio de cultivo de bajo costo. Stanbury, Whitaker y Hall (1995) afirman que la materia prima utilizada para elaborar medios de bajo costo, al tener un origen agroindustrial desconocido y no destinado para uso en laboratorio, puede contener sustancias tóxicas o metabolitos extraños que limitan el desarrollo celular.

Para todos los tratamientos, las plantas obtenidas a las 5 semanas, demostraron una correlación entre el número de hojas y tamaño raíz Figura 12. Se obtuvieron plantas con mayor vigor en los controles y en el tratamiento químico.





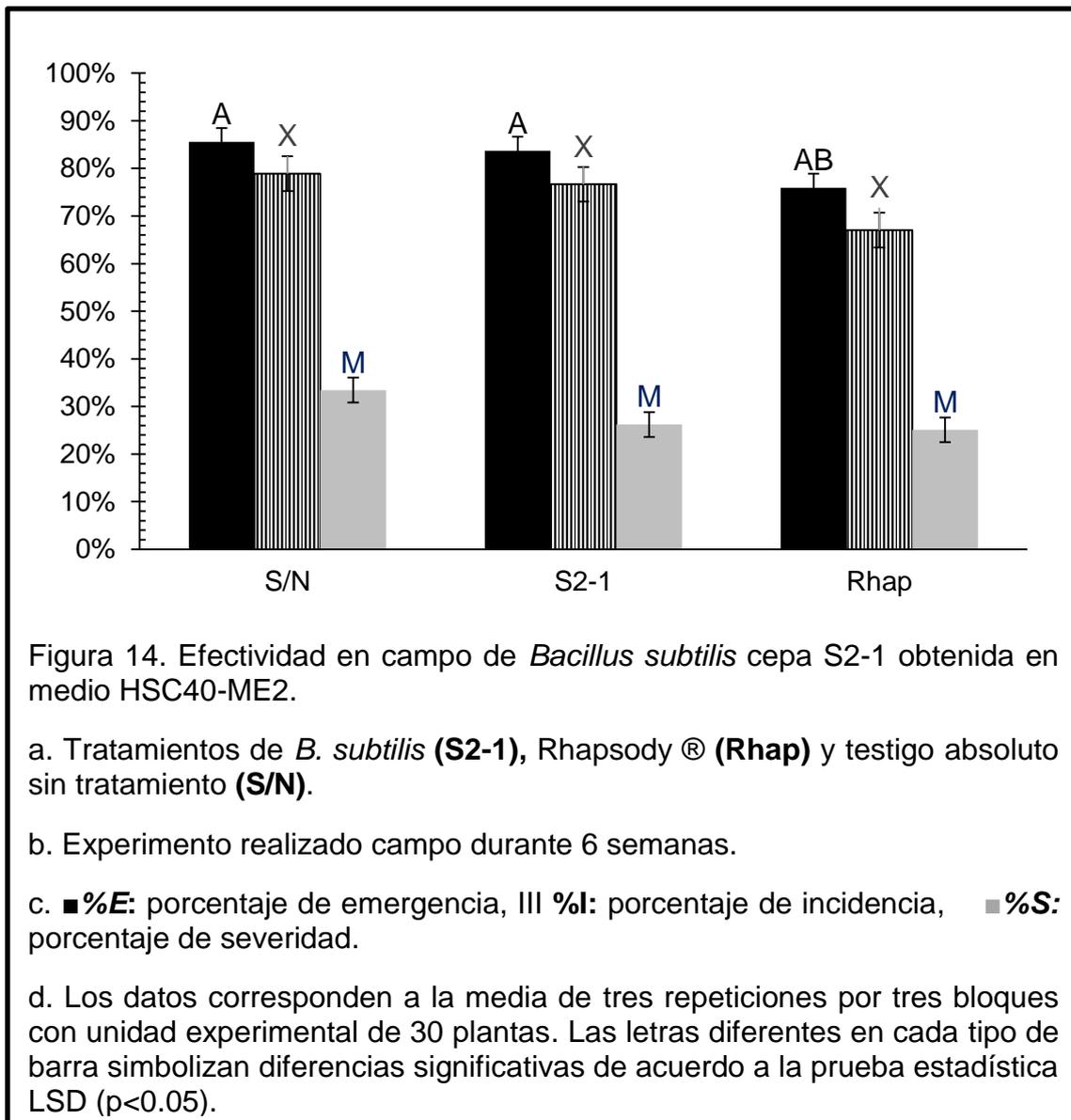
### 3.2.3 Efectividad de *Bacillus subtilis* en campo

Los resultados de campo no mostraron diferencias significativas tanto en germinación, incidencia y severidad de la enfermedad al aplicarse *Bacillus subtilis* S2-1 o Rhapsody en comparación con el testigo absoluto Figura 14. Los niveles de germinación superaron el 70% en las primeras 3 semanas de siembra, mientras que la incidencia alcanzó niveles del 80% con una severidad progresiva que mermó el 100% de la producción en la 5ta y 6ta semana de siembra. El principal factor abiótico influyente en este caso fue el exceso de pluviosidad de la zona que según datos del INAMHI en los meses de siembra que fueron de abril a junio, se extendió a 1200 mm, mientras que los requerimientos del chocho se sitúan en 350-800 mm según Suquilanda (2010). Esto favoreció el crecimiento de hongos fitopatógenos como *Colletotrichum acutatum* que afectó a toda la plantación, como se evidencia en una muestra tomada de la misma en la Figura 13. Por otro lado, es posible la variabilidad de la población de *Bacillus subtilis* S2-1 durante su adaptación al campo, lo cual desemboca en su ineficiencia para controlar al patógeno en condiciones en que el cultivo es más proclive a infectarse. La reducción de la población de la bacteria puede deberse principalmente a la varianza de los factores bióticos y abióticos del lugar (temperatura, humedad, radiación, pluviosidad) y por lo tanto su población se reduce a niveles nulos o casi inexistentes como lo afirman estudios previos de Köhl *et al.*, (2002) y Magan (2001). Al no tratarse de una cepa nativa del lugar, es más probable que sufra estrés, lo que impide su adecuada adaptación según lo afirma Magan (2001).



Figura 13. Planta de chocho con tratamiento de *B. subtilis* S2-1 a las 6 semanas de crecimiento en campo afectada por *Colletotrichum acutatum*.

a. Las flechas indican las lesiones características de la enfermedad de acuerdo a las especificaciones de Talhinhas, Baroncelli, y Le Floch (2016) con coloración naranja en la parte baja y media del tallo, muestra estrangulamiento del mismo.



### 3.3 Escalado de producción

#### 3.3.1 Crecimiento en biorreactor

La Figura 15a representa el crecimiento del aislado S2-2 de *Bacillus subtilis* en medio HSC40-ME2 a escala de biorreactor de 5 litros. La concentración de células de la cepa aumentó de 5.36 a 6.34 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> durante las primeras 6 horas de crecimiento. Del análisis y ajuste de los valores en base al modelo matemático de Baranyi y Roberts (1994), se tiene un crecimiento sigmoideo, característico de la especie, y se calculan parámetros de crecimiento con una duración de la fase de latencia ( $\lambda$ ) de 3.77 horas, tasa máxima de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) 0.4 (Log<sub>10</sub>UFC mL<sup>-1</sup>) h<sup>-1</sup>, máxima concentración de células (MPD) 7.35 Log<sub>10</sub>UFC mL<sup>-1</sup>, coeficiente de relación (R<sup>2</sup>) 0.98 y desviación estándar (SE) 0.12. La ausencia de oxígeno disuelto a partir de la 6ta hora de desarrollo versus el crecimiento bacteriano obtenido, evidencia que *Bacillus subtilis* a pesar de ser descrita como una bacteria aerobia, puede crecer en condiciones de anaerobiosis, como lo confirman estudios de Nakano y Zuber (1998). El máximo desarrollo celular se alcanzó a partir de las 22 horas con 7.43 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> lo cual corresponde con un aumento del pH de 5.42 a 5.64. La comparación del crecimiento entre MOLP y HSC40-ME2, muestra una concentración inicial de células de 4.87 y 5.34 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>, y una concentración final a las 24 horas de 7.51 y 7.34 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> respectivamente. Esto demuestra que el nivel de producción de *Bacillus subtilis*, utilizando materia prima de bajo costo como medio de cultivo, es similar que al producir la bacteria en un medio de cultivo comercial. Se deduce que la bacteria es capaz de asimilar el nitrógeno disponible en la harina de soya, teniendo niveles de producción similares al del medio MOLP y por la tanto se afirma que la harina de soya representa una buena fuente de nitrógeno de bajo costo en reemplazo de la peptona que se utiliza en el medio MOLP, esto lo avala estudios de Jacques *et al.* (1999); Pryor *et al.*, (2007); Yáñez *et al.*, (2012b) y Younis, Hezayen, Nour, y Shabeb (2010). En el mercado existe disponibilidad y accesibilidad a harina de soya y melaza, lo cual representa facilidad para escalar la producción a nivel industrial. Respecto a la cantidad de materia prima utilizada, en altos niveles de melaza es posible la inhibición del

crecimiento de la bacteria, por un pH demasiado bajo, como se demostró en estudios previos de Costa y colaboradores (2001), y Yáñez *et al.*, (2012b). El uso de sales de en el medio de bajo costo se debe a que las sales, como ya se ha mencionado, son indispensables en la producción de metabolitos , y por lo tanto su uso es preciso para lograr niveles adecuados de producción de metabolitos antifúngicos en la bacteria debido a su potencial uso como fungicida biológico. La cantidad y tipo de sales añadidas, fue exactamente el mismo que el utilizado en el medio MOLP, por lo que se puede asociar directamente el nivel de producción con la presencia de las sales minerales.

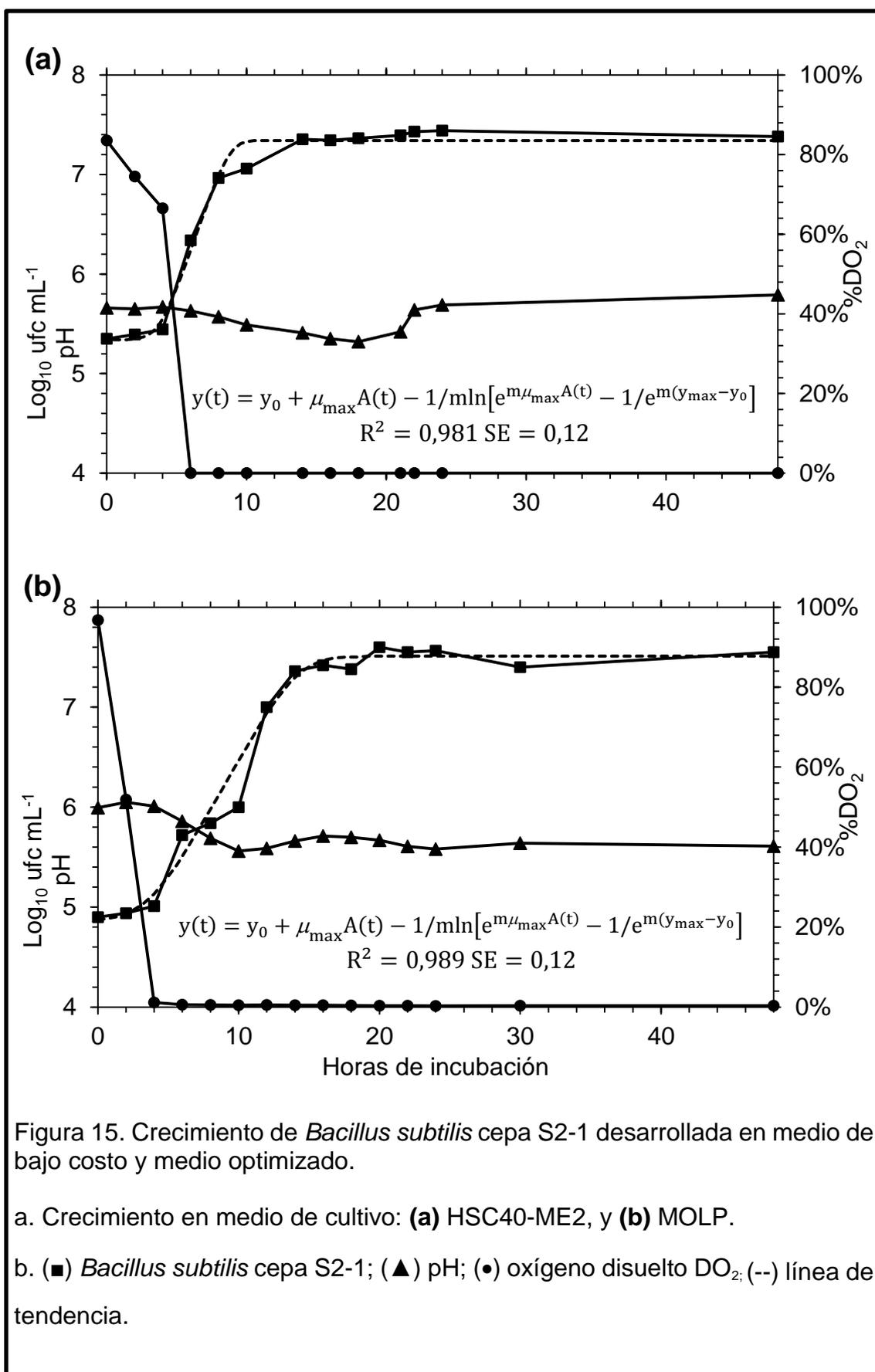


Figura 15. Crecimiento de *Bacillus subtilis* cepa S2-1 desarrollada en medio de bajo costo y medio optimizado.

a. Crecimiento en medio de cultivo: **(a)** HSC40-ME2, y **(b)** MOLP.

b. (■) *Bacillus subtilis* cepa S2-1; (▲) pH; (●) oxígeno disuelto  $\text{DO}_2$ ; (--) línea de tendencia.

### 3.3.2 Costos de producción

Los costos de producción para cada medio de cultivo se detallan en la Tabla 4 y Tabla 5, los costos fueron calculados en base a los precios estimados de materia prima sumados a los costos de servicios básicos para una producción a escala de biorreactor de 5 litros. La tarifa de servicios básicos Tabla 3 incluye el uso de 5 litros de agua para un escalado a 5 litros más el consumo eléctrico del biorreactor Applikon ® durante 72 horas de trabajo. Los cargos fijos en los servicios básicos son aplicados a industrias de capacidad media según la EEQ y son independientes del nivel de consumo del servicio. Se recalca que el costo de los reactivos y subproductos utilizados puede variar de acuerdo a la casa comercial de adquisición o del proveedor de los subproductos.

Tabla 3. Costo de servicios básicos para una producción a escala de biorreactor de 5 litros durante 72 horas.

Servicios Básicos								
		<b>U</b>	<b>\$/u</b>	<b>Para 5 L</b>	<b>U</b>	<b>Subtotal</b>	<b>Cargo fijo</b>	<b>Total</b>
Agua	1	m3	\$ 0,72	0,005	m3	\$ 0,00	\$ 2,10	\$ 2,10
Energía	1	Kwh	\$ 0,08	16,56	Kw	\$ 1,29	\$ 4,13	\$ 5,42
<b>Total Servicios</b>								<b>\$ 7,53</b>

*Nota:* Tarifas de acuerdo a la EPMAP y EEQ.

Tabla 4. Costos de producción a escala de 5 litros en medio MOLP.

<b>MEDIO MOLP</b>							
Material	Presentación	u	Precio/u	Para 5 L	u	Subtotal	
Peptona		500	g	\$ 92,00	150	g	\$ 27,60
Ext. Levadura		500	g	\$ 87,00	10	g	\$ 1,74
Sacarosa		1000	g	\$ 180,00	35	g	\$ 6,30
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		500	g	\$ 124,00	9,5	g	\$ 2,36
Otras sales					2,3	g	\$ 0,57
						<b>Subt. (1)</b>	<b>\$ 38,56</b>
						<b>Servicios (2)</b>	<b>\$ 7,53</b>
						<b>Total (1+2)</b>	<b>\$ 46,09</b>

*Nota:* Las tarifas pueden variar de acuerdo a la casa comercial

*Nota 2:* El costo de "otras sales" ha sido estimado como el 24% del costo de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, al constituir el 24% de todas las sales utilizadas.

Tabla 5. Costos de producción a escala de 5 litros en medio HSC40-ME2.

<b>MEDIO HSC40-ME2</b>						
Material	Presentación	u	Precio/u	Para 5 L	u	Subtotal
Harina de soya	1000	g	\$ 3,80	200	g	\$ 0,76
Melaza	1000	g	\$ 1,80	10	g	\$ 0,02
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	500	g	\$ 124,00	9,5	g	\$ 2,36
Otras sales				2,3	g	\$ 0,57
				<b>Subt. (1)</b>		\$ 3,70
				<b>Servicios (2)</b>		\$ 7,53
				<b>Total (1+2)</b>		<b>\$ 11,22</b>

*Nota:* Las tarifas pueden variar de acuerdo a la casa comercial

*Nota 2:* El costo de “otras sales” ha sido estimado como el 24% del costo de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, al constituir el 24% de todas las sales utilizadas.

Tabla 6. Costos de producción versus productividad en medio MOLP y medio HSC40-ME2 para una producción de un litro.

Medio	Costo \$/L	Producción UFC mL <sup>-1</sup>
MOLP: Peptona 30 g L <sup>-1</sup> ; Sacarosa 20 g L <sup>-1</sup> ; Extracto de levadura 7 g L <sup>-1</sup> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.9 g L <sup>-1</sup> + sales.	\$ 9,22	3,24E+07
HSC40-ME2: Harina de soya 40 g L <sup>-1</sup> ; Melaza 2 g L <sup>-1</sup> ; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.9 g L <sup>-1</sup> + sales.	\$ 2,24	2,19E+07

La comparación entre el costo de producción versus la productividad en ambos medios de cultivo Tabla 6, refleja que el medio de bajo costo HSC40-ME2 mantuvo una productividad similar a la obtenida en el medio de laboratorio MOLP, a un costo de producción 75% menor. Los niveles de productividad se han establecido de acuerdo al apartado 3.3.1, en base a los resultados de obtención de células a escala de biorreactor en ambos medios de cultivo.

## 4 CAPÍTULO IV: Conclusiones y Recomendaciones

### 4.1 Conclusiones

#### **Caracterización del crecimiento de *Bacillus subtilis* CTPX S2-1 en el medio de control MOLP.**

De acuerdo a la modelización del crecimiento de la cepa S2-1 de *Bacillus subtilis* en medio MOLP, se concluye que en un medio de cultivo de laboratorio la cepa S2-1 presenta un crecimiento sigmoideo con niveles iniciales de 4,87 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup> hasta un nivel estimado de 7.50 Log<sub>10</sub> UFC mL<sup>-1</sup>.

La actividad antifúngica de *Bacillus subtilis* S2-1 es dependiente de la producción de metabolitos secundarios, los cuales tienen relación directa con la producción de endosporas, presentando mayores niveles a las 72 horas de crecimiento.

#### **Validación de un medio de bajo costo para la producción de *Bacillus subtilis* CTPX S2-1.**

De acuerdo a los resultados de análisis cromatográfico HPTLC y prueba conjunta HPTLC-bioautografía, se evidencia que la actividad antifúngica del agente de biocontrol *Bacillus subtilis* está basada en la producción de lipopéptidos como fengicinas, cuyo nivel de inhibición frente a *Colletotrichum acutatum* fue similar en medio MOLP y medio HSC40-ME2.

La producción de lipopéptidos de *Bacillus subtilis* S2-1, con niveles de antibiosis comparables entre el medio MOLP y el medio HSC40-ME2, está estrechamente relacionada con la adición de sales minerales, las cuales en ambos medios fueron colocadas en iguales dosis.

Los resultados de efectividad *in vivo* en semillero y bandejas de germinación, demostraron que la biomasa, sobrenante y células de *Bacillus subtilis* S2-1 obtenido en medio de bajo costo, tuvieron control en la incidencia en enfermedades latentes e inoculaciones artificiales de *Colletotrichum acutatum*. Por lo que su efectividad es comparable al uso tratamientos químicos Vitavax® y biológicos comerciales Rhapsody®

Se concluye que la efectividad de la aplicación en campo del agente de biocontrol *Bacillus subtilis* S2-1 está estrechamente relacionada a la influencia de factores bióticos y abióticos, los cuales inciden en la supervivencia de la bacteria.

Se concluye que el uso de subproductos agroindustriales de bajo costo como melaza y harina de soya en concentración 40 g L<sup>-1</sup> y 2 g L<sup>-1</sup> respectivamente, constituyen fuentes de carbono y nitrógeno comparables a medios complejos.

**Escalado de la producción de *Bacillus subtilis* CTPX S2-1 en biorreactor en medio de bajo costo.**

El escalado de producción en medio biorreactor de 5 litros, mantuvo la producción de *Bacillus subtilis* CTPX S2-1 en niveles de 2,19E+07 UFC mL<sup>-1</sup> hasta las 48 horas de crecimiento.

El uso de subproductos agroindustriales como melaza y harina de soya representan una reducción del 75% del costo del uso de medios de laboratorio comerciales como los utilizados en medio MOLP.

Se concluye que es posible un escalado a nivel industrial tomando como base la alta productividad de *Bacillus subtilis* S2-1 y el mantenimiento de su capacidad de control de *Colletotrichum acutatum*, al ser producido en un medio a base de subproductos agroindustriales (harina de soya y melaza).

## 4.2 Recomendaciones

Como agente de biocontrol, es recomendable el uso de la cepa CtpxS2-1 después de las 48 horas de crecimiento. Esto asegura su efectividad tomando en cuenta que su nivel de producción de lipopéptidos aumenta en función del tiempo.

Investigar a profundidad la influencia de la harina de soya y/o melaza sobre la semilla de chocho previa germinación, debido a las características que se evidenciaron en la reducción de la germinación.

Indagar sobre otros subproductos agroindustriales que constituyan fuentes de nitrógeno como reemplazo de la harina de soya, ya que al tratarse de una leguminosa que no se produce en el país, su disponibilidad y accesibilidad en el mercado podría verse limitada debido a las políticas de estado.

Se recomienda la aplicación en campo de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 verificando que el momento de aplicación no sea en épocas en que el huésped sea susceptible al patógeno, para favorecer de esta manera la colonización de la bacteria.

Para garantizar la supervivencia de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 y reducir la variabilidad de su población en campo, es recomendable su aplicación conjunta con otros microorganismos y/o tratamientos químicos que beneficien la efectividad en el control del patógeno y a su vez favorezcan el mantenimiento de la población del antagonista.

En base a los resultados de viabilidad de *Bacillus subtilis* CtpxS2-1 obtenido en medio de bajo costo y a escala semi-industrial, se recomienda investigar metodologías de formulaciones secas o líquidas, que garanticen la supervivencia y efectividad de la bacteria luego del procesamiento. El uso de formulaciones en seco sería viable debido a las características de resistencia al calor por formación de endósporas que presenta la bacteria.

## 5 Referencias

- Adams, M., & Moss, M. (2008). *Food Microbiology* (Third ed.). USA: Technology & Engineering.
- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology* (Quinta ed.). USA: Elsevier.
- Baranyi, J., & Roberts, T. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3-4), 277-294.
- Bayona, L. (1989). *Fomento de la producción de leguminosas alimenticias. Informe de consultoría sobre la parte de producción*. Ecuador: FAO/PCT/ECU.
- Caicedo, C., & Peralta, C. (1999). *Chocho, frejol y arveja, leguminosas de grano comestible con un gran mercado potencial en Ecuador*. Ecuador: INIAP.
- Carrillo, E. (1956). *Revisión del género Lupinus en el Perú*. Perú: Universidad Nacional de San Agustín.
- Cheng, H. W., Su, C., Gong, G., Wang, P., & Yu, A. (2008). Isolation and characterization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. *Letters of Applied Microbiology*(47), 180-186.
- Claudio, D., & Falconí, C. (2015). Efecto de *Bacillus subtilis* aislados de suelos agrícolas de la provincia de Cotopaxi en el control biológico de la antracnosis *Colletotrichum acutatum* en el cultivo de chocho *Lupinus mutabilis*. En A. A. USFQ, & A. León-Reyes (Ed.), *Resúmenes del Segundo Simposio de Fitopatología, Control Biológico e Interacciones Planta-Patógeno* (pág. 46). Ecuador: USFQ.
- Corrêa, A., Moura, N., Denardin, V., Soares, J., & Schäfer, J. (2008). Influência da microbiolização de sementes de feijão sobre a transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Revista Brasileira de Sementes*, 30, 156–163.
- Costa, E., Teixidó, N., Usall, J., Atarés, E., & Viñas, I. (2001). Production of the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2 using commercial products and by-products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 367-371.
- Curtis, H., Barnes, N., Schnek, A., & Massarini, A. (2008). *Curtis Biología* (Séptima ed.). Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- De Bach, P. (1964). *Biological control of insect pests and weeds*. London: Chaman and Hall.

- Droby, S., Wisniewski, M., Macarasin, D., & Wilson, C. (2009). Twenty years of postharvest biocontrol research: Is it time for a new paradigm? *Postharvest Biology and Technology*, 52, 137-145.
- El-Bendary, M., Hamed, H., & Moharam, M. (2016). Potential of *Bacillus* isolates as bio-control agents against some fungal phytopathogens. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, 173-178.
- El Ghaouth, A., Wilson, C., & Wisniewski, M. (2004). Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases of fruits and vegetables. En *Diseases of fruits and vegetables* (Vol. II, págs. 511-535). USA: S. A. M. H. Naqvi.
- Elad, Y., & Stewart, A. (2004). Microbial control of *Botrytis* spp. En Elad, Y, B. Williamson, P. Tudzynski, & N. Delen (Edits.), *Botrytis: biology, pathology and control* (págs. 223-241). Netherlands: Kuwer academic publishers.
- Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews Microbiology*(1), 117-126.
- Ewe, J., Wan-Abdullah, W., & Liong, M. (2010). Viability and growth characteristics of *Lactobacillus* in soymilk supplemented with B-vitamins. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 61, 87-107.
- 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. *Plant Disease*(97), 819-827.
- Falconí, C., Yáñez, V. (2016). Dry heat treatment of Andean lupin seed to reduce anthracnose infection. *Crop protection xxx-xxx*.
- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R., & Youngman, P. (2000). The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*(97), 8063-8068.
- Forbes, B. (2007). *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Fox, S., & Bala, G. (2000). Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. *Bioresource Technology*, 75, 235-240.
- Fravel, D. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*(43), 337-359.
- Frey, F., & Yabar, E. (1983). *Enfermedades y plagas de lupinos en Perú*. Perú: Curco.

- Gallardo, E., Yáñez, V., & Falconí, C. (2015). Producción industrial de *Bacillus subtilis* para control de la moniliasis de cacao. En A. A. USFQ, & A. León-Reyes (Ed.), *Resúmenes del Segundo Simposio de Fitopatología, Control Biológico e Interacciones Planta-Patógeno* (pág. 70). Ecuador: USFQ.
- García, M., Quintero, R., & López-Munguía, A. (1993). *Biología Alimentaria*. México: Editorial Limusa.
- García, V. (2004). *Introducción a la microbiología* (Segunda ed.). San José: Editorial EUNED.
- Grijalva, A., Yáñez, V., & Falconí, C. (2015). *Bacillus spp. evaluation to control anthracnose infection on Andean lupin seed (Lupinus mutabilis Sweet)*. Recuperado el 6 Febrero de 2016, de [http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015\\_meeting\\_abstracts/aps2015abO219.htm](http://www.apsnet.org/meetings/Documents/2015_meeting_abstracts/aps2015abO219.htm).
- Hamburger, M., & Cordell, G. (1987). A direct bioautographic tlc assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*, 50(1), 19-22.
- Helmuth, W. (2000). *Manejo Integrado y Control Biológico de Plagas y Enfermedades*. Ecuador: Editorial Proexant.
- Hernández, A., Alfaro, I., & Arrieta, R. (2003). *Microbiología Industrial*. Costa Rica: Editorial EUNED.
- Hofvendahl, K., & Hagerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzymatic Microbial Technology*, 26, 87-107.
- Ingraham, J. (1998). *Introducción a la Microbiología* (Vol. II). España: Editorial Reverté.
- Insuasti, M. (2001). Enfermedades foliares del chocho. En C. P. Caicedo, *El Cultivo de Chocho* (págs. 24-30). Ecuador: INIAP.
- Jacobsen, S., & Sherwood, S. (2002). *Cultivo de granos andinos en Ecuador: informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto*. Ecuador: FAO/ CIP/ CRS.
- 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*, 77(1-3), 223-233.
- KiBeom, L., Sang-Kee, K., & Yun, C. (2013). A low-cost *Lactobacillus salivarius* L29 growth medium containing molasses and corn steep liquor allows the

- attainment of high levels of cell mass and lactic acid production. *African Journal of Biotechnology*, 12(16), 2013-2016.
- Kim, H., Lee, K., & Chae, J. (2015). Postharvest Biological Control of *Colletotrichum acutatum* on Apple by *Bacillus subtilis* HM1 and the Structural Identification of Antagonists. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 1954-1959.
- Köhl, J., Molhoek, W., Lombaers-Van Der Plas, C., Goossen-Van De Geijn, H., De Haas, L., & Gerlagh, T. (2002). Effect of environmental factors on conidial germination of the *Botrytis* spp. antagonist *Ulocladium atrum*. *Bulletin OILB/SROP*, 25, 65-68.
- Koneman, E., & Allen, S. (2008). *Diagnostico Microbiologico*. Argentina: Editorial Médica panamericana.
- Krishna, K., & McSpadden, B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor*, 1-25.
- Kupper, K., Gimenes-Fernandes, N., & Goes, A. d. (2003). Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. *Fitopatologia Brasileira*, 28(3), 251-257.
- Lozano, M. (2010). *Control biológico de plagas y enfermedades vegetales*. Recuperado el 28 de Octubre de 2015: <http://sgittotri.ua.es/es/empresa/documentos/ot-0811-control-biologico-de-plagas.pdf>
- Madariaga, R. (2008). *Producción de Canola, Lupino y Arveja*. Chile: INIA.
- Magan, N. (2001). Physiological approaches to improving the ecological fitness of fungal biocontrol agents. En T. Butt, C. Jackson, & N. Magan, *Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential* (págs. 239-251). UK: CABI Publishing.
- Makkar, R., & Cameotra, S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology*, 58, 428-434.
- Maruo, B., & Yoshikawa, H. (1989). *Bacillus subtilis: molecular biology and industrial application*. Japón: Kodansha.
- McDonald, R. (2010). Canada: an emergent market for organic products. *Revista ComunICA*, 14-22.
- McGinnis, M. (2012). *Laboratory Handbook of Medical Mycology*. USA: Academic Press INC.

- Miller, T., & Churchill, B. (1986). Substrates for large-scale fermentations. En ASM, *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* (págs. 127-40). USA: American Society for Microbiology.
- Moncayo, L., Barrera, V., Caicedo, C., Peralta, E., & Rivera, M. (2000). *Sistemas de producción de chocho en la sierra ecuatoriana*. Ecuador: INIAP.
- Moreira, R., Nesi, C., & May De Mio, L. (2004). *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control Glomerella leaf spot. *Biological Control*, 72, 30-37.
- Murillo, A., Rivera, M., Peralta, E., Mazon, N., & Vargas, F. (2006). Avances preliminares en el mejoramiento genético del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). En INIAP, *Memorias del XII Congreso Internacional de cultivos andinos* (pág. 26). Ecuador: INIAP.
- Murray, P., Rosenthal, K., & Pfaller, M. (2009). *Microbiología médica*. España: Elsevier.
- Nakano, M., & Zuber, P. (1998). Anaerobic growth of a "Strict aerobe" (*Bacillus subtilis*). *Annual Review of Microbiology*, 52, 165-190.
- Ongena, M., Henry, G., & Thonart, P. (2009). The roles of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. En U. Gisi, L. Chet, & M. Gullino, *Recent Developments in Management of Plant Diseases* (págs. 56-69). Germany: Plant Pathology in the 21st Century Springer Verlag.
- Patiño, M., Jimenez, B., Balderas, K., Ortiz, M., Allende, R., Carrillo, A., & Galindo, E. (2005). Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 540-550.
- Peralta, E., Mazón, N., Murillo, A., Rivera, M., Rodríguez, D., Lomas, L., & Monar, C. (2012). *Manual Agrícola de granos andinos* (Tercera ed.). Ecuador: INIAP.
- Pérez, D., & Iannacone, J. (2006). Control Químico de la Antracnosis Causado por *Colletotrichum gloeosporioides* en el Cultivo del Camu Camu (*Myrciaria dubia*, Myrtaceae) en Ucayali, Perú. *Fitopatología Brasileira*, 31(5), 518.
- Peypoux, F., Guimand, M. M., Delcambe, L., Das, B., & Lederec, E. (1978). Structure of iturin A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*. En *Biochemistry* (págs. 3992-3996).

- Prieto, J., & Navarro, J. (2011). *Microbiología en ciencias de la salud : conceptos y aplicaciones* (Tercera ed.). España: Editorial Elsevier.
- Primo, E. (1995). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria* (Vol. II). Editorial Reverte: España.
- Pryor, S., Gibson, D., Hay, A., & Gosset, J. W. (2007). Optimization of spore and antifungal lipopeptide production during solid state fermentation of *Bacillus subtilis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*(143), 63-79.
- Reis, F., Servulo, E., & De Franca, F. (2004). Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 113, 899-912.
- Rodríguez, E., Gamboa, M., Hernández, F., & García, J. (2005). *Bacteriología General: Principios y prácticas de laboratorio*. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Rome, P., Masutt, K., Da Rocha, J., & Costa Rocha, M. (1999). Further trials to control anthracnose (*Colletotrichum* sp.) in white lupins (*Lupinus albus*) with chemicals. En *Proceedings of the 9th international lupin conference* (págs. 40-42). Germany: International Lupin Association.
- Romero, R. (2007). *Microbiología y parasitología humana* (Tercera ed.). México: Editorial Médica Panamericana.
- Rubio, V., & Fereres, A. (2005). *Control biológico de plagas y enfermedades de los cultivos*. España: Centro de Ciencias Medioambientales (CCMA-CSIC).
- Spadaro, D., & Gullino, M. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 185-194.
- Stainer, R., & Villanueva, J. (1996). *Microbiología* (Quinta ed.). España: Editorial Reverté.
- Stanbury, P., Whitaker, A., & Hall, S. (1995). Media for industrial fermentations. En A. Whitaker, *Principles of fermentation technology* (págs. 93-121). UK: Pergamon Press.
- Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics. *Molecular Biotechnology*(56), 845-857.
- Suquilanda, M. (2010). *Producción orgánica de cultivos andinos*. Ecuador: FAO / UNOCANC.
- Tabbene, O., Slimene, L., Djebali, K., Mangoni, M., Urdaci, M., & Limam, F. (2009). Optimization of medium composition for the production of

- antimicrobial activity by *Bacillus subtilis* B38. *Biotechnology Progress*, 1266-1274.
- Talhinhas, P., Baroncelli, R., & Le Floch, G. (2016). Anthracnose of lupins caused by *Colletotrichum lupini*: a recent disease and a successful worldwide pathogen. *Journal of Plant Pathology*, 1(98), 5-14.
- Tapia, M. (2000). *Cultivos andinos subexplotados y su aporte a la alimentación*. Chile: FAO.
- Teixidó, N., Torres, R., Viñas, I., Abadías, M., & Usall, J. (2011). Biological control of postharvest diseases in fruit and vegetables. En C. Lacroix, *Protective cultures, antimicrobial metabolites and bacteriophages for food and beverage biopreservation* (págs. 364-402). France: Woodhead Publishing Limited.
- Tejera, B., Heydrich, M., & Rojas, M. (2012). Antagonismos de *Bacillus* spp. frente a hongos fitopatógenos del cultivo de arroz. *Revista Protección Vegetal*, 27(2), 117-122.
- Thomas, G., & Adcock, K. (2004). Exposure to dry heat reduces anthracnose infection of lupin seed. *Australasian Plant Pathology*, 33(4), 537-540.
- Thomas, G., Sweetingham, M., & Adcock, K. (2008). Application of fungicides to reduce yield loss in anthracnose-infected lupins. *Crop Protection*, 27, 1071-1077.
- Toghueoa, R., Ekea, P., Zabalgoeazcoab, I., Aldanab, B., Nanaa, L., & Boyom, F. (2016). Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of Common Bean Root Rot (*Fusarium solani*). *Biological Control*, 96, 8–20.
- Tortora, G., & Funke, B. (2007). *Introducción a la microbiología* (Novena ed.). Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- USDA. (2015). *National Nutrient Database for Standard Reference Release 28*. Recuperado el 9 de Noviembre de 2015, de: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/search>
- Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., & Jung, G. (1986). Fengycin-A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis*. *Antibiotics*(39), 888-901.
- Vilanova, E., & Sogorb, M. (2004). *Técnicas analíticas de contaminantes químicos: Aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias*. España: Ediciones Díaz de Santos.
- Villacrés, E., Peralta, E., & Caicedo, C. (1998). *Disfrute cocinando con chocho*. Ecuador: INIAP.

- Waites, M., Morgan, N., Rockey, J., & Higton, G. (2001). *Industrial Microbiology: an introduction*. UK: Blackwell Science.
- Wilson, C., & Wisniewski, M. (1989). Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables. *Annual Review of Phytopathology*, 27, 425-441.
- Yáñez, V., Falconí, C., Grijalva, C., Oliva, C., & Castañeda, A. (2015). Potencial de *Bacillus* spp. para control de enfermedades poscosecha de chocho. En A. A. USFQ, & A. León-Reyes (Ed.), *Resúmenes del Segundo Simposio de Fitopatología, Control Biológico e Interacciones Planta-Patógeno* (pág. 42). Ecuador: USFQ.
- Yáñez, V., Usall, J., Viñas, I., Casals, C., Marín, S., Solsona, C., & Teixidó, N. (2011). Potential of a new strain of *Bacillus subtilis* CPA-8 to control the major postharvest diseases of fruit. *Biocontrol Science and Technology*, 409-426.
- Yáñez, V., Viñas, I., Usall, J., Torres, R., Solsona, C., & Teixidó, N. (2012b). Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. *Biological Control*(60), 280-289.
- Yáñez, V., Zeriouh, H., Viñas, I., Torres, R., Usall, J., de Vicente, A., . . . Teixidó, N. (2012a). Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*(132), 609-619.
- Younis, M., Hezayen, F., Nour, M., & Shabeb, M. (2010). Optimization of cultivation medium and growth conditions for *Bacillus subtilis* KO strain isolated from sugar cane molasses. *American Eurasian Journal of Agricultural Environmental Science*, 7, 31-37.
- Zhang, J., & Greasham, R. (1999). Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 407-421.

## **6 ANEXOS**

## Anexo 1: Procedimiento de preparación de criocultivos de conservación de bacterias en criobolas.

### > HOW TO USE



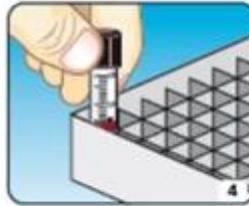
Using a permanent marker, label the code for the organism onto the white panel on the vial. Aseptically inoculate the CRYOBANK™ tube colonies from a fresh, pure culture to a density equivalent to MacFarland 3 or 4 standard.



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

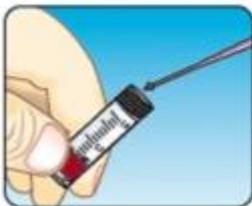


Remove as much of the cryopreservative fluid as possible with a sterile pipette and re-close the tube.

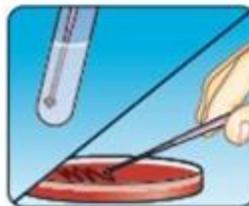


Store the inoculated CRYOBANK™ tube in a suitable freezer between -60°C and -80°C. Details of the tube contents may also be recorded on the grid printed on the lid of the storage box. Space is also available for recording the individual box identification if required.

### > 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

Anexo 2: Germinación e incidencia de infecciones latentes e inoculaciones en cajas de petri (semillero)

Tratam.	Germinación (G)			INCIDENCIA (I)		
	# de semillas germinadas por repetición.			# de semillas enfermas por repetición.		
<b>CK1</b>						
		%	%G	#	%	%I
1R	6	38%		6	38%	
2R	8	50%	44%	7	44%	38%
3R	7	44%		5	31%	
<b>CK2</b>						
		%	%E	#	%	%I
1R	5	31%		11	69%	
2R	10	63%	50%	3	19%	33%
3R	9	56%		2	13%	
<b>CK3</b>						
		%	%E	#	%	%I
1R	16	100%		0	0%	
2R	4	25%	48%	0	0%	0%
3R	3	19%		0	0%	
<b>CK4</b>						
		%	%E	#	%	%I
1R	14	88%		4	25%	
2R	0	0%	35%	0	0%	40%
3R	3	19%		15	94%	
<b>CK5</b>						
		%	%E	#	%	%I
1R	6	38%		4	25%	
2R	8	50%	42%	6	38%	31%
3R	6	38%		5	31%	
<b>CK6</b>						
		%	%E	#	%	%I
1R	0	0%		15	94%	
2R	6	38%	17%	16	100%	69%
3R	2	13%		2	13%	

Tratam.	GERMINACIÓN (E)			INCIDENCIA (I)		
		# de plantas germinadas por repetición.		# de plantas enfermas por repetición.		
<b>T1</b>						
		%	%E	#	%	%I
1R	1	6%		16	100%	
2R	6	38%	21%	14	88%	96%
3R	3	19%		16	100%	
<b>T2</b>						
		%	%E	#	%	%I
1R	7	44%		12	75%	
2R	4	25%	50%	8	50%	54%
3R	13	81%		6	38%	
<b>T3</b>						
		%	%E	#	%	%I
1R	15	94%		6	38%	
2R	15	94%	92%	8	50%	38%
3R	14	88%		4	25%	
<b>T4</b>						
		%	%E	#	%	%I
1R	3	19%		16	100%	
2R	2	13%	23%	9	56%	85%
3R	6	38%		16	100%	
<b>T5</b>						
		%	%E	#	%	%I
1R	9	56%		16	100%	
2R	4	25%	27%	15	94%	65%
3R	0	0%		0	0%	
<b>T6</b>						
		%	%E	#	%	%I
1R	4	25%		3	19%	
2R	5	31%	27%	0	0%	6%
3R	4	25%		0	0%	

Anexo 3: Análisis estadísticos de efectividad en semillero

**The UNIVARIATE Procedure**  
**Variable: Germinacion (Germinacion)**

Moments			
N	36	Sum Weights	36
Mean	0.39583333	Sum Observations	14.25
Std Deviation	0.27990751	Variance	0.07834821
Skewness	0.74317086	Kurtosis	-0.2242636
Uncorrected SS	8.3828125	Corrected SS	2.7421875
Coeff Variation	70.7134763	Std Error Mean	0.04665125

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	0.395833	Std Deviation	0.27991
Median	0.375000	Variance	0.07835
Mode	0.375000	Range	1.00000
		Interquartile Range	0.34375

Tests for Location: Mu0=0			
Test	Statistic		p Value
Student's t	t	8.484946	Pr >  t  <.0001
Sign	M	16.5	Pr >=  M  <.0001
Signed Rank	S	280.5	Pr >=  S  <.0001

Tests for Normality			
Test	Statistic		p Value
Shapiro-Wilk	W	0.918143	Pr < W 0.0111
Kolmogorov-Smirnov	D	0.168555	Pr > D 0.0103
Cramer-von Mises	W-Sq	0.158946	Pr > W-Sq 0.0184
Anderson-Darling	A-Sq	1.017699	Pr > A-Sq 0.0098

Quantiles (Definition 5)	
Quantile	Estimate
100% Max	1.00000
99%	1.00000
95%	0.93750
90%	0.87500
75% Q3	0.53125
50% Median	0.37500

*t Tests (LSD) for Germinacion*

**Note:** This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.057943
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	0.4056

Means with the same letter are not significantly different.			
t Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.9167	3	T3
B	0.5000	3	CK2
B			
B	0.5000	3	T2
B			
B	0.4792	3	CK3
B			
B	0.4375	3	CK1
B			
B	0.4167	3	CK5
B			
B	0.3542	3	CK4
B			
B	0.2708	3	T6
B			
B	0.2708	3	T5
B			
B	0.2292	3	T4
B			
B	0.2083	3	T1
B			
B	0.1667	3	CK6

*The UNIVARLATE Procedure*  
*Variable: Incidencia (Incidencia)*

Moments			
N	36	Sum Weights	36
Mean	0.46180556	Sum Observations	16.625
Std Deviation	0.37089352	Variance	0.137562
Skewness	0.30861351	Kurtosis	-1.3781889
Uncorrected SS	12.4921875	Corrected SS	4.81467014
Coeff Variation	80.313785	Std Error Mean	0.06181559

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	0.461806	Std Deviation	0.37089
Median	0.375000	Variance	0.13756
Mode	0.000000	Range	1.00000
		Interquartile Range	0.75000

Tests for Location: Mu0=0				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	7.470698	Pr >  t	<.0001
Sign	M	14.5	Pr >=  M	<.0001
Signed Rank	S	217.5	Pr >=  S	<.0001

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.876608	Pr < W	0.0008
Kolmogorov-Smirnov	D	0.150177	Pr > D	0.0392
Cramer-von Mises	W-Sq	0.193141	Pr > W-Sq	0.0061
Anderson-Darling	A-Sq	1.401336	Pr > A-Sq	<0.0050

Quantiles (Definition 5)	
Quantile	Estimate
100% Max	1.00000
99%	1.00000
95%	1.00000
90%	1.00000
75% Q3	0.90625
50% Median	0.37500

*The GLM Procedure*

*t Tests (LSD) for Incidencia*

Note: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.085286
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	0.4921

Means with the same letter are not significantly different.					
t Grouping		Mean	N	Tratamiento	
	A	0.9583	3		T1
	A				
B	A	0.8542	3		T4
B	A				
B	A C	0.6875	3		CK6
B	A C				
B	A C	0.6458	3		T5
B	A C				
B	D A C	0.5417	3		T2
B	D				
B	D E C	0.3958	3		CK4
B	D E C				
B	D E C	0.3750	3		CK1
B	D E C				
B	D E C	0.3750	3		T3
	D E C				
	D E C	0.3333	3		CK2
	D E C				
	D E C	0.3125	3		CK5
	D E				
	D E	0.0625	3		T6
	E				
	E	0.0000	3		CK3

Anexo 4 : Invernadero de crecimiento de bandejas de germinación, ASOPRORQUÍDEAS, Quito-Ecuador.



Anexo 5: Resultados de crecimiento en bandejas de germinación

Alta emergencia



Media emergencia



Medio-baja emergencia



Baja emergencia



Anexo 6: Análisis estadísticos de efectividad en bandejas de germinación

*The UNIVARLATE Procedure*  
*Variable: Emergencia (Emergencia)*

Moments			
N	24	Sum Weights	24
Mean	0.32440476	Sum Observations	7.78571429
Std Deviation	0.21355517	Variance	0.04560581
Skewness	1.07358317	Kurtosis	-0.0643511
Uncorrected SS	3.57465639	Corrected SS	1.0489336
Coeff Variation	65.8298493	Std Error Mean	0.04359177

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	0.324405	Std Deviation	0.21356
Median	0.265306	Variance	0.04561
Mode	0.265306	Range	0.70408
		Interquartile Range	0.27551

Tests for Location: Mu0=0			
Test	Statistic		p Value
Student's t	t	7.441882	Pr >  t  <.0001
Sign	M	12	Pr >=  M  <.0001
Signed Rank	S	150	Pr >=  S  <.0001

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.848229	Pr < W	0.0020
Kolmogorov-Smirnov	D	0.238551	Pr > D	<0.0100
Cramer-von Mises	W-Sq	0.251318	Pr > W-Sq	<0.0050
Anderson-Darling	A-Sq	1.419063	Pr > A-Sq	<0.0050

Quantiles (Definition 5)	
Quantile	Estimate
100% Max	0.806122
99%	0.806122
95%	0.734694
90%	0.693878
75% Q3	0.438776
50% Median	0.265306

*t Tests (LSD) for Emergencia*

Note: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	0.021445
Critical Value of t	2.17881
Least Significant Difference	0.3191

Means with the same letter are not significantly different.					
t Grouping		Mean	N	Tratamiento	
	A	0.6582	2	CK1	
	A				
	A	0.6582	2	T1	
	A				
B	A	0.4796	2	T6	
B	A				
B	A	C	0.3878	2	CK6
B	A	C			
B	A	C	0.3724	2	CK2
B		C			
B		C	0.2653	2	CK5
B		C			
B		C	0.2500	2	CK4
B		C			
B		C	0.2092	2	T2
B		C			
B		C	0.1735	2	T3
B		C			
B		C	0.1684	2	T5
B		C			
B		C	0.1633	2	T4
		C			
		C	0.1071	2	CK3

*The UNIVARLATE Procedure*  
Variable: *Incidencia (Incidencia)*

Moments			
N	24	Sum Weights	24
Mean	0.10060391	Sum Observations	2.41449373
Std Deviation	0.11280048	Variance	0.01272395
Skewness	1.84531273	Kurtosis	4.15744711
Uncorrected SS	0.53555831	Corrected SS	0.29265081
Coeff Variation	112.123361	Std Error Mean	0.0230253

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	0.100604	Std Deviation	0.11280
Median	0.078571	Variance	0.01272
Mode	0.000000	Range	0.46667
		Interquartile Range	0.14612

Tests for Location: $\mu_0=0$				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	4.369276	Pr >  t	0.0002
Sign	M	8.5	Pr >=  M	<.0001
Signed Rank	S	76.5	Pr >=  S	<.0001

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.805867	Pr < W	0.0004
Kolmogorov-Smirnov	D	0.18623	Pr > D	0.0301
Cramer-von Mises	W-Sq	0.189647	Pr > W-Sq	0.0066
Anderson-Darling	A-Sq	1.304846	Pr > A-Sq	<0.0050

Quantiles (Definition 5)	
Quantile	Estimate
100% Max	0.4666667
99%	0.4666667
95%	0.3333333
90%	0.1875000
75% Q3	0.1461248
50% Median	0.0785714

*t Tests (LSD) for Incidencia*

**Note:** This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	12
Error Mean Square	0.013123
Critical Value of t	2.17881
Least Significant Difference	0.2496

Means with the same letter are not significantly different.				
t Grouping	Mean	N	Tratamiento	
	A	0.3093	2	T6
	A			
B	A	0.1667	2	T4
B	A			
B	A	0.1261	2	T1
B	A			
B	A	0.1232	2	T5
B	A			
B	A	0.1049	2	CK1
B	A			
B	A	0.0938	2	T3
B	A			
B	A	0.0672	2	CK6
B				
B		0.0577	2	CK5
B				
B		0.0556	2	T2
B				
B		0.0455	2	CK3
B				
B		0.0357	2	CK2
B				
B		0.0217	2	CK4

*t Tests (LSD) for Severidad*

Note: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	228
Error Mean Square	0.002535
Critical Value of t	1.97042
Least Significant Difference	0.0314

Means with the same letter are not significantly different.				
t Grouping	Mean	N	Tratamiento	
A	0.09000	20	T1	
A				
A	0.08500	20	T6	
A				
B	0.06500	20	CK1	
B				
B	0.04500	20	T4	
B				
D	0.03000	20	CK6	
D				
D	0.02500	20	CK5	
D				
D	0.02000	20	T5	
D				
D	0.01500	20	T2	
D				
D	0.01500	20	T3	
D				
D	0.01000	20	CK2	
D				
D	0.00500	20	CK3	
D				
D	0.00500	20	CK4	

*t Tests (LSD) for TamaRaiz*

**Note:** This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	228
Error Mean Square	0.122762
Critical Value of t	1.97042
Least Significant Difference	0.2183

Means with the same letter are not significantly different.				
t Grouping		Mean	N	Tratamiento
	A	5.6679	20	CK1
	A			
	A	5.6433	20	CK2
	A			
B	A	5.4622	20	T2
B				
B	C	5.3225	20	T1
	C			
D	C	5.1322	20	T4
D				
D	E	5.0861	20	CK3
D	E			
D	E	5.0673	20	CK4
D	E			
D	E	5.0216	20	T3
D	E			
D	E	F	4.9602	T6
	E	F		
G	E	F	4.8712	CK5
G		F		
G		F	4.7423	T5
G				
G			4.7269	CK6

*t Tests (LSD) for NumHojas*

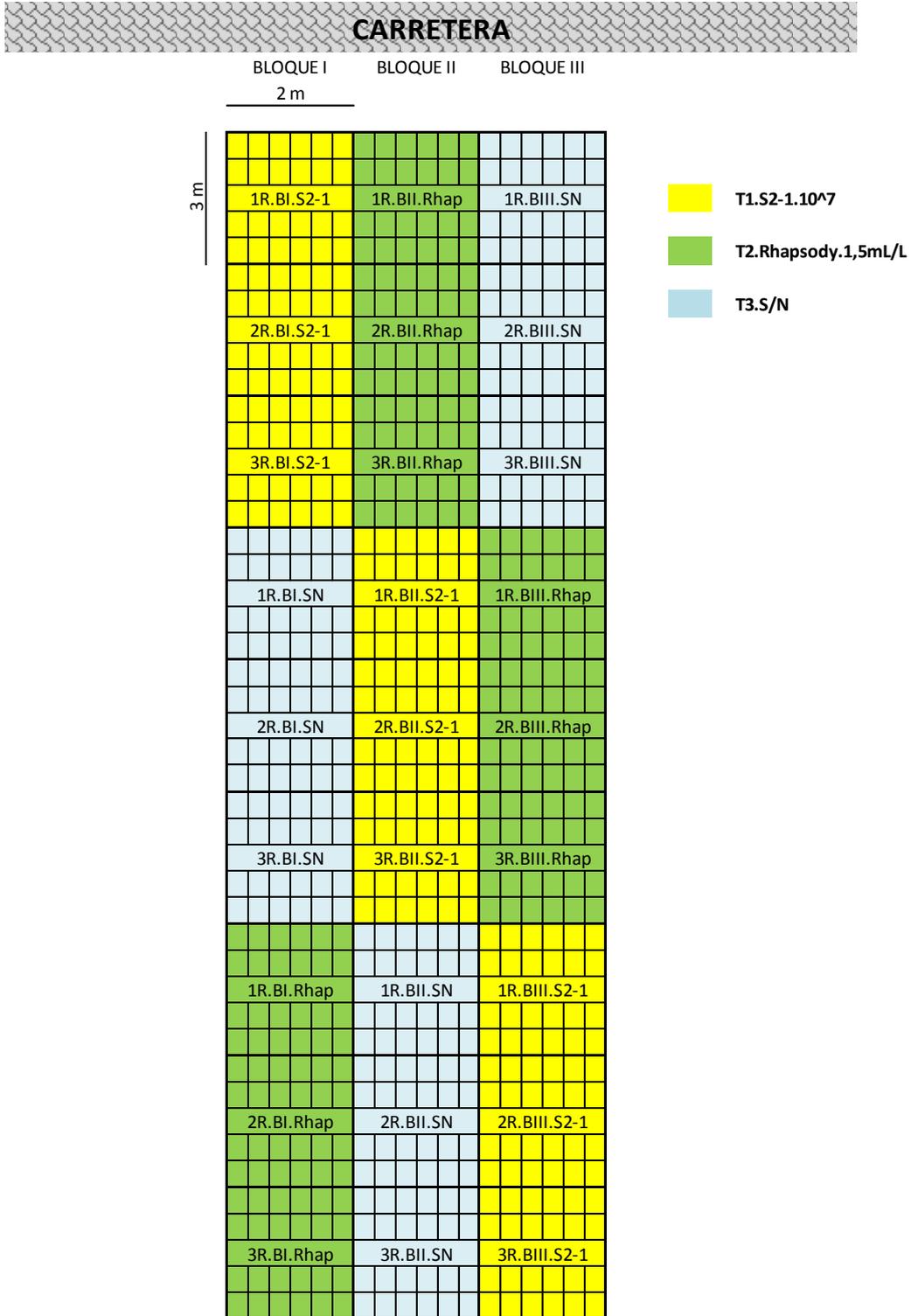
**Note:** This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	228
Error Mean Square	124.7515
Critical Value of t	1.97042
Least Significant Difference	6.9596

Means with the same letter are not significantly different.				
t Grouping	Mean	N	Tratamiento	
	A	66.100	20	CK1
	A			
	A	65.300	20	CK2
	A			
B	A	59.400	20	T2
B				
B	C	54.850	20	T1
	C			
D	C	48.650	20	T4
D				
D		47.150	20	CK3
D				
D	E	46.650	20	CK4
D	E			
D	E	45.050	20	T3
D	E			
D	E	43.050	20	T6
	E			
F	E	40.150	20	CK5
F				
F		35.950	20	T5
F				
F		35.450	20	CK6

## Anexo 7: Mapa de disposición de cultivos de chocho en campo.

MAPA DE DISPOSICIÓN DE CULTIVOS DE CHOCHO EN CAMPO. LOCALIDAD OTAVALO, SECTOR MONSERRATH.  
 VARIEDAD SEMILLA: INIAP 2658      CEPA: S2-1      CONCENTRACIÓN: 10<sup>6</sup>  
 FECHA DE INSTALACIÓN: 28-04-2016      REINOCULACIÓN: CADA 15 DÍAS      DISEÑO: 3tratamientos.3repeticiones.3bloques



Anexo 8: Análisis estadísticos de efectividad en campo

**The UNIVARIATE Procedure**  
**Variable: Severidad (Severidad)**

Moments			
N	27	Sum Weights	27
Mean	0.28339506	Sum Observations	7.65166667
Std Deviation	0.09447955	Variance	0.00892638
Skewness	0.61522795	Kurtosis	0.00399438
Uncorrected SS	2.40053056	Corrected SS	0.23208601
Coeff Variation	33.3384594	Std Error Mean	0.0181826

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	0.283395	Std Deviation	0.09448
Median	0.275000	Variance	0.00893
Mode	0.225000	Range	0.37500
		Interquartile Range	0.15000

Note: The mode displayed is the smallest of 4 modes with a count of 3.

Tests for Location: $\mu_0=0$				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	15.58606	Pr >  t	<.0001
Sign	M	13.5	Pr >=  M	<.0001
Signed Rank	S	189	Pr >=  S	<.0001

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.954542	Pr < W	0.2757
Kolmogorov-Smirnov	D	0.139143	Pr > D	>0.1500
Cramer-von Mises	W-Sq	0.067633	Pr > W-Sq	>0.2500
Anderson-Darling	A-Sq	0.443675	Pr > A-Sq	>0.2500

Quantiles (Definition 5)	
Quantile	Estimate
100% Max	0.500000
99%	0.500000
95%	0.483333
90%	0.410000
75% Q3	0.350000
50% Median	0.275000

Dependent Variable: Severidad Severidad

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.03581811	0.01790905	2.19	0.1338
Error	24	0.19626790	0.00817783		
Corrected Total	26	0.23208601			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Severidad Mean
0.154331	31.91000	0.090431	0.283395

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamiento	2	0.03581811	0.01790905	2.19	0.1338

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamiento	2	0.03581811	0.01790905	2.19	0.1338

*t Tests (LSD) for Severidad*

Note: This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.008178
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	0.088

Means with the same letter are not significantly different.			
t Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.33426	9	SN
A			
A	0.26500	9	S2-1
A			
A	0.25093	9	Rhaps

*The UNIVARLATE Procedure*  
Variable: *Incidencia (Incidencia)*

Moments			
N	27	Sum Weights	27
Mean	0.74197531	Sum Observations	20.0333333
Std Deviation	0.16397639	Variance	0.02688826
Skewness	-0.2061628	Kurtosis	-1.1908484
Uncorrected SS	15.5633333	Corrected SS	0.69909465
Coeff Variation	22.0999791	Std Error Mean	0.03155727

Basic Statistical Measures			
Location		Variability	
Mean	0.741975	Std Deviation	0.16398
Median	0.800000	Variance	0.02689
Mode	0.833333	Range	0.50000
		Interquartile Range	0.26667

Tests for Location: $\mu_0=0$				
Test	Statistic		p Value	
Student's t	t	23.51202	Pr >  t	<.0001
Sign	M	13.5	Pr >=  M	<.0001
Signed Rank	S	189	Pr >=  S	<.0001

Tests for Normality				
Test	Statistic		p Value	
Shapiro-Wilk	W	0.910162	Pr < W	0.0230
Kolmogorov-Smirnov	D	0.192766	Pr > D	0.0107
Cramer-von Mises	W-Sq	0.145373	Pr > W-Sq	0.0250
Anderson-Darling	A-Sq	0.881793	Pr > A-Sq	0.0217

Quantiles (Definition 5)	
Quantile	Estimate
100% Max	1.000000
99%	1.000000
95%	1.000000
90%	0.966667
75% Q3	0.833333
50% Median	0.800000

*Dependent Variable: Incidencia Incidencia*

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F
Model	2	0.07144033	0.03572016	1.37	0.2743
Error	24	0.62765432	0.02615226		
Corrected Total	26	0.69909465			

R-Square	Coeff Var	Root MSE	Incidencia Mean
0.102190	21.79542	0.161717	0.741975

Source	DF	Type I SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamiento	2	0.07144033	0.03572016	1.37	0.2743

Source	DF	Type III SS	Mean Square	F Value	Pr > F
Tratamiento	2	0.07144033	0.03572016	1.37	0.2743

*t Tests (LSD) for Incidencia*

**Note:** This test controls the Type I comparisonwise error rate, not the experimentwise error rate.

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.026152
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	0.1573

Means with the same letter are not significantly different.			
t Grouping	Mean	N	Tratamiento
A	0.78889	9	SN
A			
A	0.76667	9	S2-1
A			
A	0.67037	9	Rhaps

Anexo 9: Plantas de chocho, crecimiento en campo a las 5 semanas de siembra.



Anexo 10: Especificaciones para el uso de biorreactor Applikon ® Ez.

### **Encendido del equipo**

- Botón posterior del biorreactor.

### **Preparación del medio**

- Colocar el medio líquido en el tanque de fermentación.
- Completar con agua destilada a 5 litros.
- Tapar el tanque con sus herramientas respectivas sin colocar sonda alguna.

### **Calibración de la sonda de pH**

- Disponer de soluciones a pH 4 y pH 7 en tubos falcon (50 mL).
- Ingresar como operador clave 0000.
- Ingresar en el menú de pH “calibrate” para calibrar la sonda.
- Seleccionar la opción “2 point”.
- Seleccionar la temperatura de calibrado.
- Calibrar primero a pH 7.
- Verificar en la pantalla el valor de pH acorde a la solución utilizada.
- Calibrar a pH 4.
- Verificar en la pantalla el valor de pH acorde a la solución utilizada.
- Colocar la sonda de pH en el sector respectivo del tanque de fermentación tapado.

### **Esterilizado**

- Cerrar el tanque de fermentación con la sonda de pH colocada y colocar adicional la sonda de DO<sub>2</sub>.
- Tapar todo orificio con papel aluminio.
- Preparar la trampa para muestras, mangueras y filtros.
- Autoclavar por 15 minutos a 121°C.
- Enfriar hasta menos de 37°C.

### **Calibración de la sonda DO<sub>2</sub>**

- Al tanque esterilizado conectar la trampa para muestras, filtros, sonda de temperatura, sensor de la sonda de DO<sub>2</sub>, sensor para sonda de pH, manguera de aire, rotor.
- Ingresar como operador clave 0000.
- Ingresar en el menú de DO<sub>2</sub> para calibrar la sonda.

- Verificar en la pantalla temperatura del medio menor a 37°C.
- Ingresar a “manual control” y colocar la válvula en ON durante 15-20 min.
- Posterior colocar la válvula en OFF.
- Ingresar a “calibrate” e ingresar “set calibration value” en 100.
- Verificar los valores de “slope” entre 2,0 – 4,0 a 25°C y 1,5 – 3,0 a 37°C.

### **Inicio y seguimiento del proceso**

- Tomar muestra del blanco (medio sin inocular)
- Iniciar el programa en computadora conectado al biorreactor.
- Verificar los valores de DO<sub>2</sub> 100%, pH  $\pm$  7, agitación a 200 rpm y temperatura 30°C.
- Para todas las variables dar clic en “Start control” y “show cotroller output” verificar en el computador.
- Inocular el medio.
- Muestrear el medio inoculado (Tiempo cero)
- En caso de formación de espuma durante el proceso colocar antiespumante 0.01%.

### **Toma de muestra y datos**

- Muestrear cada 2 horas hasta las 24 h incluido el medio sin inocular y el medio recién inoculado.
- Utilizar las muestras para conteo por banco de dilución y en espectrofotómetro.

### **Término del bioproceso, limpieza y apagado.**

- Concluido el proceso guardar los datos generados en el software de computadora.
- A continuación apagar el control de sensores de sondas.
- Desconectar mangueras, filtros, sensores, rotor, sondas de pH, temperatura y DO<sub>2</sub>.
- Apagar el equipo.
- Desechar debidamente el medio de cultivo del tanque.
- Lavar sondas y tanque de fermentación.
- Guardar sondas en las respectivas cajas con las seguridades pertinentes (tapas de electrodos, etc).